

## 研究论文

丝瓜 *LcWRKY21* 转录因子基因的克隆与表达分析

刘建汀 朱海生\* 温庆放\* 王彬 张前荣 陈敏敏 林琿 薛珠政

(福建省农业科学院作物研究所, 福建省农业科学院蔬菜研究中心, 福建省蔬菜工程技术研究中心, 福州 350013)

**摘要** 采用RT-PCR和RACE技术从普通丝瓜果肉中分离到1条长达1 809 bp的cDNA, 并对其序列进行分析。结果表明, 该序列包含1个1 044 bp的开放读码框(open reading frame, ORF); 预测编码347个氨基酸, 理论分子量为38.61 kDa, 等电点为9.46; 编码蛋白质与甜瓜(*Cucumis melo*)和黄瓜(*Cucumis sativus*)同源蛋白的相似性达到84%以上, 具有高度的保守性, 基因命名为*LcWRKY21*。Wolf Psort预测其亚细胞定位于细胞核(nucleus)内。Motif Scan分析显示, *LcWRKY21*蛋白质的氨基酸序列274~340位、279~339位和325~337位分别为WRKY保守结构域、DNA结合结构域及锌指结构域序列。同源性分析表明, 丝瓜*LcWRKY21*的锌指结构为C2H2型, 属于第II类WRKY蛋白质家族。荧光定量PCR(Real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)分析显示, *LcWRKY21*具有组织表达特异性, 在普通丝瓜品种“福丝2号”果实中表达量最高, 其次为根和茎, 在叶片和花中的表达量较低。*LcWRKY21*基因在6个丝瓜品种中的表达水平具有品种差异性, 在易褐变普通丝瓜品种“福丝2号”中的表达量最高, 其次为普通丝瓜“福丝3号”和“福丝4号”, 在有棱丝瓜“福丝5号”、“福丝6号”和不易褐变的普通丝瓜品种“福丝1号”中的表达量较低。分析发现, *LcWRKY21*在“福丝2号”不同成熟时期中的表达量呈先上调后下调的趋势, 在授粉后35 d的表达丰度达到最高。此外, *LcWRKY21*在普通丝瓜品种“福丝2号”的表达水平呈先上调后下调的趋势, 鲜切后3 h时表达量达到最高, 随后出现下调。初步推测, 转录因子*LcWRKY21*基因在丝瓜果肉褐变过程中起着一定的调控作用。

**关键词** 丝瓜; *LcWRKY21*; 转录因子; 基因克隆; 表达分析

## Cloning and Expression Analysis of Transcription Factor *LcWRKY21* Gene from *Luffa cylindrical*

Liu Jianting, Zhu Haisheng\*, Wen Qingfang\*, Wang Bin, Zhang Qianrong, Chen Mindong, Lin Hui, Xue Zhuzheng  
(Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences; Vegetable Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences; Fujian Engineering Research Center for Vegetables, Fuzhou 350013, China)

**Abstract** A length of 1 809 bp cDNA was isolated from *Luffa cylindrical* by rapid amplification of cDNA ends (RACE) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques, which contained a 1 044 bp open reading frame (ORF) that encoded 347 amino acids, with a predicted molecular weight of 38.61 kDa and a hypothetical isoelectric point of 9.46. It shared over 84% identity with the homologous proteins from *Cucumis melo*

收稿日期: 2017-07-05 接受日期: 2017-08-16

福建省属公益类科研院所基本科研专项(批准号: 2017R1026-3)、福建省农业科学院青年人才创新基金(批准号: 2015QC-6)、福建省农业科学院创新团队PI项目(批准号: 2016PI-40)和国家大宗蔬菜产业体系福州试验站(批准号: CARS-25-G-20)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13809542070, E-mail: zhs0246@163.com; Tel: 13805062692, E-mail: fjvrc@163.com

Received: July 5, 2017 Accepted: August 16, 2017

This work was supported by Fujian Provincial Public Research Institute of Fundamental Research (Grant No.2017R1026-3), Young Talent Innovation Fund of Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.2015QC-6), Project of Innovative Team in Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.2016PI-40) and the Experimental Station of Fuzhou of China Commodity Vegetable Industry System (Grant No.CARS-25-G-20)

\*Corresponding authors. Tel: +86-13809542070, E-mail: zhs0246@163.com; Tel: +86-13805062692, E-mail: fjvrc@163.com

网络出版时间: 2017-09-18 17:30:11 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170918.1730.006.html>

and *Cucumis sativus*, proving that it was highly conservative. The acquired gene was named *LcWRKY21*. Wolf Psort protection indicated that *LcWRKY21* protein was located in the nucleus, and Motif Scan analysis showed that *LcWRKY21* protein had the domains of conserved WRKY, DNA binding and zinc finger in the position of 274-340, 279-399 and 325-337 sites, respectively. Homology analysis suggested that *LcWRKY21* protein was a member of the WRKY group II transcription factors. The Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) revealed that *LcWRKY21* exhibited a tissue specific expression, and the expression level in *Luffa* 'Fusi-2' fruits was the highest, following by roots and stems, and the expression levels of flowers and leaves were lower. The levels of *LcWRKY21* were different among six *Luffa* varieties, and the expression in browning sensitive *Luffa cylindrical* cultivar 'Fusi-2' was higher than that in 'Fusi-3', 'Fusi-4' and *Luffa acutangula* Roxb ('Fusi-5' and 'Fusi-6') and browning resistance *Luffa cylindrical* cultivar 'Fusi-1'. The expression level of *LcWRKY21* gene in different mature period of 'Fusi-2' was up-regulated from the day after pollination of 7 d to 35 d, then decreased. Furthermore, the relative expression level of *LcWRKY21* in 'Fusi-2' was up-regulated during fresh-cut browning processes, suggesting that *LcWRKY21* gene may play a regulatory role in *Luffa* browning process.

