

紫花苜蓿盐胁迫响应WRKY转录因子的克隆及表达特征分析

董蔚, 鄢培祥, 杨宁, 刘锡江, 宋玉光*

曲阜师范大学生命科学院, 山东曲阜273165

摘要: WRKY转录因子在植物生长发育及逆境胁迫应答中发挥着核心调控作用,但在紫花苜蓿中的相关研究还鲜有报道。通过对紫花苜蓿盐胁迫转录组测序数据分析,筛选了12个盐诱导或抑制的WRKY家族转录因子并结合其近缘物种的参考序列成功对它们的全长编码序列进行了克隆。获得的目标基因均含有WRKY家族核心保守序列且分布在WRKY家族的不同系统进化分支;它们的表达呈现出明显的组织特异性且均具有转录激活活性。进一步对它们在盐胁迫不同时间下的表达模式进行了分析,结果表明*MsWRKY1/3*等10个基因受到了盐胁迫诱导,但表达模式表现出多样性,*MsWRKY2*的表达受到盐胁迫抑制,*MsWRKY11*的表达在对照及盐胁迫下并没有显著变化。本研究将为深入了解WRKY家族转录因子在紫花苜蓿盐胁迫应答中的调控机制以及牧草作物的遗传育种等方面提供重要的基因资源。

关键词: 紫花苜蓿; 盐胁迫; WRKY; 表达模式

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是一种全球性栽培的豆科苜蓿属多年生草本植物,素有“牧草之王”的美称(张立全等2012)。其属于中等耐盐植物,盐胁迫下产量和品质均受到显著影响。高盐胁迫首先会对其产生离子平衡的破坏、渗透胁迫和矿质营养的缺失等原初伤害,而后进一步造成过氧化胁迫、离子毒害、光合作用效率降低和代谢发生紊乱等次生伤害,最终衰老加速,导致植物死亡(包爱科等2011)。与其他植物相似,紫花苜蓿的盐胁迫响应亦主要存在以下几种途径:维持渗透调节和离子平衡;提高抗氧化能力,保持细胞膜结构和功能的稳定性;诱导并启动盐胁迫响应相关信号转导通路,提高光合作用、呼吸作用、激素合成等物质代谢能力和信号转导水平(王隼珍等2017)。

在植物的生长发育和胁迫应答过程中,转录因子起着核心调控作用。WRKY家族是一类植物特有的转录因子,参与了植物转录调控和许多信号转导过程(Rushton等2010)。WRKY家族成员通常含有长约60个氨基酸序列的保守区域,该区域含有保守的WRKYGQK七肽序列和紧随其后的保守锌指基序(zinc finger motif),所以简称为WRKY。研究发现,WRKY结构域C末端主要存在两种不同类型的保守锌指基序,即C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X-H(C₂H₂)和C-X₅₋₈-C-X₂₅₋₂₈-H-X₁₋₂-C(C₂HC)。根据WRKY结构域的数量和保守锌指基序的类型,一般将WRKY蛋白分为3种类型,即含有2个WRKY结构域的I型、含有1个WRKY结构域和C₂H₂基序

的II型和含有1个WRKY结构域和1个C₂HC基序的III型(Eulgem等2000;宋辉和南志标2014)。

研究证实,WRKY转录因子几乎参与了诸如干旱、盐胁迫、温度、氧化等所有的非生物胁迫应答过程,并且不断有其新的成员被鉴定且功能得到证实(史书婷等2017)。例如:拟南芥AtWRKY57可通过提高ABA水平来增强其抗旱性(Jiang等2012);而拟南芥AtWRKY11和AtWRKY17的功能缺失会导致其盐敏感性增强(Ali等2018);在拟南芥中过表达大豆*GmWRKY13*、*GmWRKY21*和*GmWRKY54*基因后均可提高转基因植株对ABA的敏感性及抗旱性(Zhou等2008)。目前,WRKY转录因子参与紫花苜蓿盐胁迫应答的研究还鲜有报道,因此本研究通过对实验室已有盐胁迫下紫花苜蓿的转录组数据进行分析,筛选盐胁迫响应WRKY家族转录因子,进一步克隆并分析其进化、表达等特征,研究结果对拓展植物的耐盐调控理论,紫花苜蓿耐盐种质的基因工程改造等方面均具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 植物材料

选取饱满均一的紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.,

收稿 2018-07-09 修订 2018-09-04

资助 山东省自然科学基金(ZR2015JL012)、国家自然科学基金(31300220, 31501328)、中国博士后基金(2014M550366)和曲阜师范大学校级科研基金(XKJ201320)。

