

引用格式:

严帅凤, 赵梦冉, 徐倩, 卢蕊, 胡龙兴. 紫花苜蓿*MsWRKY47*基因的克隆及耐盐功能分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(4): 38–47.

YAN S F, ZHAO M R, XU Q, LU R, HU L X. Cloning and functional analysis of *MsWRKY47* gene in alfalfa under salt stress[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2025, 51(4): 38–47.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



紫花苜蓿*MsWRKY47*基因的克隆及耐盐功能分析

严帅凤, 赵梦冉, 徐倩, 卢蕊, 胡龙兴*

(湖南农业大学农学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 为明确紫花苜蓿(*Medicago sativa*) *MsWRKY47*基因在调节植物耐盐性中的作用, 本研究以紫花苜蓿‘WL363 HQ’的cDNA为模板, 克隆了*MsWRKY47*基因, 并对其蛋白序列特征以及*MsWRKY47*转基因拟南芥的耐盐性进行了分析。结果表明: *MsWRKY47*编码区全长1 287 bp, 编码428个氨基酸, 含有一个WRKYGQK结构域, 属于WRKY家族, 与蒺藜苜蓿中同源蛋白MtWRKY47的亲缘关系最近; 该基因在紫花苜蓿根中的表达量最高, 且盐胁迫可诱导其表达; *MsWRKY47*蛋白定位于细胞核, 不具备转录激活活性。盐胁迫后*MsWRKY47*转基因植株黄叶率高于野生型的黄叶率, 氧化损伤程度更严重, 表明*MsWRKY47*基因过表达降低了拟南芥的耐盐性, *MsWRKY*蛋白可能在植物对盐胁迫的响应过程中发挥负调控作用。

关键词: 紫花苜蓿; WRKY转录因子; 盐胁迫; 功能分析

中图分类号: S541.9

文献标志码: A

文章编号: 1007–1032(2025)04–0038–10

Cloning and functional analysis of *MsWRKY47* gene in alfalfa under salt stress

YAN Shuai Feng, ZHAO Mengran, XU Qian, LU Rui, HU Longxing*

(College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: In order to clarify the role of *MsWRKY47* gene of alfalfa(*Medicago sativa*) in regulating salt tolerance in plants, the *MsWRKY47* gene was cloned using the cDNA of *Medicago sativa* ‘WL363 HQ’ as a template, and its protein sequence characteristics and the salt tolerance of *MsWRKY47* transgenic *Arabidopsis thaliana* were analyzed. The results showed that the full length of *MsWRKY47* coding region was 1 287 bp, which encoded 428 amino acids and contained a WRKYGQK domain, which belonged to WRKY family and was closely related to homologous protein MtWRKY47 in *Medicago truncatula*. The expression of *MsWRKY47* was the highest in alfalfa roots and could be induced by salt stress. *MsWRKY47* was localized in nucleus and had no transcriptional activation activity. The yellow leaf rate of transgenic plants was higher than that of wild type after salt stress, and the oxidative damage was more serious, indicating that the overexpression of *MsWRKY47* gene reduced the salt tolerance of *Arabidopsis*. *MsWRKY* protein may play a negative regulatory role in the response of plants to salt stress.

Keywords: alfalfa; WRKY transcription factor; salt stress; functional analysis

植物在生长发育过程中会受到多种生物及非生物胁迫的影响, 如土壤盐渍化、干旱和极端温度

等, 这些胁迫会严重影响植物的生长和产量^[1]。目前全球范围内土壤盐渍化问题日益严重, 我国盐碱

收稿日期: 2024–12–03

修回日期: 2025–01–17

基金项目: 国家自然科学基金项目(32201456, 32071877)

作者简介: 严帅凤(2000—), 女, 湖南益阳人, 硕士研究生, 主要从事牧草抗逆性研究, 1696717759@qq.com; *通信作者, 胡龙兴, 博士, 教授, 主要从事牧草种质创新与分子育种研究, grass@hunau.edu.cn

地总面积约1亿公顷,面积大、类型多、分布广。因此,研究植物对盐胁迫的耐受性对于这些盐碱地的开发利用具有重要的意义。植物通过多样化的形态、生理、代谢和分子机制,演化形成了一系列复杂的生存策略来适应盐胁迫^[2-3]。目前植物适应盐胁迫的机制主要有离子平衡^[4]、渗透调节^[5]、活性氧(ROS)清除^[6]、植物激素调节^[7]和植物形态与细胞结构调节^[8]等。

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是一种被广泛栽培与利用的优质豆科牧草,其生长迅速,适应性强,产量高,抗逆性强,素有“牧草之王”的美称^[9]。紫花苜蓿属于中等耐盐碱植物,但在盐碱度较高的土壤中,其生长和发育仍会受到较大影响,通常会出现根系发育不良,叶片变黄、枯萎,甚至死亡等现象,同时其干草品质也会降低。若能进一步提高其耐盐性,使其适应盐碱度更高的土壤,则可大大扩展紫花苜蓿的适宜种植范围,从而提高盐碱地的利用效率。近年来,随着基因组测序技术的进步,国内外的研究人员在探讨紫花苜蓿的耐盐碱性时,对耐盐相关基因的研究已经取得了显著的进展,对于植物响应盐胁迫机制的研究也日益加深。紫花苜蓿 *MsBBX20* 过表达增强了转基因拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的耐盐性^[10]。过表达编码黄酮醇合酶的基因 *MsFLS13* 可增强紫花苜蓿的耐盐性,抑制该基因表达则削弱了紫花苜蓿毛状根对盐胁迫的抗性^[11]。*MsbZIP53* 过表达促进了 *MsMIOX2* 的表达,提高了肌醇加氧酶(MIOX)活性,增强了抗氧化能力和光合作用,并提高了紫花苜蓿对盐胁迫的耐受性^[12]。*MsSPL12* 过表达通过减少 Na^+ 积累、增加抗氧化酶活性和调节下游基因表达来提高紫花苜蓿的耐盐性^[13]。因此,发掘紫花苜蓿中的耐盐相关基因,明确其功能机制,对于培育高产且优质的耐盐紫花苜蓿品种具有重要意义。