**Keywords** *Luffa*; *LcWRKY21*; transcription factor; gene cloning; expression analysis

WRKY是存在于植物中的一类非常重要的转录因子,能够调控生物和非生物胁迫应答、衰老、生长发育及激素控制等多种植物进程<sup>[1-7]</sup>。WRKY基因家族成员在N-端含有WRKYGQK的高度保守序列,C-端含有C2H2或C2HC的锌指结构(其通式为CX<sub>4-7</sub>CX<sub>22-28</sub>HX<sub>1-2</sub>H/C,其中X位任意氨基酸),属于锌指类转录因子,通过结合靶基因启动子中核心序列为(C/T)TGACC(A/T)的W-box,激活或抑制下游基因的表达<sup>[8-9]</sup>。根据WRKY的结构数目和特点,WRKY转录因子可分为三类,其中I类含有两个WRKY保守结构域,II类只有一个WRKY结构域,两者其锌指结构均为C2H2型(CX<sub>4-5</sub>CX<sub>22-23</sub>HX<sub>1</sub>H),III类都只含有一个WRKY结构域,但其锌指结构为C2HC型(CX<sub>7</sub>CX<sub>23</sub>HX<sub>1</sub>C)<sup>[10]</sup>。在各类WRKY基因家族中,第I类最为保守,是最原始的WRKY类型,第II类较为保守,第III类进化最为活跃<sup>[8,11]</sup>。目前,从植物中分离到的WRKY类转录因子大多都定位于细胞核中<sup>[12]</sup>。

丝瓜为葫芦科丝瓜属一年生攀缘性草本植物,分为有棱丝瓜(*Luffa acutangula*)和普通丝瓜(*Luffa cylindrical*)两个栽培品种,主要种植于热带、亚热带和温带地区,在我国各地均有大面积栽培,是我国主要的瓜类蔬菜之一<sup>[13-14]</sup>。普通丝瓜在其运输、储藏和烹饪等过程及鲜切后容易引起果肉褐变,降低其贮藏加工性能和感官品质,并造成巨大的经济损失,因此,对于丝瓜褐变产生机理以及控制褐变发生的研究具有重要理论和实际意义<sup>[15-16]</sup>。研究表明,WRKY转录因子广泛参与了植物的发育成熟

和各种胁迫反应过程<sup>[17-19]</sup>。科研工作者已从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大豆(*Glycine max*)、水稻(*Oryza sativa*)、辣椒(*Capsicum annuum*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)和甜瓜(*Cucumis melo*)等多种植物中克隆得到WRKY转录因子基因<sup>[20-25]</sup>。目前,关于丝瓜WRKY转录因子相关的研究还未见报道。课题组在前期田间育种过程中发现,普通丝瓜品种“福丝2号”容易产生褐变现象,本研究中选其作为研究材料,采用cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)和RT-PCR技术从其果肉中克隆获得*LcWRKY21*转录因子基因,并对*LcWRKY21*的序列特征和基因表达模式进行分析,以期初步了解*LcWRKY21*在丝瓜果肉褐变过程中所起的调控作用,为今后丝瓜优良品种的选育以及褐变形成分子机理的研究提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与处理

丝瓜于2016年3月15日育苗,4月26日定植到大棚内,株距40 cm,行距60 cm。田间选取表面完整、大小均一的丝瓜(商品期,授粉后18 d左右)果实,选取果实中部作为试验材料。采集“福丝2号”同一时期的根部、茎部、叶片和果实作为丝瓜不同组织试验材料;选取“福丝1号”(不易褐变)、“福丝2号”(易褐变)、“福丝3号”(易褐变)、“福丝4号”(常规种)普通丝瓜以及有棱丝瓜品种“福丝5号”和“福丝6号”的商品期果实作为不同丝瓜品种试验材料;采集(上午

9时)“福丝2号”授粉后7、14、21、28、25、42 d果实作为不同成熟时期试验材料;以商品期“福丝2号”鲜切果实为不同处理试验材料,鲜切(厚0.6 cm左右)后恒温条件下(25°C±1 °C)放置0、1、3、6、12、24 h,分别采样。样品采集进行3次独立重复,液氮速冻后于-80 °C超低温冰箱中保存,用于后续qPCR试验。

## 1.2 仪器和试剂

实时荧光定量PCR仪(ABI 7500)购自美国ABI公司。通用植物总RNA提取试剂盒购自北京百泰克公司。RNA逆转录试剂盒(PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit)、DNA扩增试剂盒(Synthesis Kit)、PrimerSTAR HS DNA聚合酶、Taq DNA聚合酶、dNTPs、DNA marker(DL 2000)、qPCR试剂盒SYBR® Premix EX Taq™ II均购自TaKaRa公司。其他生化试剂均为国产分析纯级。

## 1.3 丝瓜WRKY基因PCR扩增

采用百泰克试剂盒提取“福丝2号”丝瓜果肉总RNA,利用课题组设计的AP序列:5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(T)<sub>17</sub>-3'作为逆转录引物,并逆转录合成cDNA第1链。

根据NCBI中其他同源物种WRKY基因的保守序列设计一对简并引物,上游引物S1:5'-GDG CMA TAB TGG CAT TNA CKT BA-3',下游引物S2:5'-GTW CNC CTH CAT ATN TAA CAV TGA G-3'。

根据*LcWRKY21*保守区克隆测序结果,设计3'端上游引物*LcWRKY21*-F2,引物序列为:5'-AGT GCA GCA GCA TGA GAG GTT G-3',与通用引物AUAP:5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'配对,进行PCR扩增,并对扩增产物进行测序。

依据测序得到的*LcWRKY21*保守区域序列,设计基因5'端的R2和R3下游引物,引物序列R2:5'-CTA GCT GCA CAC AAC ACA CAA TGT C-3'和R3:5'-GTG GAA GTA CTG GGA GAT GTC AC-3'。以TaKaRa公司的PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒为基础,以R2为引物逆转录合成基因的cDNA第1链,并在加尾后的基础上进行cDNA第2链合成。R3与通用引物AUAP配对,进行PCR扩增。PCR扩增产物经纯化和克隆后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,对基因保守区、5'和3'序列进行拼接得到*LcWRKY21*全长序列。