* 通讯作者(SYG-0423@163.com)。

品种为‘旱地’)种子, 散铺于两层滤纸培养皿中, 用蒸馏水浸润催芽, 待胚根长至1 cm左右时, 将其转移至10 cm×10 cm的盆中水培。所用营养液为改良的1/2Hoagland营养液, 每天更换一次。培养条件为光照培养16 h, 暗培养8 h, 光强为300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的饱和光, 昼夜温度25/20°C, 相对湿度55%。14 d后, 将上述材料分成2组, 一组设置为对照, 另一组培养液中添加NaCl使其终浓度为200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分别选取对照及盐处理1、3、12、24 h植物材料的根, 液氮冷冻后, -80°C保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 紫花苜蓿盐胁迫响应WRKY转录因子的筛选与克隆

紫花苜蓿盐胁迫响应WRKY转录因子的预测使用iTAK软件(itak.feilab.net), 主要参照Zheng等(2016)的方法, 简要描述为: 根据转录因子数据库中定义好的TF (transcription factor) family及规则, 利用HMM scan分别将对照及200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理1、24 h紫花苜蓿拼接好的转录组Reads进行预测

分析, 筛选出具有WRKY家族保守序列的Reads。将上述预测得到Reads先采用TMM (Trimmed Mean of M Values)法对read count数据进行标准化处理, 再用DEGseq进行差异分析, 筛选出差异的序列, 筛选阈值为 $q\text{-value}<0.005$ 且 $|\log_2\text{FoldChange}|>1$ 。由于紫花苜蓿目前没有参考基因组序列, 因此在对上述差异表达WRKY转录因子在紫花苜蓿中的克隆时, 首先将每个基因在转录组测序中获得的基因片段与紫花苜蓿的近缘有参物种(蒺藜苜蓿)的基因组序列进行BLAST比对分析, 获得其同源基因, 根据同源基因CDS序列设计引物(引物见表1)。

1.2.2 保守结构域及进化树分析

通过SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)和Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/search>)对上述差异表达基因的全长CDS序列进行功能域预测; ProtParam (<http://web.expasy.org/prot-param/>)计算该基因编码蛋白的等电点和分子量。利用Clustal X软件进行氨基酸序列比对; 采用MEME4.11.1 (Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation)在线

表1 基因克隆及qRT-PCR引物

Table 1 Primers for cloning of genes and qRT-PCR

引物用途	目的基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
基因克隆	<i>MsWRKY1</i>	ATGGAGTGC AATTCTGGGAGAT	TTAATTGGTATTGTC ACTATTATCACCAC
	<i>MsWRKY2</i>	ATGATGGAGAAAAAGGTTTGAATATG	CTACTCCTCCTTGAACATATGTGAAGG
	<i>MsWRKY3</i>	ATGGTTGGAGGTGGAATGGA	TTATATATGCTCTTCCTTCAATCTTAGATG
	<i>MsWRKY4</i>	ATGGCTATTAGAATGGATGAAAAGG	TCACTCCTCCGAAAGATTCAAATC
	<i>MsWRKY5</i>	ATGGATAGCCAAGACCCACCA	TTACAAGCTAGCAAGAACTGTATTTGC
	<i>MsWRKY6</i>	ATGGAGAATGAATGTA ACTGGGAGC	TTAGGAGAAAAAGCCTGGAGTATTG
	<i>MsWRKY7</i>	ATGGAATCAACATGCGTGGATA	TCACCACTTGGCCTTATTAGAAGTAT
	<i>MsWRKY8</i>	ATGGGAGATTCAAAGA ACTTAATAGATAA	TTAAGAGAAAAATCGTGAGTTGTGG
	<i>MsWRKY9</i>	ATGAAAAATGAAAATCTAGCTCATGG	TCAAGAAAGAGGCCAATTAAGGA
	<i>MsWRKY10</i>	ATGAGTGTATTTTACCTGAAACTGTCA	TTACCTTGGGAAATTAGAATTGAGG
	<i>MsWRKY11</i>	ATGGAGAATATGCTGTGGCTTCC	TTAAAAAGATTCACTCGATGATGACTC
	<i>MsWRKY12</i>	ATGGTTGGAGGTGGAATGGA	TTATATATGCTCTTCCTTCAATCTTAGATG
qRT-PCR	<i>MsWRKY1</i>	GAATGATGGATGCCAATGGAGAA	AGTGGAAGGCTGTGGTTGTGTG
	<i>MsWRKY2</i>	GATCTTCCCTAGCTACTCATTTCC	TTTCCATTCCCATCACTCTCCAA
	<i>MsWRKY3</i>	GAAGAAAAACAGAAGCCAACTCCT	CGCCATCTATATCCATCCTCCAA
	<i>MsWRKY4</i>	ACAGTTTGGCTATGGAAGGCACA	CGAGATTTAGACCTTGTGCGCTTATG
	<i>MsWRKY5</i>	ACAACAACACTTCTCTCCCTTC	TAATGTCTCCTTAGCATCCCCAAC
	<i>MsWRKY6</i>	GAAAAACGATTCCTTCTTGAGCAGTCT	TGTATTGGTGGAAATGATCTCCGTAA
	<i>MsWRKY7</i>	CACCAAACACAACAATCAAGAAAGA	TCATCAGTAAACAGTGCTGCACTCAT
	<i>MsWRKY8</i>	AAGGTCCTCTTGATGATGGGTATAGT	GTGTGGTTTCTCGGATGTGATT
	<i>MsWRKY9</i>	CTACTTCTGAGGGCTCTGATTTGC	GCCATACTTTCTCCATTGATGACCA
	<i>MsWRKY10</i>	TGCCAACAAAAAGAAGCTACTCATAA	AGAAGGAGACCCATCAGAAACAAACA
	<i>MsWRKY11</i>	ATGAAGGAGGAGGATTTGGGTG	GGTACAACGAAGGGTTCTTTTGTATT
	<i>MsWRKY12</i>	TCAAGAGAAGAAAAACAGAAGCCA	CGCCATCTATATCCATCCTCCAAAG
<i>Ms-Actin2</i>	CAAAAGATGGCAGATGCTGAGGAT	CATGACACCAGTATGACGAGGTGC	