WRKY 转录因子是高等植物转录因子家族中最重要的成员之一^[14],因其拥有高度保守的 WRKY 结构域而得名,其蛋白序列中通常包括一个或两个高度保守的 WRKY 结构域,该结构域大约包含 60 个氨基酸,是 DNA 结合区域,在结构域的 N 末端含有保守的七肽氨基酸序列 WRKYGQK,在 C 端具备锌指结构 C_2H_2 —或 C_2HC —^[15]。WRKY 转录因子在植物生长和发育过程中发挥重要的调控作用,参与调

控种子萌发^[16]、种子发育^[17]、开花时间^[18]、幼苗的形态发生^[19]以及配子发育^[20]等。此外,WRKY 转录因子还广泛参与植物的非生物胁迫应答,尤其是盐胁迫应答反应。过表达 *NtWRKY65* 可增强烟草(*Nicotiana tabacum*)的耐盐性^[21]。玉米(*Zea mays*)中转录因子 *ZmWRKY20* 和 *ZmWRKY115* 在细胞核内相互作用,直接结合 *ZmbZIP111* 的启动子并抑制 *ZmbZIP111* 的表达,提高玉米幼苗对盐胁迫的耐受性^[22]。*GsWRKY40* 能感受到盐胁迫进而招募 *GsbHLH92* 形成异源二聚体,然后结合到下游基因 *GmSPOD1* 的启动子特定区域,从而调控活性氧的积累,提高大豆(*Glycine max*)对盐胁迫的耐受能力^[23]。*TaWRKY17* 过表达增强了转基因拟南芥和小麦(*Triticum aestivum*)植株对盐胁迫的耐受性^[24]。*SIWRKY81* 通过与 *SIJAZ1* 介导的茉莉酸途径相互作用,调节亚精胺合成和钠钾离子动态平衡,从而提高番茄(*Solanum lycopersicum*)的耐盐性^[25]。*MsWRKY11* 通过调节细胞内 K^+ 和 Na^+ 的内稳态以及保护过氧化物酶的活性,能够有效降低 Na^+ 对细胞膜结构造成的损害,从而增强紫花苜蓿的耐盐能力^[26]。*MsWRKY33* 通过激活 *MsERF5* 的表达,改变 ROS 水平,进而提高紫花苜蓿对盐胁迫的耐受性^[27]。

研究紫花苜蓿中的耐盐基因及其功能,解析相关的耐盐调控机制,对于培育耐盐紫花苜蓿品种以及盐碱地的开发利用具有重要意义。本研究通过克隆 *MsWRKY47* 基因,并结合生物信息学分析、基因表达模式的探讨以及蛋白质特征的研究,对转基因拟南芥在盐胁迫下的表型和生理生化反应进行分析,以期揭示 *MsWRKY47* 在植物耐盐性中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

基因克隆与组织表达分析所用 cDNA 均来源于紫花苜蓿‘WL363 HQ’;拟南芥花序侵染试验所用材料为哥伦比亚野生型(Col-0);亚细胞定位(瞬时表达试验)材料为本氏烟草。克隆载体 pEASY[®]-Blunt3 Cloning Vector 与大肠埃希菌(*Escherichia coli*)感受态细胞 Trans1-T1 购自北京全式金生物技术股份有限公司;过表达载体 pCAMBIA1301-35S、亚细胞定位载体 pC2300-35S-N-eGFP 与酵母表达载体

pGBKT7保存于本实验室；酵母感受态AH109和Y187购自长沙博仪生物科技有限公司；农杆菌菌株GV3101购自北京擎科生物科技股份有限公司。

1.2 基因克隆与序列分析

参照NCBI数据库中的信息，使用Primer Premier 5.0设计克隆引物 *MsWRKY47-F* 和 *MsWRKY47-R* (表1)。使用Trizol法提取紫花苜蓿‘WL363 HQ’叶片总RNA并用反转录试剂盒将其反转录为cDNA。以此cDNA为模板，对*MsWRKY47*基因进行扩增。扩增后，通过琼脂糖凝胶电泳分离并回收扩增产物。随后，将纯化得到的产物与pEASY®-Blunt3克隆载体进行连接，再将连接产物

转化至大肠埃希菌Trans1-T1感受态细胞中。最后，在含有羧苄西林的LB培养基平板上筛选出阳性克隆，使用通用引物M13进行菌落检测，送至上海擎科生物科技股份有限公司完成测序。

通过NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)获取蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、红车轴草(*Trifolium pratense*)、豌豆(*Pisum sativum*)、水稻(*Oryza sativa*)、长柔毛野豌豆(*Vicia villosa*)、紫穗槐(*Amorpha fruticosa*)、野大豆(*Glycine soja*)、大豆中与拟南芥WRKY47同源的蛋白序列。利用Mega7软件(<http://www.megasoftware.net/index.php>)进行序列分析比对及进化树构建。

表1 *MsWRKY47*基因相关的PCR引物

Table 1 PCR primers sequences related to *MsWRKY47* gene

引物名称	引物序列(5'-3')	用途
<i>MsWRKY47-F</i>	GGATCCATGGAAGAAAAAGTTCAAAC	载体构建
<i>MsWRKY47-R</i>	GTCGACTTAACCACTACTCTTACTAG	
<i>MsWRKY47-2300-F</i>	GCTCTAGAATGGAAGAAAAAGTTCAAAC	
<i>MsWRKY47-2300-R</i>	GTCGACTTAACCACTACTCTTACTAG	
<i>MsWRKY47-BD-F</i>	tgatctcagaggagacctgCATATGATGGAAGAAAAAGTTCAAAC	RT-PCR
<i>MsWRKY47-BD-R</i>	tagttatgcggccgctgcagGTCGACTTAACCACTACTCTTACTAG	
<i>qEF-1a-F</i>	GCACGCTCTTCTTGCATTACT	
<i>qEF-1a-R</i>	GGGCTTGTCTGTGGGTCTCTT	
<i>qAtActin-F</i>	CCCCAGATGTGCTAAAGA	
<i>qAtActin-R</i>	AACCCTCAACAGCCAATA	
<i>qMsWRKY47-F</i>	GCAGGAGAGCTAGAGTGTCC	
<i>qMsWRKY47-R</i>	TGCTTACGAAC TGGGCATGA	