根据获得的*LcWRKY21*基因cDNA全长,设计ORF正向引物*LcWRKY21*-F和反向引物*LcWRKY21*-R,

进行*LcWRKY21*基因cDNA的ORF克隆,验证已获得的序列。两个引物序列如下。*LcWRKY21*-Fq:5'-CAG AA TAC CTT CTC AAT CTG CAA ATA CTT GA-3';*LcWRKY21*-Rq:5'-TCA AGT ATT TGC AGA TTG AGA AGG TAT TCT G-3'。

## 1.4 基因生物信息学分析

基因生物信息学分析所使用到的软件主要有:DNAMAN V6软件,EditSeq 5.01软件,序列处理在线工具包(SMS)(<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>),多序列比对和进化树的构建采用Clustal W2软件和MEGA 4.0软件,基因保守结构域分析采用在线软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>),基因保守结构分析采用在线GSDS软件(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>),保守结构域分析采用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>),蛋白质的一级结构分析采用ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)和ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>)软件,蛋白质翻译后修饰MotifScan([http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)),蛋白质信号肽分析采用SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>),蛋白质跨膜分析采用TMHMM Server v. 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>),蛋白质二级结构分析采用在线软件CFSPSP(<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>),蛋白质三级结构分析采用在线软件SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>),亚细胞定位分析采用Wolf Psort Prediction软件([http://www.genscript.com/psort/wolf\\_psort.html](http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html))。

## 1.5 基因引物设计与定量分析

利用在线软件OligoAnalyzer 3.1,设计出1对具有特异性的qPCR引物(Mg<sup>2+</sup>浓度为2 mmol/L)。上游引物*LcWRKY21*-Fq:5'-CTC CAG ATG ATT ATT CAT GGA GG-3',下游引物*LcWRKY21*-Rq:5'-GTT CAA GTA TTT GCA GAT TGA GAA G-3'。提取1.1中所有丝瓜样品的总RNA,以逆转录形成cDNA第一链作为模板,并采用*Lc18S* rRNA作为内参基因<sup>[14]</sup>。按照TaKaRa公司的荧光定量试剂盒SYBR® Premix Ex Taq™说明书,配制25 μL qPCR反应体系:4 μL cDNA模板,10 μL SYBR® Premix,0.4 μL正向引物*LcWRKY21*-Fq(10 μmol/L),0.4 μL反向引物*LcWRKY21*-Rq(10 μmol/L),0.4 μL Rox,加ddH<sub>2</sub>O至25 μL,并在qPCR仪(ABI 7500)上进行扩增。PCR反

应条件为: 95 °C预变性30 s, 95 °C变性5 s, 58 °C退火34 s; 反应循环数为40。qPCR实验重复3次操作。在Excel软件中采用 $2^{-44Ct}$ 法处理数据、作图和分析丝瓜*LcWRKY21*基因的表达情况。

### 1.6 丝瓜总酚含量和过氧化氢酶活性的测定

丝瓜总酚含量的测定参考Dewanto等<sup>[26]</sup>的方法进行。过氧化氢酶活性的测定参考温庆放等<sup>[15]</sup>的方法进行。

## 2 结果

### 2.1 丝瓜*WRKY*基因克隆

研究利用简并引物对丝瓜*WRKY*基因保守区域进行扩增得到1条485 bp、特异且明亮的条带(图1)。3'和5'端RACE扩增所得序列的实际大小分别为462 bp和997 bp(图1)。根据基因保守区序列、3'和5'端RACE序列, 拼接得到丝瓜*WRKY*全长序列。经BLASTn检索证实, 其为丝瓜*WRKY*的3'端和5'端序列。

设计丝瓜*WRKY*基因ORF引物, 经测序, 扩增丝瓜*WRKY*基因ORF序列的长度为1 044 bp(图1)。BLASTn分析结果表明, 所获序列为丝瓜*WRKY*保守区域序列, 基因命名为*LcWRKY21*。

### 2.2 基因生物信息学分析

**2.2.1 *LcWRKY21*基因编码蛋白质的一级结构** 序列分析发现, *LcWRKY21*含一个长达1 044 bp的ORF(图2), 其编码区的GC含量为44.92%, 预测编码347个AA, 理论分子量(Mw)为38.61 kDa, 等电点为9.46, pH为7.0时的带电荷数为21.36。在构成*LcWRKY21*蛋白的20种氨基酸中, 丝氨酸(Ser)含量最高(14.7%), 丙氨酸(Ala)次之(8.4%), 色氨酸(Trp)含量最低(0.3%)。分析发现, *LcWRKY21*蛋白质包含84个疏水氨基酸、120个极性氨基酸、46个碱性氨基酸和

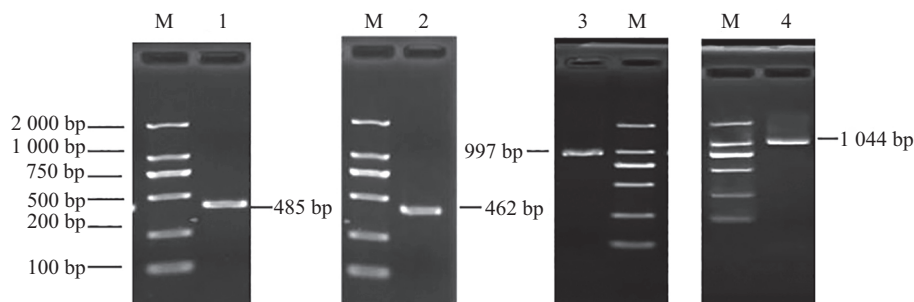
27个酸性氨基酸。*LcWRKY21*蛋白质的总平均疏水性(GRAVY)为-0.699, 蛋白质不稳定系数(instability index, II)为64.38, 脂肪族指数(aliphatic index, AI)为64.32, 预测为亲水性蛋白质。