软件(<http://meme-suite.org/tools/>)对WRKY蛋白潜在基序进行分析。利用MEGA6.0软件包中的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树, 校验参数Bootstrap重复1 000次。

1.2.3 qRT-PCR分析

将上述1.1中-80°C保存的材料, 液氮充分研磨后, 根据植物基因组RNA提取试剂盒(TaKaRa)的方法提取基因组RNA。采用反转录试剂盒(Invitrogen)对RNA样品进行反转录合成cDNA, 以反转录后的cDNA为模板, 紫花苜蓿*Actin2*基因(GenBank: JQ028730.1)为内参对目标基因的表达进行qRT-PCR分析(引物序列见表1)。PCR反应体系(15 μ L): ddH₂O 5.5 μ L, 正向引物(10 μ mol·L⁻¹) 0.5 μ L, 反向引物(10 μ mol·L⁻¹) 0.5 μ L, 模板cDNA 1.0 μ L, SYBR Premix ExTaqTM (2 \times) 7.5 μ L。反应条件为95°C预变性1 min; 95°C变性10 s, 60°C退火15 s, 72°C延伸15 s, 80°C收集荧光值, 循环40次; 65~95°C, 每隔0.5°C作溶解曲线。利用比较C_T方法(2^{- $\Delta\Delta$ C_T}方法)分析表达量(Liva和Schmittgen 2001)。实验进行3次生物学重复, 采用SPSS单因子方差分析程序分析实时荧光定量结果, 用Tukey法进行多重比较(徐明飞等2015)。

1.2.4 转录激活活性分析

为确定上述WRKY转录因子的转录活性, 分别将它们的全长编码序列扩增并克隆到pGBKT7载体中构建与BD (binding domain)翻译融合的效应重组质粒pGBKT7-*MsWRKY*, 然后转化到酵母菌株AH109 (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*, *MEL1*)。空白pGBKT7 (BD)空载体为对照。均匀涂于SD/-Trp单缺陷平板上, 结合菌落PCR筛选阳性转化子; 将筛选出的阳性转化子接入YPDA培养基摇菌培养2~3 d后, 均匀涂在SD/-Trp/-His/-Ade三缺陷平板上培养, 观察转化子的生长情况, 对它们的转录激活活性进行分析。

2 实验结果

2.1 紫花苜蓿盐胁迫响应WRKY家族转录因子的筛选与克隆

前期通过对紫花苜蓿对照(0 h)及盐胁迫处理1、24 h样品进行转录组测序, 分别获得了40 872 344、

53 288 058和58 609 528个测序片段, 参照Zheng等(2016)的方法对这些测序片段进行预测分析, 共获得含有WRKY核心保守基序转录因子154个。进一步对这些转录因子在对照及盐胁迫处理下的差异表达情况进行分析, 发现盐胁迫下12个基因与对照相比明显上调或下调。对上述目标基因在紫花苜蓿中进行克隆, 最终获得了它们的全长CDS序列(依次命名为: *MsWRKY1~12*, Genbank号依次为: MH744491~MH744502)。对每个基因CDS序列编码的多肽长度、等电点及分子量进行分析, 发现它们编码的肽链长度在219 (*MsWRKY5*)到616 (*MsWRKY1*)个氨基酸范围(图1), 分子量在25.1 kDa (*MsWRKY5*)到67.2 kDa (*MsWRKY1*)范围, 等电点(pI)在5.12 (*MsWRKY6*)到8.85 (*MsWRKY5*)之间。