注：小写序列为5'端添加的重组序列。

1.3 基因表达模式分析

取盛花期紫花苜蓿‘WL363 HQ’的花、根以及不同部位的茎与叶等组织样品，对基因的组织特异性表达进行研究，使用200 mmol/L NaCl对在基质中生长4周的紫花苜蓿‘WL363 HQ’幼苗进行盐胁迫处理，分别取盐胁迫处理0、4和10 h下的叶片，研究其在盐胁迫下的表达情况。使用Trizol法提取上述样品的RNA后，将其逆转录成cDNA，于-20 °C保存，剩余RNA保存于-80 °C。以cDNA为模板进行荧光定量PCR检测，以紫花苜蓿*EF-1a*为内参基因，记录目的基因和内参基因的Ct值。参考文献[28]，获得基因在不同组织中的相对表达量以及基因在盐胁迫下的相对表达量。

1.4 亚细胞定位分析

将目的基因的ORF区序列构建到pC2300-35S-N-eGFP载体上(表1，引物*MsWRKY47-2300-F*和

MsWRKY47-2300-R)，重组质粒转化农杆菌感受态GV3101，之后将阳性转化子接种至含有利福平和卡那霉素的LB液体培养基中，于28 °C摇床中振荡培养，用MES重悬液重悬菌液至吸光度(OD₆₀₀)为0.6~0.8，于28 °C避光培养1 h后，使用无针头的注射器吸取菌液并将其注入烟草下表皮，分别避光培养2 d、光培养1 d后，剪取烟草叶片制作临时装片，使用激光共聚焦显微镜(LSM880, Zeiss)观察和采集图片。

1.5 转录激活活性分析

制备和转化酵母感受态AH109和Y187，使用同源重组的方法将目的基因的ORF区序列构建到pGBKT7载体上(表1，引物*MsWRKY47-BD-F*和*MsWRKY47-BD-R*)，将重组质粒分别转入酵母感受态细胞AH109和Y187中，然后将菌液涂布在SD/-Trp选择平板上。对于经过菌落PCR验证的

AH109阳性转化子, 将其划线接种至SD/-Trp/-Ade平板, 并在30 °C下培养3 d, 通过观察酵母的生长情况来判断目的蛋白是否具备转录激活活性。挑取经过菌落PCR验证的Y187阳性转化子, 在浸有Z-Buffer/X-gal溶液的无菌滤纸上进行显色反应, 依据菌落颜色的变化(是否变为蓝色)来判断目的蛋白是否具有转录激活活性。

1.6 农杆菌介导的转基因拟南芥阳性植株获取

使用*BamH* I和*Sal* I限制性内切酶分别对目标基因和表达载体pCAMBIA1301-35S进行切割。通过琼脂糖凝胶电泳分离并纯化目标基因及pCAMBIA1301-35S载体的酶切片段。将这些片段连接起来后, 转入大肠埃希菌Trans1-T1感受态细胞, 并在添加了卡那霉素的LB培养基平板上筛选出阳性克隆。经过菌落PCR鉴定和测序分析确认重组载体中含有目标基因后, 从阳性克隆中提取质粒, 并将其导入农杆菌GV3101。最后, 在含有利福平和卡那霉素的LB平板上筛选出携带正确质粒的阳性克隆。使用农杆菌并采用拟南芥花序侵染的方法进行遗传转化。收集转化后的种子, 并将其播种于含有潮霉素的1/2 MS固体培养基上, 以筛选出阳性植株。将筛选出的阳性植株移栽至营养土中, 继续生长并获得T1代种子。随后, 将T1代种子再次播种在含潮霉素的1/2 MS培养基上, 待幼苗长出4片真叶后, 将其移栽至土壤中, 继续通过潮霉素对收获的种子进行筛选, 直到得到T3代的纯合体种子。利用Trizol试剂从纯合的拟南芥叶片中提取总RNA, 并通过实时荧光定量PCR技术检测目标基因的表达水平, 挑选表达量较高的株系用于后续试验。

1.7 盐胁迫下转基因拟南芥的耐盐性分析

1.7.1 *MsWRKY47*转基因拟南芥的盐处理

将经过4 °C低温春化48 h后的野生型和转基因株系种子播种在1/2 MS固体培养基上, 培养10 d后将生长状态良好且生长状况相近的拟南芥幼苗移栽至装有培养土(营养土、蛭石、珍珠岩的质量比为5:1:1)的十方盆中, 放置于培养室中用保鲜膜覆盖培养2 d后揭膜并按照正常方式进行培养, 4周后对其进行盐溶液浸泡处理。处理前对植株进行控水, 往大盆中分别加入浓度为200 mmol/L NaCl溶

液, 浸泡深度超过十方盆深度的1/2, 浸泡约3 h, 使土壤处于盐溶液饱和状态, 然后倒掉大盆中多余溶液, 对照组使用清水进行相同时间的浸泡处理。盐处理设置3个重复, 每个重复含5株拟南芥幼苗。

1.7.2 盐胁迫下转基因拟南芥生理指标的测定

拟南芥盐胁迫处理7 d后, 将各个重复中充分展开的功能叶片剪开并混匀, 之后将其均分为3份, 每份样品质量为0.3 g, 最后, 对其进行以下处理。

1) 粗酶液提取。使用液氮预冷研钵和研磨棒, 将样品迅速放入研钵, 加入液氮并将样品研磨成粉末, 后将预冷的5 ml磷酸盐缓冲液(PBS, 50 mmol/L, pH = 7.8)分2次加入磨碎的组织中再次研磨。将制备好的匀浆转入10 ml离心管, 4 °C, 12 000 r/min离心20 min, 上清液即为粗酶液提取液, 将其分装后置于-20 °C保存。