**2.2.2 *LcWRKY*蛋白质翻译后修饰、结构域及亚细胞定位分析** Motif Scan在线软件分析显示, *LcWRKY21*基因编码的蛋白质包含有一个保守的WRKY结构域(274~340位, E值为 $1.8e^{-23}$ ), 279~339位为WRKY蛋白质DNA结合区域, 锌指结构域(325~337位)为C2H2型, 属于典型的第II类WRKY蛋白超家族。分析发现, 59~64、177~182、206~211、220~225和242~247位为N-豆蔻酰化位点; 26~29和165~168位为酪蛋白激酶II磷酸化位点; 194~196、236~238、243~245、249~251、255~257、265~267、272~274、284~286和307~309位为蛋白激酶C磷酸化位点; 76~79和163~166位为N糖基化位点。

TMHMM显示, *LcWRKY21*属于非跨膜蛋白质, 不含跨膜螺旋区。SignalP分析发现, *LcWRKY21*蛋白质不含信号肽序列。利用Wolf Psort在线对蛋白质亚细胞定位预测表明, *LcWRKY21*转录因子位于细胞核(nucleus)中。

**2.2.3 *LcWRKY21*蛋白质的二级、三级结构分析** 丝瓜*LcWRKY21*蛋白质的二级结构分析(CFSSP)表明, 随机卷曲是最大量的结构元件, 所占比例为54.88%, 其次为 $\alpha$ 螺旋和延伸链, 分别占24.19%和20.93%, *LcWRKY21*中没有发现 $\beta$ 转角的存在。利用SWISS-MODEL对*LcWRKY21*蛋白质的三级结构进行在线预测, 结果如图3所示。

**2.2.4 *LcWRKY21*蛋白质的同源比对与进化分析** 对丝瓜*LcWRKY21*基因编码蛋白质同源性分析表明, *LcWRKY21*与甜瓜*CmWRKY21*(*Cucumis melo*,



M: DL2000 marker; 1: 保守区扩增产物; 2: 3' RACE产物; 3: 5' RACE产物; 4: ORF扩增产物。

M: DL2000 marker; 1: conserved region; 2: 3' RACE; 3: 5' RACE; 4: ORF PCR amplified.

图1 普通丝瓜*LcWRKY21*基因PCR扩增产物

Fig.1 PCR amplified product of *LcWRKY21* gene in *Luffa cylindrical*



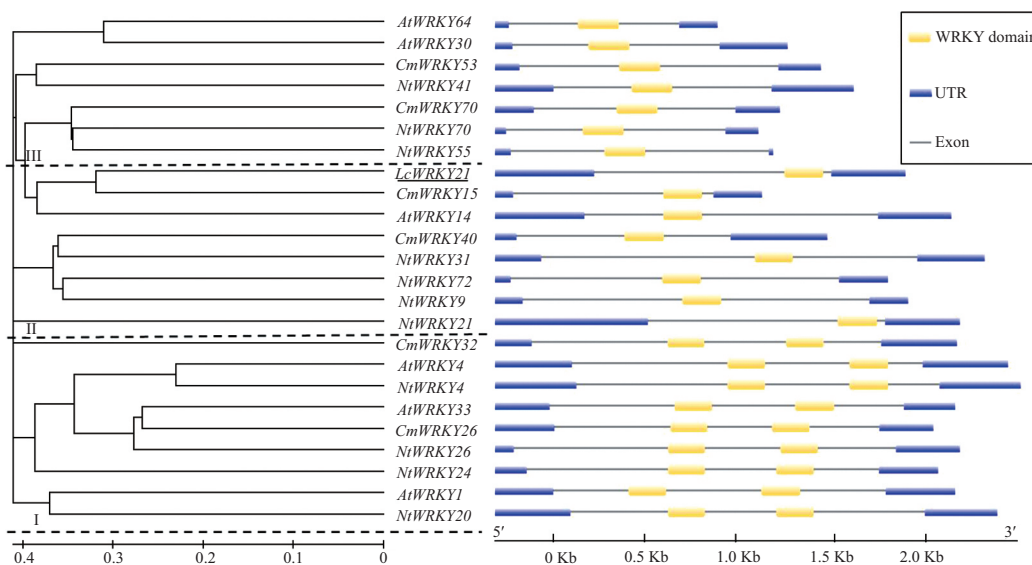


下划线部分为WRKY保守结构域, 星号部分为保守的WRKYGQK序列, 箭头部分为锌指结构C2H2。

The underlined part represent for WRKY conserved domain, the conserved sequence WRKYGQK and zinc finger of C2H2 weremarked by asterisks and arrows, respectively.

图4 *LcWRKY21*与其他物种中的同源蛋白质的多重序列比对

Fig.4 Multiple sequence alignment of *LcWRKY21* with other homologous sequences



进化树由MEGA4.0软件绘制。黄色代表WRKY保守结构域, 细线代表外显子, 蓝色代表编码上下游的非编码区。

The phylogenetic tree was generated using MEGA4.0 program. The WRKY conserved domains were represented by yellow boxes, the exons were represented by lines, and upstream/downstream untranslated regions were represented by blue boxes.

图5 丝瓜 *LcWRKY21* 的系统进化和结构分析

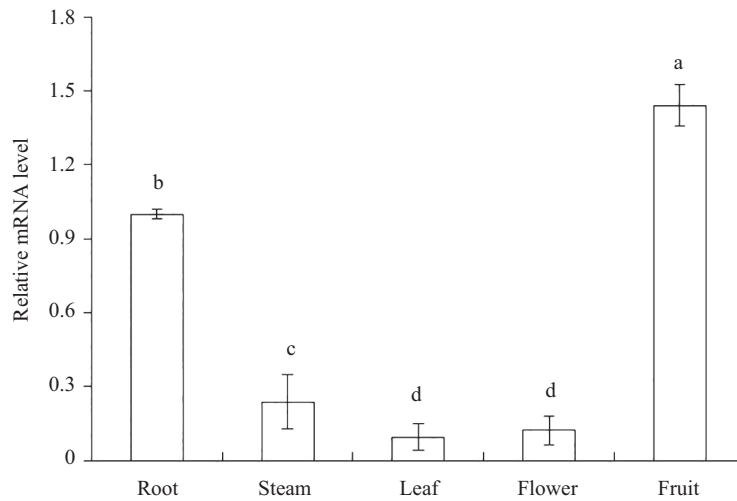
Fig.5 Structure and phylogenetic analysis of *LcWRKY21*