2.2 保守序列及进化树分析

利用MEME软件对上述12个目标转录因子氨基酸序列进行分析, 发现它们均存在WRKY家族基因保守的WRKYGQK七肽序列和紧随其后的保守锌指基序C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X-H (C₂H₂)或C-X₅₋₈-C-X₂₅₋₂₈-H-X₁₋₂-C (C₂HC)。根据编码序列含有WRKY结构域和两种不同类型的保守锌指基序的数量, 可将该家族蛋白分为三种类型: 含有2个WRKY结构域的I型(*MsWRKY3/12*), 含有1个WRKY结构域和1个C₂H₂基序的II型(*MsWRKY1/2/4/5/7/10*)以及含有1个WRKY结构域和1个C₂HC基序的III型(*MsWRKY6/8/9/11*) (图1)。利用Clustal X和MEGA6.0软件将上述转录因子基因与拟南芥WRKY转录因子进行系统进化树分析, 结果发现上述12个转录因子分布在5个亚类中, 其中*MsWRKY3/12*同源性较高, 为WRKY家族的I型; *MsWRKY1/2/4/5/7/10*虽然同属II型, 但是它们分布在了GroupIIa/b/c三个亚类中; 其他(*MsWRKY6/8/9/11*)分布在了III型的系统进化分支上(图2)。

2.3 盐胁迫处理下的表达模式分析

对上述12个WRKY家族转录因子在对照(0 h)及盐胁迫1、3、12、24 h紫花苜蓿中的表达模式分析发现, 在盐处理早期(1、3 h)至晚期(12、24 h)它们的表达模式呈现出多样性的特点。大体可分为以下几类: (1)在盐胁迫早期诱导表达, 如*MsWRKY4/5/7*, 其中*MsWRKY4*和*MsWRKY7*均在盐胁迫1、3 h明显上调表达, 而*MsWRKY5*仅在1 h后上调表达, 在其他处理下表达变化并不显著(图3); (2)在盐胁迫



图1 紫花苜蓿盐胁迫响应WRKY家族转录因子保守序列比对分析

Fig.1 Analysis of conservative sequence of WRKY transcription factors involved in salinity stress in alfalfa

黑框标记为WRKY家族转录因子的保守的WRKYQK七肽序列, 黑色实线标记的为保守锌指基序C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X-H (C₂H₂), 黑色虚线标记为保守锌指基序C-X₅₋₈-C-X₂₅₋₂₈-H-X₁₋₂-C (C₂HC)。

后期诱导表达, 如MsWRKY1/8均在盐胁迫24 h后才明显上调表达; (3)盐胁迫1~24 h均上调表达, 如MsWRKY3/6/12在盐胁迫1 h后便明显上调表达, 且表达水平随着处理时间的延长, 逐渐上升(MsWRKY6)或保持不变(MsWRKY3/12); (4)表达先上调再下调, 如MsWRKY9/10, 其中MsWRKY9在盐胁迫1 h后便上调表达并维持至12 h, 而24 h后表达水平恢复至对照水平, MsWRKY10则在盐处理3 h后逐渐上调表达, 12 h后表达水平最高, 24 h后表达下降; (5)盐胁迫下表达逐渐下调, 如MsWRKY2; (6)对照及盐胁迫下表达无显著差异, 如MsWRKY11 (图3)。

2.4 组织特异性表达及转录活性分析

通过对上述转录因子在紫花苜蓿根、茎、叶、花、角果中的组织特异性表达进行分析, 发现MsWRKY1/9的表达主要集中在叶中; MsWRKY2/8主要在茎和叶中表达; MsWRKY3/6/12在根中特异表达; MsWRKY4/11分别在花和角果以及叶和角果中具有较高的表达水平; MsWRKY5/7在根、茎和叶中均有富集表达; MsWRKY10在叶和花中均具有较高的表达水平(图4-A)。这些转录因子表达部位的差异性, 暗示了它们在植物生长发育中功能的多样性。为进一步确定这些转录因子有无转录活性,