2) 采用TCA-TBA法测定丙二醛(MDA)质量摩尔浓度。

3) 采用直接紫外分光光度法测定过氧化氢酶(CAT)活性^[29]。

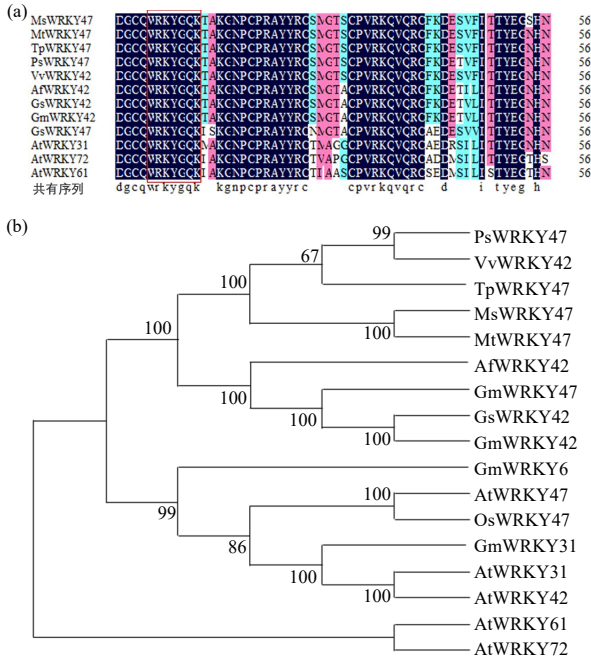
1.8 数据分析

使用Excel 2016整理试验数据, 使用SPSS 26.0软件进行单因素方差分析($P < 0.05$); 使用Origin 2021软件作图。

2 结果与分析

2.1 *MsWRKY47*蛋白序列同源性分析结果

以紫花苜蓿品种‘WL363 HQ’的*MsWRKY47*基因的cDNA为模板进行PCR扩增, 获得序列长度为1 287 bp的片段, 编码428个氨基酸。紫花苜蓿*MsWRKY47*蛋白与不同植物的同源蛋白的多序列比对结果表明, *MsWRKY47*包含一个典型的WRKYGQK保守结构域, 属于WRKY转录因子家族(图1(a))。紫花苜蓿*MsWRKY47*与不同物种同源蛋白的系统进化树分析结果表明, *MsWRKY47*蛋白与蒺藜苜蓿Mt*WRKY47*、红车轴草Tp*WRKY47*和豌豆Ps*WRKY47*等同源蛋白序列相似性较高, 其中与Mt*WRKY47*同源性最高, 序列相似性高达96.51%(图1(b))。



Ms表示紫花苜蓿; Mt表示蒺藜苜蓿; Tp表示红车轴草; Ps表示豌豆; Os表示水稻; Vv表示长柔毛野豌豆; Af表示紫穗槐; Gs表示野大豆; Gm表示大豆; At表示拟南芥; 红色方框处为WRKYGQK保守结构域。
 (a) MsWRKY47与其他物种同源蛋白结构域氨基酸多重序列比对;

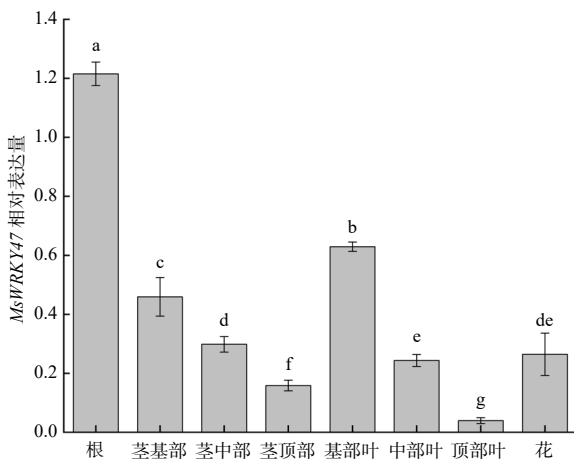
(b) MsWRKY47系统进化树分析

图1 MsWRKY47序列分析结果

Fig. 1 MsWRKY47 sequence analysis result

2.2 MsWRKY47基因组织表达模式分析结果

提取盛花期紫花苜蓿‘WL363 HQ’的花、根以及不同部位的茎与叶等组织样品的RNA, 逆转录成cDNA后对MsWRKY47的表达量进行分析, 结果如图2所示。由图2可见: MsWRKY47基因在紫花苜蓿



不同小写字母表示不同组织之间的基因相对表达量差异显著(P<0.05)。

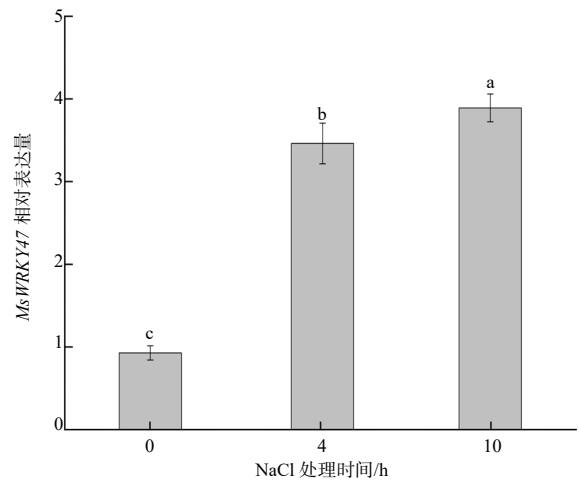
图2 MsWRKY47基因在紫花苜蓿不同组织部位的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of MsWRKY47 gene in different tissue parts of alfalfa

各个部位均有表达,但在不同组织部位的表达水平不同; MsWRKY47在根中的表达量最高,其次是基部叶、茎基部,表达量最低的是顶部叶。

2.3 MsWRKY47基因对盐胁迫的响应分析结果

使用200 mmol/L NaCl对紫花苜蓿‘WL363 HQ’进行盐胁迫处理, 分别提取盐胁迫处理0、4和10 h的叶片RNA, 将其逆转录成cDNA后对MsWRKY47的表达量进行分析, 结果如图3所示。由图3可见: MsWRKY47表达量受到了盐胁迫的显著诱导, 处理4 h和10 h时的表达量分别为未处理组的3.7倍和4.2倍。图3结果表明盐胁迫能显著诱导MsWRKY47基因的表达, 说明该基因可能在盐胁迫应答中发挥一定的作用。