录因子家族<sup>[10]</sup>。

### 2.3 *LcWRKY21* 基因表达分析

#### 2.3.1 不同丝瓜组织 定量PCR分析结果表明, 丝

瓜 *LcWRKY21* 基因在“福丝2号”的根、茎、叶、花和果实中均有表达, 其中, 果实的表达丰度最高, 其次为根、茎和花, 在叶片中的表达量最低, *LcWRKY21*

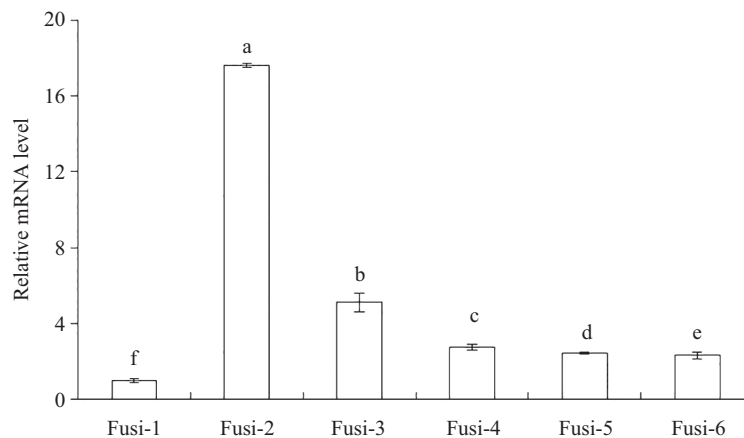


内参基因: *18S rRNA*。不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Reference gene: *18S rRNA*. Different small letters indicate significant difference at 0.05 level.

图6 *LcWRKY21*在“福丝2号”丝瓜不同组织中的表达

Fig.6 *LcWRKY21* mRNA level of *Luffa* in different tissues of 'Fusi-2'



不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Different small letters indicate significant difference at 0.05 level.

图7 *LcWRKY21*在6个商品期丝瓜果实品种中的表达

Fig.7 *LcWRKY21* mRNA level in different cultivars of *Luffa cylindrica* and *L. acutangula* fruits from commodity period

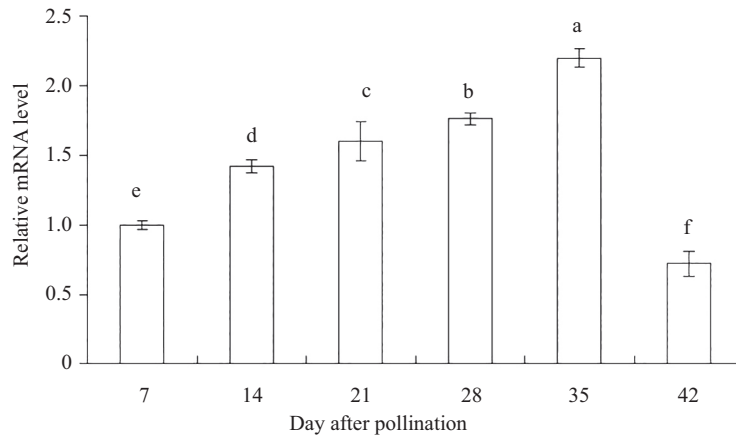
基因表达呈现一定的组织特异性(图6)。

2.3.2 不同丝瓜品种 *LcWRKY21*在6个不同丝瓜品种(商品期果实)中的定量分析表明,基因在普通丝瓜“福丝2号”品种内表达水平最高,是其余5个品种表达量的3~10倍,其次为“福丝3号”和“福丝4号”,在有棱丝瓜“福丝5号”和“福丝6号”及不易褐变品种“福丝1号”内的表达量较低(图7)。分析发现,*LcWRKY21*基因在“福丝2号”品种(易褐变)的表达水平明显高于“福丝1号”品种(不易褐变),且差异达到了极显著。

2.3.3 不同成熟时期 丝瓜“福丝2号”的商品采收期为授粉后18 d左右,采收期过后的果实逐渐

衰老,果肉组织形成木栓化。定量PCR分析发现,*LcWRKY21*在不同成熟时期的丝瓜品种“福丝2号”中差异表达,其中,授粉后7~35 d的表达量逐渐上调,随后表达下调,提示*LcWRKY21*可能在丝瓜果实成熟过程中起着一定的调控作用(图8)。

2.3.4 鲜切丝瓜 常温条件下,“福丝2号”丝瓜果肉鲜切后容易产生褐变现象,体内总酚含量逐渐积累(图9),果肉中过氧化氢酶活性逐渐增强(图10),两者的变化趋势较为一致。研究对“福丝2号”鲜切丝瓜的定量分析表明,*LcWRKY21*在处理后的表达水平均高于采收当时(0 h),0~3 h呈现上调趋势,3 h时的表达量达到最高,3~24 h出现逐渐下调的趋势(图11)。

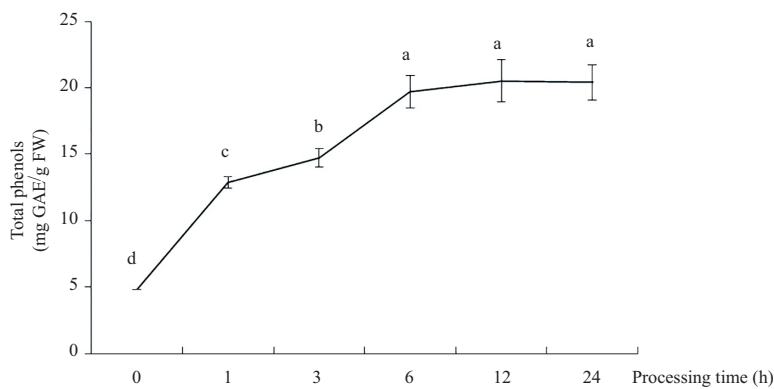


不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Different small letters indicate significant difference at 0.05 level.