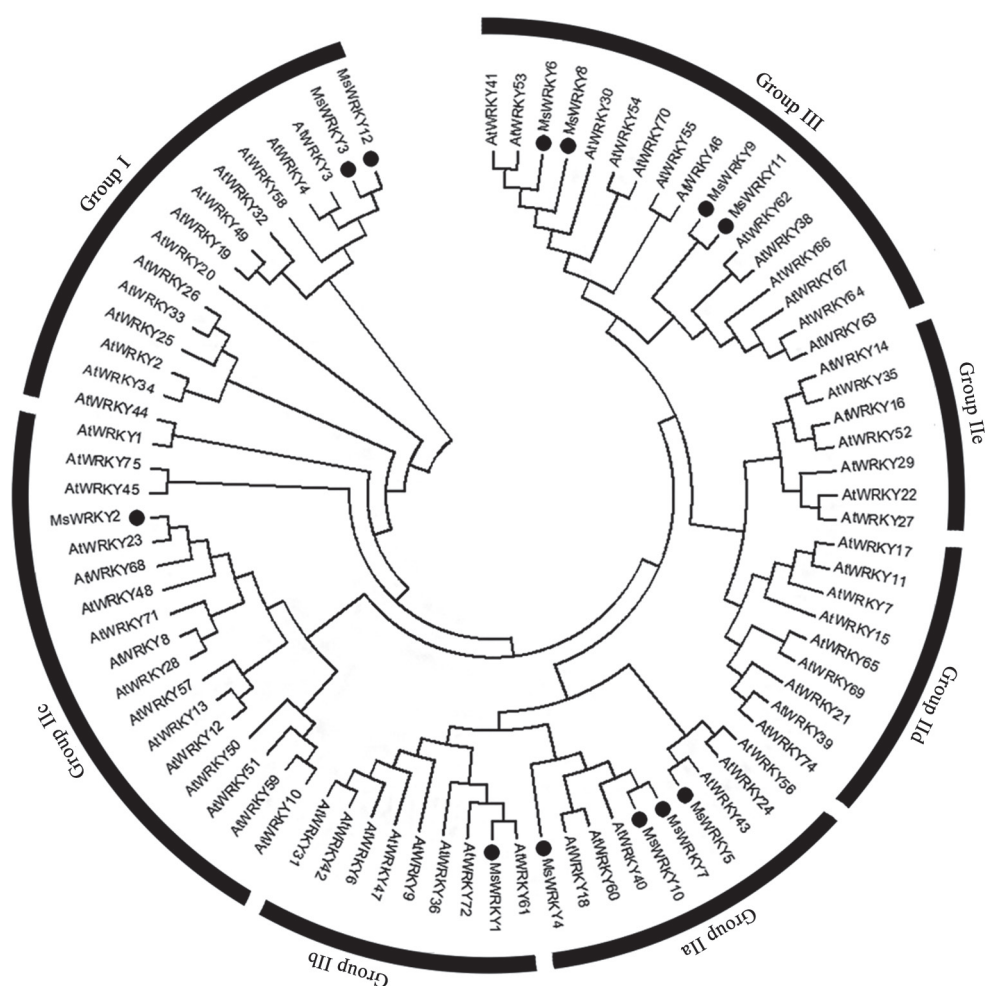


图2 紫花苜蓿盐胁迫响应WRKY家族转录因子系统进化分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of MsWRKYs involved in salinity stress in alfalfa

黑点标识的为紫花苜蓿WRKY转录因子。MsWRKY1~12的GenBank号依次为MH744491~MH744502。

又进一步对其转录激活活性进行了分析, 构建pGBKT7-*MsWRKY*酵母表达重组质粒, 分别将pGBKT7-*MsWRKY*、pGBKT7 (阴性对照)、pGBKT7-P53 (阳性对照)转入酵母菌株中。三者酵母单缺培养基SD/-Trp中均能够正常生长。转入pGBKT7-P53和pGBKT7-*MsWRKY*的酵母菌株可以在缺陷型酵母培养基SD/-Trp-His-Ade中生长, 而阴性对照无法生长, 表明这些转录因子均具有转录激活活性(图4-B)。

3 讨论

WRKY转录因子是高等植物特有的一类转录调控因子, 也是植物生命活动中不可或缺的调控枢纽, 其参与了植物生长发育及多种生物与非生

物逆境响应过程(史书婷等2017)。目前, 在拟南芥(Ali等2018)、棉花(Liu等2016)、水稻(Jiang等2016)、大豆(Zhou等2008)等物种中, 多个WRKY家族转录因子在非生物胁迫响应中的作用已被证实。在本研究中, 我们通过对紫花苜蓿对照及盐处理转录组数据进行分析, 利用iTAK软件等方法预测并筛选到了12个受盐诱导或抑制的WRKY家族转录因子并成功对它们的全长编码序列进行了克隆。序列分析发现它们均具有WRKY家族基因核心保守序列(图1), 证明了我们的预测筛选方法的可靠性。