不同小写字母表示基因相对表达量在不同NaCl处理时间下的差异显著(P<0.05)。

图3 不同盐胁迫时间下MsWRKY47基因在紫花苜蓿叶片中的相对表达量

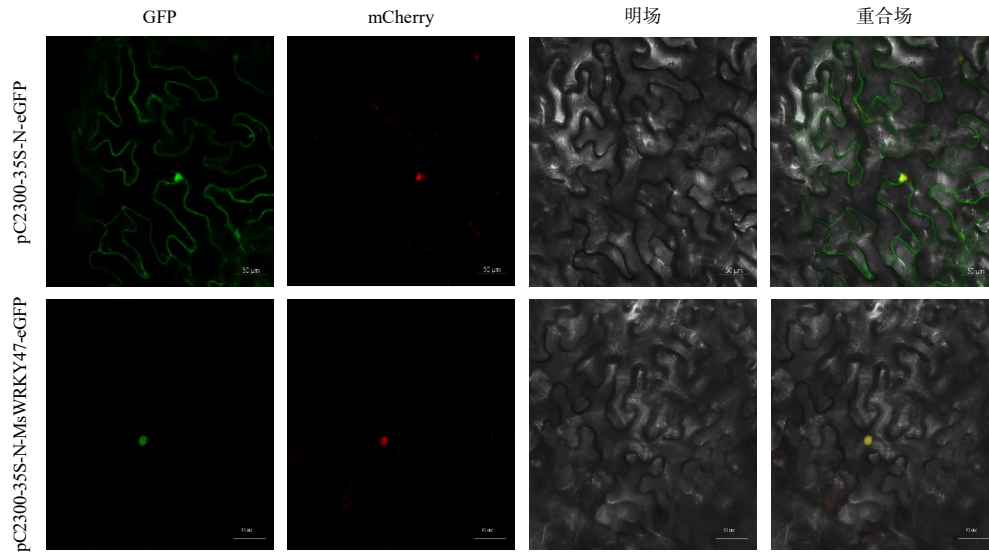
Fig. 3 Relative expression levels of MsWRKY47 gene in alfalfa leaves at different treatment times of salt stress

2.4 MsWRKY47蛋白亚细胞定位分析结果

将MsWRKY47的ORF区序列插入到pC2300-35S-N-eGFP载体上, 用重组质粒转化农杆菌。将重组载体和细胞核Marker共转后注射烟草叶片, 以空载体和细胞核Marker共转作为对照, 于激光共聚焦显微镜下观察其定位情况, 结果如图4所示。由图4可见: pC2300-35S-N-eGFP空载体在细胞核和细胞膜上均有表达, 呈绿色荧光; 细胞核Marker为红色荧光, 重组载体在细胞核上表达且其红色荧光与空载细胞核的绿色荧光重叠; 而pC2300-35S-N-MsWRKY47-eGFP融合表达载体仅在烟草表皮细

胞的细胞核上有表达,呈绿色荧光,并且其绿色荧光与细胞核Marker红色荧光重叠,结果表明

*MsWRKY47*定位于细胞核,为核蛋白。



GFP表示绿色荧光; mCherry为细胞核Marker, 呈红色荧光。

图4 *MsWRKY47*蛋白亚细胞定位结果

Fig. 4 Subcellular localization analysis result of *MsWRKY47* protein

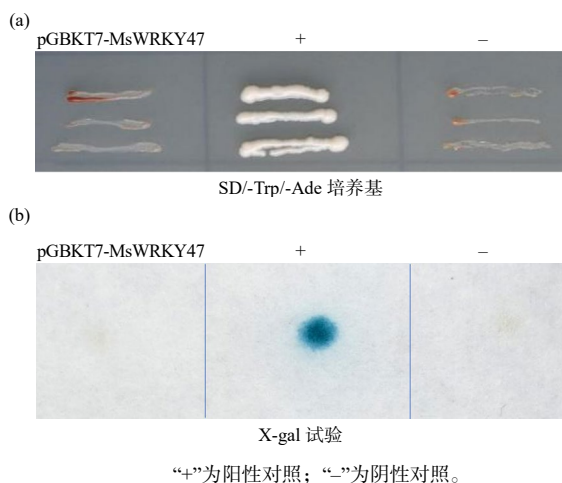
2.5 *MsWRKY47*蛋白转录激活活性分析结果

为了检测*MsWRKY47*蛋白的转录激活活性,将*MsWRKY47*的ORF序列构建到pGBKT7载体上,然后将构建好的pGBKT7-*MsWRKY47*重组质粒分别转化酵母感受态AH109和Y187, *MsWRKY47*蛋白转录激活活性分析结果如图5所示。由图5可见:转入阳性对照载体pGBKT7-p53的AH109酵母细胞在SD/-Trp-Ade培养基上能正常生长, Y187酵母细胞

在显色反应中变蓝色;而转入pGBKT7-*MsWRKY47*重组质粒和转入空载体pGBKT7-BD(阴性对照)的AH109酵母细胞不能够在SD/-Trp/-Ade平板上正常生长,且Y187酵母细胞在显色反应中不变色。这些结果说明*MsWRKY47*不具有转录激活活性。

2.6 *MsWRKY47*转基因拟南芥的耐盐性分析结果

从野生型(WT)和转入*MsWRKY47*基因的T3代纯合子拟南芥叶片中分别提取总RNA,以*AtActin*作为内参基因,通过荧光定量PCR技术检测*MsWRKY47*基因在转基因株系中的相对表达水平。结果(图6)表明,与野生型相比,过表达转基因株系中*MsWRKY47*基因的表达量显著增加(图6(a))。选择表达量较高的3个转基因株系(OE1、OE2、OE4)进行耐盐性分析。待幼苗生长4周后,对过表达*MsWRKY47*基因的拟南芥和野生型拟南芥进行盐胁迫处理。处理7 d后对其进行表型分析,结果表明:在正常条件下,各拟南芥植株的生长状况没有差异,而在NaCl处理下,各植株叶片均出现黄化现象, *MsWRKY47*过表达转基因植株的叶片黄化率显著高于WT的(图6(b))。不同浓度盐胁迫下WT和*MsWRKY47*过表达转基因株系叶片的CAT活性与MDA质量摩尔浓度测定结果显示:在正常生长条件下各个株系的CAT活性与MDA质量摩尔浓度无明显差异;盐胁迫