图8 丝瓜不同成熟时期中*LcWRKY21*的表达

Fig.8 *LcWRKY21* mRNA level in different mature period of *Luffa* 'Fusi-2'

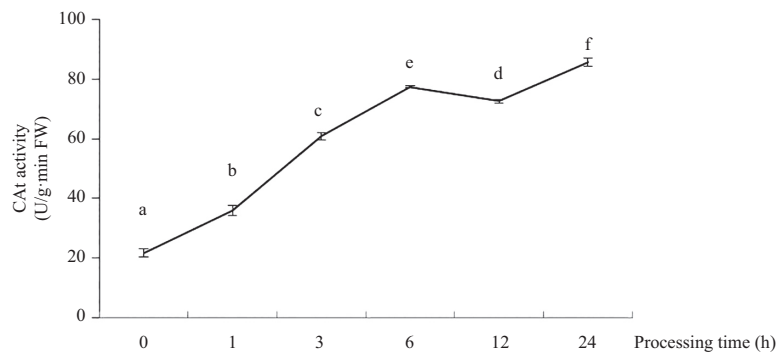


不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Different small letters indicate significant difference at 0.05 level.

图9 丝瓜不同鲜切时间下的总酚含量变化

Fig.9 The changes of total phenols content from *Luffa* in different fresh-cut time



不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Different small letters indicate significant difference at 0.05 level.

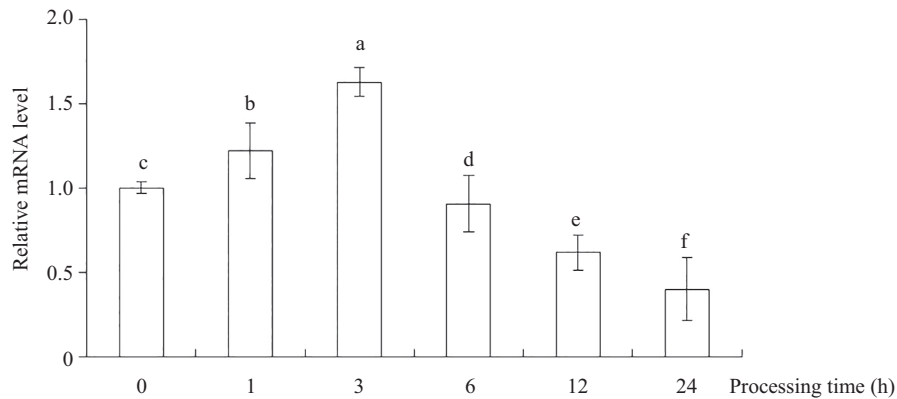
图10 在不同鲜切时间下的过氧化氢酶活性变化

Fig.10 The changes of CAT activities in different fresh-cut time

### 3 讨论

近年来, 科研工作者从多种植物中克隆和分离得到了不同WRKY转录因子基因家族成员, 但鲜见丝

瓜中WRKY基因的克隆和分析的报道。Yang等<sup>[27]</sup>利用RACE和RT-PCR技术从长春花中克隆得到受MeJA诱导上调表达的*CrWRKY1*基因。Mao等<sup>[28]</sup>利用RACE



不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Different small letters indicate significant difference at 0.05 level.

图11 丝瓜*LcWRKY21*在鲜切处理下的定量PCR分析

Fig.11 *LcWRKY21* of *Luffa* under fresh-cut treatments were analysed by qPCR

和RT-PCR技术克隆获得了受镰孢菌诱导表达的4个*CqWRKY*基因的全长cDNA。本研究利用RACE和RT-PCR技术,从丝瓜果肉中克隆得到*LcWRKY21*转录因子基因,分析发现,*LcWRKY21*的ORF全长为1 044 bp,预测编码347个氨基酸。蛋白同源性分析显示,丝瓜*LcWRKY21*基因编码的WRKY蛋白与甜瓜(*Cucumis melo*)和黄瓜(*Cucumis sativus*)同源蛋白质的相似性均在84%以上,具有高度的保守性,将基因命名为*LcWRKY21*。Wolf Psort预测*LcWRKY21*亚细胞定位于细胞核中。蛋白质进化分析表明,*LcWRKY21*只含一个WRKY保守结构域,与拟南芥、烟草和甜瓜第II类WRKY蛋白质家族的亲缘关系较近。此外, Motif Scan分析显示, *LcWRKY21*编码的蛋白包含WRKY保守结构域(274~340位)、WRKY蛋白质DNA结合区域(279~339位)和C2H2(C<sub>x</sub>S<sub>x</sub>C<sub>23</sub>H<sub>x</sub>H)型锌指(325~337位)3个保守结构域,属于第II类WRKY转录因子家族<sup>[9-10]</sup>。

研究表明,目前鉴定到的植物WRKY转录因子大多表现出组织特异性且可受胁迫诱导表达<sup>[29-34]</sup>。本研究对*LcWRKY21*基因在“福丝2号”不同组织中的研究发现,其具有组织表达特异性,*LcWRKY21*在丝瓜果实中的表达量显著高于其他组织,在叶片和花中的相对表达量较低。对*LcWRKY21*基因在不同丝瓜品种果实的定量分析发现,*LcWRKY21*的表达还存在品种差异性,在易褐变的丝瓜品种中的表达水平高于不同褐变的丝瓜品种,在“福丝2号”、“福丝3号”、“福丝4号”中的表达量显著高于“福丝5号”、“福丝6号”和“福丝1号”。此外,对“福丝2号”普通丝瓜不同成熟时期的表达分析发现,*LcWRKY21*基因