通过序列比对及系统进化分析, 发现筛选到的12个WRKY转录因子中, MsWRKY3和MsWRKY12同源性最高, 分布在了I型WRKY家族(含有2个

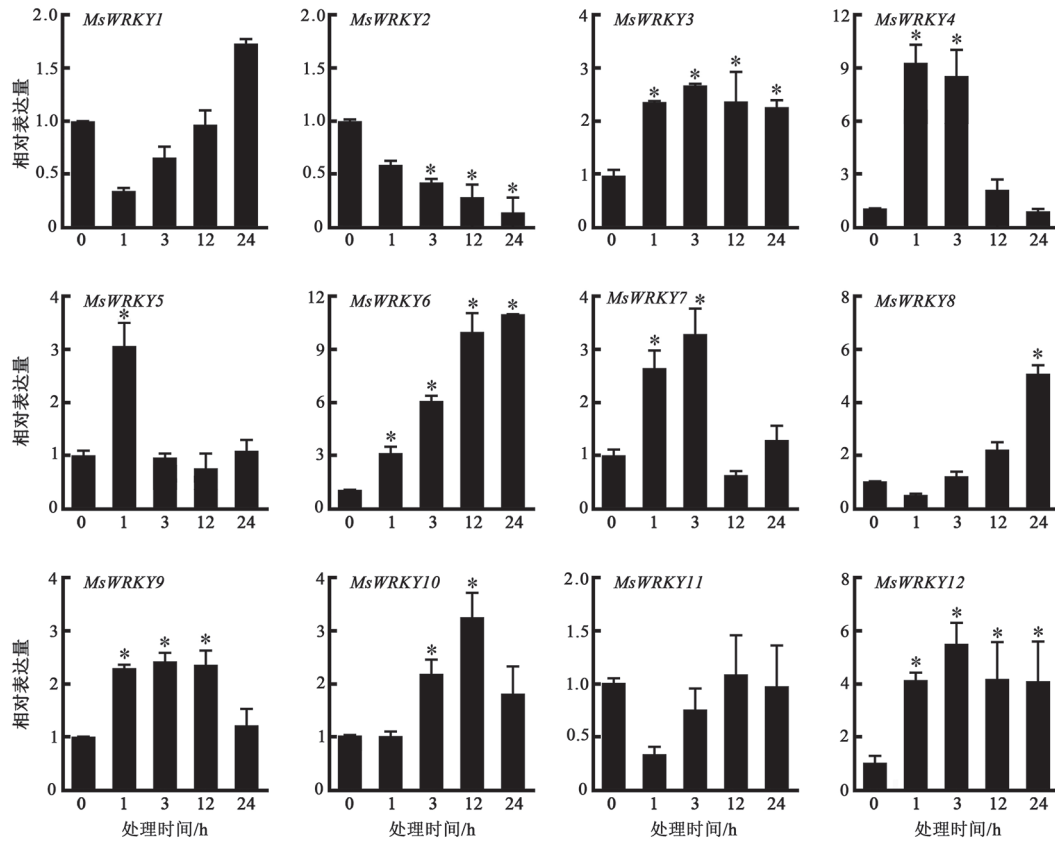


图3 紫花苜蓿盐胁迫响应WRKY转录因子表达模式分析

Fig.3 Expression pattern of WRKY transcription factors under salinity stress

*代表与对照相比显著性差异 $P < 0.05$, 实验进行3次生物学重复。

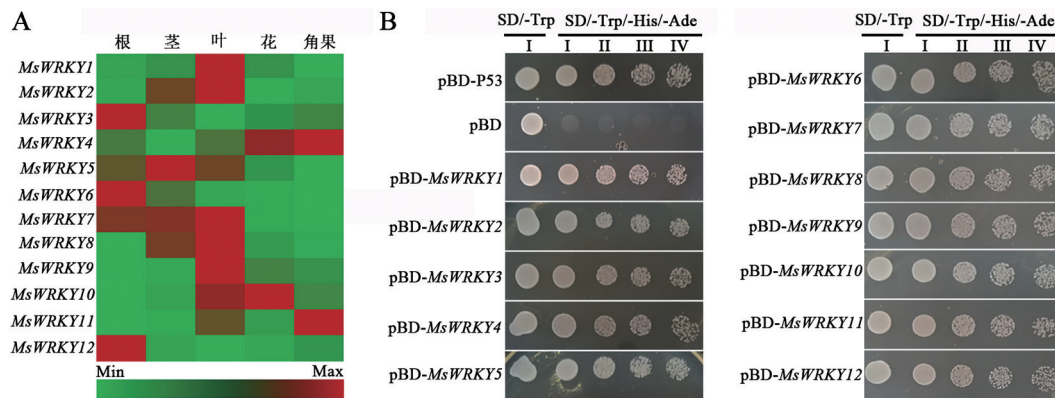


图4 紫花苜蓿盐胁迫响应WRKY转录因子组织特异性及转录活性分析

Fig.4 Tissue specific expression and transcriptional activity of the WRKY transcription factors involved in salinity stress in alfalfa