“+”为阳性对照;“-”为阴性对照。

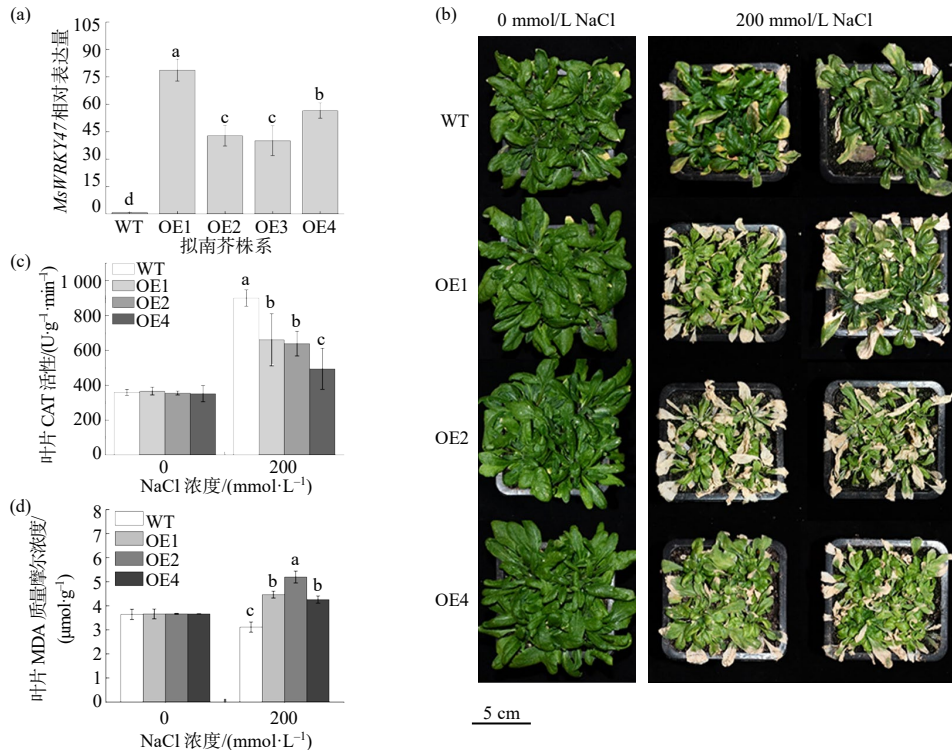
(a) 转入pGBKT7-*MsWRKY47*的酵母AH109转化子在SD/-Trp/-Ade培养基上划线培养的结果; (b) 转入pGBKT7-*MsWRKY47*的酵母Y187转化子的β-半乳糖苷酶活性测定结果

图5 *MsWRKY47*蛋白转录激活活性分析结果

Fig.5 Transcriptional activation activity analysis result of *MsWRKY47* protein

下,转基因株系CAT活性显著低于WT的(图6(c)),转基因株系叶片中的MDA质量摩尔浓度显著高于WT的(图6(d))。以上结果表明,盐处理下*MsWRKY47*

过表达转基因拟南芥受到的氧化损伤程度更为严重,说明*MsWRKY47*过表达降低了拟南芥对于盐胁迫的耐受性,*MsWRKY47*负调控拟南芥的耐盐性。



不同小写字母表示不同株系间的差异显著($P < 0.05$)。

- (a) 转基因拟南芥*MsWRKY47*的相对表达量; (b) 不同浓度盐胁迫下拟南芥的表型; (c) 不同浓度盐胁迫下拟南芥叶片的CAT活性;
(d) 不同浓度盐胁迫下拟南芥叶片的MDA质量摩尔浓度

图6 *MsWRKY47*转基因拟南芥的耐盐性分析

Fig. 6 Salt tolerance analysis of *MsWRKY47* transgenic *Arabidopsis*

3 讨论

WRKY转录因子是一类在植物中广泛存在的转录调控蛋白,它们通过调控基因表达从而参与多种生物学过程^[14]。本研究发现,*MsWRKY47*基因在不同组织中的表达量存在差异,其在根中的表达量最高,其次是茎与叶片的基部,在茎与叶片的顶部表达量较低,这可能反映了该基因在不同组织中的不同功能。根部是植物吸收水分和矿物质的主要部位,同时也是响应盐胁迫的重要器官,*MsWRKY47*在根中表达量最高,暗示其可能在盐胁迫中发挥一定作用。在盐胁迫条件下,多个WRKY基因在拟南芥中被显著诱导表达^[30]。*AtWRKY33*不仅参与病原体防御反应,还参与盐胁迫应答^[31]。*OsWRKY71*与*BnWRKY33*都在根中高表达,并且二者在盐胁迫条件下的表达量均增加^[32-33]。此外,本研究发现*MsWRKY47*基因在盐胁迫4 h和10 h后,其在叶中的

表达显著上升,这与*AtWRKY11*和*AtWRKY17*基因在面对盐胁迫时的表达量上调趋势相同,体现了这些基因作为抗逆性基因,在帮助植物应对不利环境条件方面所起的作用^[34]。以上结果表明紫花苜蓿*MsWRKY47*基因能够响应盐胁迫,推测*MsWRKY47*可能具有调控植物耐盐性的功能。

亚细胞定位结果显示*MsWRKY47*定位于细胞核;pGBKT7-*MsWRKY47*不能在SD/-Trp/-Ade上正常生长且在浸有Z-Buffer/X-gal溶液的无菌滤纸上不变色,这表明*MsWRKY47*不具有转录激活活性。有研究表明,拟南芥*AtWRKY31*与*AtWRKY61*在植物细胞中起着转录抑制因子的作用^[35-36]。序列分析结果显示,*AtWRKY31*、*AtWRKY61*与*MsWRKY47*在氨基酸序列上表现出较高的同源性,提示*MsWRKY47*与这两者可能在功能上具有相似性。因此,本文作者推测*MsWRKY47*可能作为一个转录抑制子发挥作用。