在其果实不同成熟时期的表达呈先上调、后下调的趋势,暗示丝瓜*LcWRKY21*基因在其果实发育成熟过程中起着一定的调控作用<sup>[35-36]</sup>。目前,国内外关于果蔬WRKY基因褐变相关基因克隆的研究报道极少。姜翠翠<sup>[37]</sup>对木奈(*Prunus salicina* L.)的研究发现,*PsWRKY*转录因子基因在木奈褐变果实中的表达水平显著高于正常果实。前期研究表明,普通丝瓜在鲜切后常温条件下放置,果肉细胞呼吸作用产生过剩的活性氧类(reactive oxygen species, ROS)而导致膜脂质过氧化而使其细胞膜产生破裂,酚类物质、酶和氧气三者发生反应并产生褐变,褐变果肉中的氧化还原酶的活性和总酚含量显著升高<sup>[15,38]</sup>。研究表明,WRKY转录因子对于植物氧化胁迫条件下的响应具有重要的调控作用,能够激活氧化还原酶基因的表达,从而提高相关酶的活性,并在一定程度上有效地清除胁迫产生的ROS<sup>[39-43]</sup>。Dan等<sup>[40]</sup>对番茄的研究发现,*SlWRKY75*基因在其组织受氧化胁迫发生褐变时显著上调表达,但随着体内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的降低,*SlWRKY75*的表达也呈下调表达。本研究对*LcWRKY21*在丝瓜“福丝2号”不同鲜切褐变时间的qPCR分析表明,*LcWRKY21*基因在果实鲜切后0~3 h内的表达量显著上调,并在3 h的表达量达到最高,随后在3~24 h内出现下调表达趋势;丝瓜鲜切后果肉中的过氧化氢酶活性得到有效增强,伴随褐变的产生,果肉中的总酚含量逐渐增加,两者变化趋势较为一致,在0~6 h内逐渐增加,6~24 h含量变化达到相对平衡的状态。初步推测,*LcWRKY21*基因可能参与了鲜切丝瓜果肉褐变过程,并对ROS的平衡起着一定的调控作用。由于对其作用机理还不清楚,需对

*LcWRKY21*蛋白质作进一步的分析 and 功能鉴定, 从而为丝瓜优良品种的选育提供科学依据, 也为今后丝瓜褐变调控分子机理的研究奠定基础。

### 参考文献 (References)

- 1 Robatzek S, Somssich IE. A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J* 2001; 28(2): 123-33.
- 2 Pandey SP, Somssich IE. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol* 2009; 150(4): 1648-55.
- 3 Niu CF, Wei W, Zhou QY, Tian AG, Hao YJ, Zhang WK, *et al.* Wheat WRKY genes TaWRKY2 and TaWRKY19 regulate abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Environ* 2012; 35(6): 1156-70.
- 4 Yu F, Huaxia Y, Lu W, Wu C, Cao X, Guo X. GhWRKY15, a member of the WRKY transcription factor family identified from cotton (*Gossypium hirsutum* L.), is involved in disease resistance and plant development. *BMC Plant Biol* 2012; 12(1): 144.
- 5 Zhang L, Gu L, Ringler P, Smith S, Rushton PJ, Shen QJ. Three WRKY transcription factors additively repress abscisic acid and gibberellin signaling in aleurone cells. *Plant Sci* 2015; 236: 214-22.
- 6 Nuruzzaman M, Cao H, Xiu H, Luo T, Li J, Chen X, *et al.* Transcriptomics-based identification of WRKY genes and characterization of a salt and hormone-responsive PgWRKY1 gene in *Panax ginseng*. *Acta Bioch Bioph Sin* 2016; 48(2): 117-31.
- 7 Ning P, Liu C, Kang J, Lv J. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in wheat (*Triticum aestivum* L.) and differential expression under water deficit condition. *Peer J* 2017; 5: e3232.
- 8 Ulker B, Somssich IE. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol* 2004; 7(5): 494-8.
- 9 Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ. WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci* 2010; 15(5): 247-58.
- 10 Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 2000; 5(5): 1360-85.
- 11 Xie Z, Zhang ZL, Zou XL, Huang J, Ruas P, Thompson D, *et al.* Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiol* 2005; 137: 176-89.
- 12 Jiang Y, Deyholos MK. Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *Plant Mol Biol* 2009; 69(1/2): 91-105.
- 13 颜国纲, 郑振佳, 时新刚, 葛长军. 丝瓜的营养价值及其综合利用研究进展. *中国果菜*(Yan Guogang, Zheng Zhenjia, Shi Xingang, Ge Changjun. Towel gourd nutrition value and its comprehensive utilization. *China Fruit Vegetable*) 2011; 7: 35-6.
- 14 朱海生, 陈敏敏, 温庆放, 蓝新隆, 李永平, 王彬, 等. 丝瓜 18S rRNA 基因克隆及其作为内参基因的应用. *核农学报* (Zhu Haisheng, Chen Mindong, Wen Qingfang, Lan Xinlong, Li Yongping, Wang Bin, *et al.* Cloning of 18S rRNA gene from *Luffa cylindrical* and its application as an internal standard. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*) 2016; 30(1): 35-41.
- 15 温庆放, 刘建汀, 朱海生, 陈敏敏, 王彬, 张前荣. 丝瓜过氧化氢酶基因CAT1的克隆及表达分析. *园艺学报*(Wen Qingfang, Liu Jianting, Zhu Haisheng, Chen Mindong, Wang Bin, Zhang Qianrong. Cloning and expression analysis of catalase CAT1 gene from *Luffa cylindrical*. *Acta Horticulturae Sinica*) 2016; 43(10): 2039-48.
- 16 Bustos MC, Mazzobre MF, Buera MP. Stabilization of refrigerated avocado pulp: effect of *Allium* and *Brassica* extracts on enzymatic browning. *LWT-Food Sci Technol* 2015; 61(1): 89-97.
- 17 Chen L, Song, Y, Li S, Zhang L, Zou C, Yu D. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *BBA-Gen Regul Mech* 2012; 1819(2): 120-8.
- 18 Zhou QY, Tian AG, Zou HF, Xie ZM, Lei G, Huang J, *et al.* Soybean WRKY-type transcription factor genes, GmWRKY13, GmWRKY21, and GmWRKY54, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Biotechnol J* 2008; 6(5): 486-503.
- 19 Ramamoorthy R, Jiang SY, Kumar N, Venkatesh PN, Ramachandran S. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant Cell Physiol* 2008; 49(6): 865-79.
- 20 Dong J, Chen C, Chen Z. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol* 2003; 51(1): 21-37.
- 21 Zhang ZL, Xie Z, Zou X, Casaretto J, Ho TH, Shen QJ. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiol* 2004; 134(4): 1500-13.
- 22 Kang SG, Park EH, Do KS. Identification of a pathogen-induced glycine max transcription factor GmWRKY1. *J Gen Plant Pathol* 2009; 25(4): 381-8.
- 23 Dang FF, Wang YN, Yu LU, Eulgem T, Lai YAN, Liu ZQ, *et al.* CaWRKY40, a WRKY protein of pepper, plays an important role in the regulation of tolerance to heat stress and resistance to *Ralstonia solanacearum* infection. *Plant Cell Environ* 2013; 36(4): 757-74.
- 24 Chen L, Yang Y, Liu C, Zheng Y, Xu M, Wu N, *et al.* Characterization of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum* reveals collinearity and their expression patterns under cold treatment. *Biochem Bioph Res Commun* 2015; 464(3): 962-8.
- 25 Celik Altunoglu Y, Baloglu MC, Baloglu P, Yer EN, Kara S. Genome-wide identification and comparative expression analysis of LEA genes in watermelon and melon genomes. *Physiol Mol Biol Plants* 2017; 23(1): 5-21.
- 26 Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2002; 50(10): 3010-4.
- 27 Yang Z, Patra B, Li R, Pattanaik S, Yuan L. Promoter analysis reveals cis-regulatory motifs associated with the expression of the WRKY transcription factor CrWRKY1 in *Catharanthus roseus*. *Planta* 2013; 238(6): 1039-49.
- 28 Mao Y, Jiang B, Peng Q, Liu W, Lin Y, Xie D, *et al.* Cloning and characterization of WRKY gene homologs in Chieh-qua (*Benincasa hispida* Cogn. var. Chieh-qua How) and their expression in response to fusaric acid treatment. *3 Biotech* 2017; 7(1): 86.
- 29 Kalde M, Barth M, Somssich IE, Lippok B. Members of the Arabidopsis WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Mol Plant Microbe Interact* 2003; 16(4): 295-305.