A: 组织特异性表达分析; B: 转录激活活性分析, pBD-P53 (阳性对照); pBD (阴性对照); I: 未稀释菌液; II、III、IV: 分别稀释10、100、500倍的菌液。

WRKY结构域)的系统发育分支上(图2)。在拟南芥中该分支多个基因功能已证实与植物的逆境胁迫应答有关, 例如: 与MsWRKY3和MsWRKY12同

源性最高的AtWRKY3和AtWRKY4均在拟南芥抗病性方面起作用(图2) (Lai等2008); AtWRKY20和AtWRKY26与茉莉酸(JA)的响应有关(Schluttenhofer

等2014); AtWRKY25、AtWRKY26和AtWRKY33与温度胁迫响应有关(付乾堂和余迪求2010)。II型WRKY家族(含有1个WRKY核心结构域和1个C₂H₂基序)共包括GroupIIa~e 5个亚家族, 本研究中6个转录因子属于II型, 其中MsWRKY4/5/7/10位于GroupIIa亚家族, MsWRKY1位于GroupIIb亚家族, MsWRKY2位于GroupIIc亚家族(图2)。已有研究表明, 这3个亚家族的转录因子除了参与植物胚胎发育、衰老、物质运输等功能以外(Robatzek和Somssich 2001), 在干旱(Jiang等2016)、盐胁迫(Van Aken等2013)、疾病防御及胁迫激素响应(Chen和Chen 2002)等方面也发挥重要作用。因此推测本研究分离的WRKY转录因子亦可能参与了紫花苜蓿的逆境胁迫响应。

在植物进化过程中, 为了适应环境变化和各種生物以及非生物胁迫, 植物形成了一套自身的适应机制。胁迫条件下, 植物既要快速响应来适应内外环境信号的短期刺激, 又要启动一系列的保护系统来应对长期的逆境胁迫(谢政文等2016)。转录因子的时空表达模式的变化对植物逆境胁迫响应起到了核心调控作用。通过对12个目标WRKY转录因子的组织特异性表达分析, 多数基因的表达具有典型的组织特异性(图4-A)。通常情况下基因表达定位与其功能是相适应的, 如: 玉米*GmGRP3*基因在根中特异性表达并控制着根的发育(Godde-meier等1998); 蒺藜苜蓿*MtSERK1*基因在胚胎中特异表达且与胚胎的发育相关(Nolan等2003)。因此推测这些WRKY转录因子时空表达模式的差异性可能与其在盐胁迫响应中功能多样性有关。

总之在本研究中我们在紫花苜蓿中筛选并首次成功克隆了12个响应盐胁迫的WRKY家族转录因子, 并对其系统进化关系以及盐胁迫下的时空表达模式、组织特异性表达特征以及转录活性等方面进行了详细的分析, 但是还存在一些尚未解决的问题。如: 这些基因是否具有耐盐功能? 若存在这种功能, 它们参与盐胁迫响应的分子机制是什么? 除盐胁迫以外, 它们是否还参与了其他逆境胁迫响应或生长发育的调控过程? 等等。今后还要通过构建它们的过表达或功能缺失转基因株系等手段进行深入研究, 以进一步揭示它们的功能及分子调控机制。

参考文献(References)

- Ali MA, Azeem F, Nawaz MA, et al (2018). Transcription factors WRKY11 and WRKY17 are involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol*, 226: 12–21
- Bao AK, Du BQ, Wang SM (2011). Advances on physiological mechanisms of alfalfa resistant to salt and drought. *Pratacult Sci*, 28 (9): 1700–1705 (in Chinese with English abstract) [包爱科, 杜宝强, 王锁民(2011). 紫花苜蓿耐盐、抗旱生理机制研究进展. *草业学报*, 28 (9): 1700–1705]
- Chen C, Chen Z (2002). Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol*, 129: 706–716
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, et al (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 5: 199–206
- Fu QT, Yu DQ (2010). Expression profiles of *AtWRKY25*, *AtWRKY26* and *AtWRKY33* under abiotic stresses. *Hereditas*, 32: 848–856 (in Chinese with English abstract) [付乾堂, 余迪求(2010). 拟南芥*AtWRKY25*、*AtWRKY26*和*AtWRKY33*在非生物胁迫条件下的表达分析. *遗传*, 32: 848–856]
- Godde-meier ML, Wulff D, Feix G (1998). Root-specific expression of a *Zea mays* gene encoding a novel glycine-rich protein, zmGRP3. *Plant Mol Biol*, 36: 799–802
- Jiang Y, Liang G, Yu D (2012). Activated expression of WRKY57 confers drought tolerance in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 5: 1375–1388
- Jiang Y, Qiu Y, Hu Y, et al (2016). Heterologous expression of *AtWRKY57* confers drought tolerance in *Oryza sativa*. *Front Plant Sci*, 7: 145
- Lai Z, Vinod K, Zheng Z, et al (2008). Roles of *Arabidopsis* WRKY3 and WRKY4 transcription factors in plant responses to pathogens. *BMC Plant Biol*, 8: 68
- Liu X, Song Y, Xing F, et al (2016). *GhWRKY25*, a group I WRKY gene from cotton, confers differential tolerance to abiotic and biotic stresses in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Protoplasma*, 253: 1265–1281
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 25: 402–408
- Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ (2003). Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root forming and embryogenic cultures. *Plant Physiol*, 133: 218–230
- Robatzek S, Somssich IE (2001). A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, *AtWRKY6*, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J*, 28: 123–133
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, et al (2010). WRKY tran-