盐胁迫下植物体内的ROS大量积累,导致植物的氧化损伤程度显著增加^[37]。为了应对这种高水平的ROS及其潜在的有害影响,植物演化形成了一套高效的抗氧化酶系统。抗氧化酶系统主要包括过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)等。CAT是植物膜保护系统中的一种重要酶,在盐胁迫下,CAT能够有效清除植物体内的过氧化氢,减少氧自由基的生成,从而维持植物体内ROS的平衡,提高植物的耐盐性^[38]。ROS水平上升会引起膜脂过氧化,膜脂过氧化的一个重要产物是丙二醛(MDA),其含量可以作为衡量非生物胁迫下植物细胞损伤程度的指标^[39-40]。罗雯等^[41]研究发现盐胁迫下*PeDREB2a*和*KcERF*过表达转基因紫花苜蓿MDA含量显著低于野生型的,转基因株系与野生型相比耐盐能力明显增强。ZHU等^[42]研究发现盐胁迫下*AhWRKY75*过表达转基因株系中CAT活性显著高于野生型的,MDA含量显著低于野生型的,*AhWRKY75*基因显著提高了植株对盐的耐受性。LI等^[43]研究发现盐胁迫下*CmWRK17*过表达转基因菊花(*Chrysanthemum morifolium*)的SOD、POD活性显著低于野生型的,这使得过表达植株的耐盐性相较于野生型显著降低。YAN等^[44]研究发现*ZmWRKY104*通过调节*ZmSOD4*的表达,增加了SOD活性,从而抑制了盐诱导的超氧阴离子积累和MDA含量的增加,提高了玉米对盐胁迫的耐受性。CAI等^[45]研究发现在转基因拟南芥中过表达*ZmWRKY17*时植物对盐胁迫的耐受性显著降低,盐胁迫后转基因拟南芥的MDA含量显著高于WT的。本研究发现盐胁迫下*MsWRKY47*过表达转基因拟南芥植株的CAT活性显著低于野生型的,MDA含量显著高于野生型的,因为其ROS清除能力下降,转基因拟南芥的氧化损伤程度与WT相比更为严重,受到的细胞损伤程度更高。因此,推测*MsWRKY47*可通过调节ROS水平改变植株对盐的敏感性。

4 结论

本研究从紫花苜蓿‘WL363 HQ’中克隆得到*MsWRKY47*基因,通过花序侵染法转化拟南芥后获得过表达*MsWRKY47*基因T3代拟南芥。在盐胁迫处理后,转基因植株生长状况明显差于WT的,其CAT活性显著低于WT的,MDA含量显著高于WT的,

*MsWRKY47*过量表达植株在盐胁迫条件下表现出较差的生长状态和更高的氧化损伤程度,降低了植株对盐胁迫的耐受性。以上结果表明*MsWRKY47*在植物耐盐性调节中起负调控作用,可为后续选育耐盐的紫花苜蓿品种提供重要依据。

参考文献:

- [1] HUANG G T, MA S L, BAI L P, et al. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(2): 969–987.
- [2] ACOSTA-MOTOS J, ORTUÑO M, BERNAL-VICENTE A, et al. Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms[J]. *Agronomy*, 2017, 7(1): 18.
- [3] DEINLEIN U, STEPHAN A B, HORIE T, et al. Plant salt-tolerance mechanisms[J]. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(6): 371–379.
- [4] SADDHE A A, MISHRA A K, KUMAR K. Molecular insights into the role of plant transporters in salt stress response[J]. *Physiologia Plantarum*, 2021, 173(4): 1481–1494.
- [5] 袁祖华, 蔡雁平. 盐胁迫下嫁接黄瓜幼苗有机渗透调节物质含量及膜脂过氧化水平研究[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2007, 33(2): 180–182, 216.
- [6] WANG M, ZHANG Y, ZHU C Y, et al. *EkFLS* overexpression promotes flavonoid accumulation and abiotic stress tolerance in plant[J]. *Physiologia Plantarum*, 2021, 172(4): 1966–1982.
- [7] ARIF Y, SINGH P, SIDDIQUI H, et al. Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: an omic approach towards salt stress tolerance[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 156: 64–77.
- [8] FAN C X. Genetic mechanisms of salt stress responses in halophytes[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2020, 15(1): 1704528.
- [9] 边佳辉, 刘自扬, 李宗英, 等. 紫花苜蓿基因工程改良研究进展[J]. *草业科学*, 2020, 37(1): 139–155.
- [10] 周昕越, 蒋庆雪, 贾会丽, 等. 紫花苜蓿*MsBBX20*基因克隆及耐盐功能分析[J]. *草业学报*, 2024, 33(10): 55–73.
- [11] ZHANG L S, SUN Y D, JI J Q, et al. Flavonol synthase gene *MsFLS13* regulates saline-alkali stress tolerance in alfalfa[J]. *The Crop Journal*, 2023, 11(4): 1218–1229.
- [12] GUO W L, CHEN J X, LIU L, et al. *MsMIOX2*, encoding a *MsbZIP53*-activated myo-inositol oxygenase, enhances saline-alkali stress tolerance by regulating cell wall pectin and hemicellulose biosynthesis in alfalfa[J]. *The Plant Journal*, 2024, 120(3): 998–1013.
- [13] LIN S W, YANG J, LIU Y R, et al. *MsSPL12* is a