- 30 Park CJ, Kim SK, Lee BJ, Kim KJ, Paek KH. A hot pepper gene encoding WRKY transcription factor is induced during hypersensitive response to *Tobacco mosaic virus* and *Xanthomonas campestris*. *Planta* 2006; 223(2): 168-79.
- 31 Guo R, Yu F, Gao Z, An H, Cao X, Guo X. GhWRKY3, a novel cotton (*Gossypium hirsutum* L.) WRKY gene, is involved in diverse stress responses. *Mol Biol Rep* 2011; 38(1): 49-58.
- 32 Nuruzzaman M, Sharoni AM, Satoh K, Kumar A, Leung H, Kikuchi S. Comparative transcriptome profiles of the *WRKY* gene family under control, hormone-treated, and drought conditions in near-isogenic rice lines reveal differential, tissue specific gene activation. *J Plant Physiol* 2014; 171(1): 2-13.
- 33 Song H, Wang P, Hou L, Zhao S, Zhao C, Xia H, *et al.* Global analysis of WRKY genes and their response to dehydration and salt stress in soybean. *Front Plant Sci* 2016; 7: 9.
- 34 Wu SR, Gao K, Liu X, Xu J, Wei JH, Sui C. Identification of WRKY transcription factors related to saikosaponin biosynthesis in adventitious roots of *bupleurum chinense*. *Chin Herb Med* 2017; 9(2): 153-60.
- 35 Zou C, Jiang W, Yu D. Male gametophyte-specific WRKY34 transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2010; erq204.
- 36 Yan L, Liu ZQ, Xu YH, Lu K, Wang XF, Zhang DP. Auto- and cross-repression of three *Arabidopsis* WRKY transcription factors WRKY18, WRKY40, and WRKY60 negatively involved in ABA signaling. *J Plant Growth Regul* 2013; 32(2): 399-416.
- 37 姜翠翠. 木奈均一化全长cDNA文库的构建及果实褐变相关基因的分离与表达分析(博士论文). 福建农林大学(Jiang Cuicui. Construction of normalized full-length cDNA library from Nai browning fruit. Fujian Agriculture and Forestry University), 2012.
- 38 Shi W, Liu D, Hao L, Wu CA, Guo X, Li H. GhWRKY39, a member of the WRKY transcription factor family in cotton, has a positive role in disease resistance and salt stress tolerance. *PCTOC* 2014; 118(1): 17-32.
- 39 Eulgem T, Somssich IE. Networks of WRKY transcription factors in defense signalling. *Curr Opin Plant Biol* 2007; 10: 366-71.
- 40 Dan Y, Zhang S, Matherly A. Regulation of hydrogen peroxide accumulation and death of *Agrobacterium*-transformed cells in tomato transformation. *PCTOC* 2016; 127(1): 229-36.
- 41 Adachi H, Nakano T, Miyagawa N, Ishihama N, Yoshioka M, Katou Y, *et al.* WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 2015; 27(9): 2645-63.
- 42 Liu X, Song Y, Xing F, Wang N, Wen F, Zhu C. GhWRKY25, a group I WRKY gene from cotton, confers differential tolerance to abiotic and biotic stresses in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Protoplasma* 2016; 253(5): 1265-81.
- 43 Liu QL, Xu KD, Pan YZ, Jiang BB, Liu GL, Jia Y, *et al.* Functional analysis of a novel chrysanthemum WRKY transcription factor gene involved in salt tolerance. *Plant Mol Biol Rep* 2014; 32(1): 282.