- positive regulator in alfalfa(*Medicago sativa* L.) salt tolerance[J]. *Plant Cell Reports*, 2024, 43(4): 101.
- [14] RUSHTON P J, SOMSSICH I E, RINGLER P, et al. WRKY transcription factors[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(5): 247–258.
- [15] 任永娟, 王东姣, 苏亚春, 等. 植物WRKY转录因子: 结构、分类、进化和功能[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(1): 105–124.
- [16] 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(16): 8625.
- [17] TIAN X J, LI X F, ZHOU W J, et al. Transcription factor OsWRKY53 positively regulates brassinosteroid signaling and plant architecture[J]. *Plant Physiology*, 2017, 175(3): 1337–1349.
- [18] 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]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(11): 1659–1673.
- [19] LAN J, LIN Q B, ZHOU C L, et al. Small grain and semi-dwarf 3, a WRKY transcription factor, negatively regulates plant height and grain size by stabilizing SLR1 expression in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2020, 104(4/5): 429–450.
- [20] GUAN Y F, MENG X Z, KHANNA R, et al. Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in *Arabidopsis*[J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(5): e1004384.
- [21] ZHANG X Q, ZHANG Y X, LI M, et al. Overexpression of the WRKY transcription factor gene NtWRKY65 enhances salt tolerance in tobacco(*Nicotiana tabacum*)[J]. *BMC Plant Biology*, 2024, 24(1): 326.
- [22] BO C, CAI R H, FANG X, et al. Transcription factor ZmWRKY20 interacts with ZmWRKY115 to repress expression of *ZmbZIP111* for salt tolerance in maize[J]. *The Plant Journal*, 2022, 111(6): 1660–1675.
- [23] LI M L, XUE M, MA H Y, et al. Wild soybean(*Glycine soja*) transcription factor GsWRKY40 plays positive roles in plant salt tolerance[J]. *The Crop Journal*, 2024, 12(3): 766–775.
- [24] YU Y A, WU Y X, HE L Y. A wheat WRKY transcription factor *TaWRKY17* enhances tolerance to salt stress in transgenic *Arabidopsis* and wheat plant[J]. *Plant Molecular Biology*, 2023, 113(4/5): 171–191.
- [25] SHANG C Y, LIU X Y, CHEN G, et al. SIWRKY81 regulates Spd synthesis and Na⁺/K⁺ homeostasis through interaction with SIJAZ1 mediated JA pathway to improve tomato saline-alkali resistance[J]. *The Plant Journal*, 2024, 118(6): 1774–1792.
- [26] 王如月, 文武武, 赵恩华, 等. 紫花苜蓿*MsWRKY11*基因的克隆及其耐盐功能分析[J]. *草业学报*, 2021, 30(11): 157–169.
- [27] MA L, LI X, ZHANG J J, et al. MsWRKY33 increases alfalfa(*Medicago sativa* L.) salt stress tolerance through altering the ROS scavenger via activating *MsERF5* transcription[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2023, 46(12): 3887–3901.
- [28] LI X B, FAN X P, WANG X L, et al. The cotton *ACTIN1* gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(3): 859–875.
- [29] 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- [30] JIANG Y Q, DEYHOLOS M K. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes[J]. *BMC Plant Biology*, 2006, 6: 25.
- [31] SCARPECI T E, ZANOR M I, MUELLER-ROEBER B, et al. Overexpression of *AtWRKY30* enhances abiotic stress tolerance during early growth stages in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2013, 83(3): 265–277.
- [32] LIU X Q, BAI X Q, WANG X J, et al. OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164(8): 969–979.
- [33] DIQIU YU C C. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression[J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(7): 1527–1539.
- [34] ALI M A, AZEEM F, NAWAZ M A, et al. Transcription factors WRKY11 and WRKY17 are involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2018, 226: 12–21.
- [35] 王艺桥, 赵新杰, 牛芳芳, 等. 拟南芥中WRKY31转录因子的转录活性与互作蛋白分析[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(5): 101–109.
- [36] 范晓江, 郭小华, 牛芳芳, 等. 拟南芥WRKY61转录因子的转录活性与互作蛋白分析[J]. *西北植物学报*, 2018, 38(1): 1–8.
- [37] HASEGAWA P M, BRESSAN R A, ZHU J K, et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2000, 51: 463–499.
- [38] SHU K, QI Y, CHEN F, et al. Salt stress represses soybean seed germination by negatively regulating GA biosynthesis while positively mediating ABA biosynthesis[J].

- Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1372.
- [39] 石新建, 王彦芹, 李志军. 盐胁迫对花柴种子萌发与幼苗生理生化特性的影响[J]. 草业科学, 2017, 34(9): 1855–1862.
- [40] 曹辉, 于晓英, 邱收, 等. 盐胁迫对萱草生长及其相关生理特性的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2007, 33(6): 690–693.
- [41] 罗雯, 孙占敏, 边佳辉, 等. 转*PeDREB2a*和*KcERF*基因紫花苜蓿的表型及抗旱耐盐性[J]. 草业科学, 2023, 40(3): 732–739.
- [42] ZHU H, JIANG Y N, GUO Y, et al. A novel salt inducible WRKY transcription factor gene, *AhWRKY75*, confers salt tolerance in transgenic peanut[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 160: 175–183.
- [43] LI P, SONG A, GAO C, et al. Chrysanthemum WRKY gene *CmWRKY17* negatively regulates salt stress tolerance in transgenic chrysanthemum and Arabidopsis plants[J]. Plant Cell Rep, 2015, 34(8): 1365–1378.
- [44] YAN J W, LI J, ZHANG H P, et al. ZmWRKY104 positively regulates salt tolerance by modulating *ZmSOD4* expression in maize[J]. The Crop Journal, 2022, 10(2): 555–564.
- [45] CAI R, DAI W, ZHANG C, et al. The maize WRKY transcription factor ZmWRKY17 negatively regulates salt stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. Planta, 2017, 246(6): 1215–1231.

责任编辑: 伍锦花

英文编辑: 张承平

(上接第 14 页)

- [19] 张晓波, 林连男, 张国财, 等. 中华散尾鬼笔提取物对灰葡萄孢霉菌的作用机制[J]. 吉林农业大学学报, 2019, 41(2): 161–167.
- [20] 陈乾丽, 李忠, 汪汉成, 等. 烤后不同霉变程度烟叶际真菌群落组成与多样性分析[J]. 微生物学报, 2019, 59(12): 2401–2409.
- [21] 雷声, 杨乾栩, 师艳萍, 等. 成品卷烟霉变微生物的分离纯化与鉴定[J]. 食品与机械, 2019, 35(9): 98–101.
- [22] 张鸽, 郜晓妍, 李青常, 等. 云南雪茄烟叶晾制过程高风险霉变环节判别及主要霉菌鉴定[J]. 中国烟草科学, 2024, 45(6): 108–115.
- [23] 朱贝贝, 黄阔, 薛芳, 等. 手工雪茄主要霉菌的分离鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国烟草学报, 2023, 29(6): 93–101.
- [24] 王馨慧. 基于近红外光谱技术的片烟霉变预测模型研究[D]. 郑州: 中国烟草总公司郑州烟草研究院, 2024.
- [25] 卢灿华, 苏家恩, 盖晓彤, 等. 烤烟霉变病原菌鉴定及其生防菌筛选[J]. 中国烟草科学, 2022, 43(2): 45–51.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 罗维