- scription factors. *Trends Plant Sci*, 15: 247–258
- Schluttenhofer C, Pattanaik S, Patra B, et al (2014). Analyses of *Catharanthus roseus* and *Arabidopsis thaliana* WRKY transcription factors reveal involvement in jasmonate signaling. *BMC Genomics*, 15: 502
- Shi ST, Gong XQ, Zou YJ (2017). The role of WRKY transcription factors in biotic and abiotic stress responses in plants. *Chin J Biochem Mol Biol*, 33: 674–680 (in Chinese with English abstract) [史书婷, 龚小庆, 邹养军 (2017). WRKY转录因子与植物逆境响应. *中国生物化学与分子生物学报*, 33: 674–680]
- Song H, Nan ZB (2014). Genome-wide identification and analysis of *WRKY* transcription factors in *Medicago truncatula*. *Hereditas* 36: 152–168 (in Chinese with English abstract) [宋辉, 南志标(2014). 蒺藜苜蓿全基因组中 *WRKY*转录因子的鉴定与分析. *遗传*, 36: 152–168]
- Van Aken O, Zhang B, Law S, et al (2013). AtWRKY40 and AtWRKY63 modulate the expression of stress-responsive nuclear genes encoding mitochondrial and chloroplast proteins. *Plant Physiol*, 162: 254–271
- Wang QZ, Liu Q, Gao YN, et al (2017). Review on the mechanisms of the response to salinity-alkalinity stress in plants. *Acta Ecologica Sin*, 37: 5565–5577 (in Chinese with English abstract) [王隽珍, 刘倩, 高娅妮等(2017). 植物对盐碱胁迫的响应机制研究进展. *生态学报*, 37: 5565–5577]
- Xie ZW, Wang LJ, Chen JY, et al (2016). Studies on WRKY transcription factors and their biological functions in plants. *J Agric Sci Tech*, 18: 46–54 (in Chinese with English abstract) [谢政文, 王连军, 陈锦洋等(2016). 植物WRKY转录因子及其生物学功能研究进展. *中国农业科技导报*, 18: 46–54]
- Xu MF, Wu CX, Cang T, et al (2015). Twenty pesticides-induced transcription expression of three genes of *GH3* family in soybean. *J Plant Physiol*, 51: 2188–2194 (in Chinese with English abstract) [徐明飞, 吴长兴, 苍涛等 (2015). 大豆GH3家族三个成员对20种农药的转录响应. *植物生理学报*, 51: 2188–2194]
- Zhang LQ, Zhang FY, Hasi AGL (2012). Research progress on alfalfa salt tolerance. *Acta Pratacult Sin*, 21: 296–305 (in Chinese with English abstract) [张立全, 张凤英, 哈斯阿古拉(2012). 紫花苜蓿耐盐性研究进展. *草业学报*, 21: 296–305]
- Zheng Y, Jiao C, Sun H, et al (2016). iTAK: A program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases. *Mol Plant*, 9: 1667–1670
- Zhou QY, Tian AG, Zou HF, et al (2008). Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Biotechnol J*, 6: 486–503

Cloning and expression analysis of WRKY transcription factor involved in salinity stress in alfalfa

DONG Wei, WU Pei-Xiang, YANG Ning, LIU Xi-Jiang, SONG Yu-Guang*

College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu, Shandong 273165, China

Abstract: WRKY transcription factors play a key regulatory role in plant development and stress response, but few studies in these areas have been reported in alfalfa. Twelve salinity induced or suppressed WRKY transcriptional factors were identified from the transcriptome sequencing data of salinity stressed alfalfa in this study. Their full length of the coding sequence were cloned based on the reference sequence of the related species. All of the target genes contained the core sequence and they distributed in different evolutionary branches of WRKY family. Their expression showed an obvious tissue specificity. All of them had transcriptional activity. The expression patterns of them under salt stress for different periods showed that among the 12 transcription factors, 10 genes, such as *MsWRKY1/3* were induced by salinity stress, but their expression showed a diversified feature. The expression of *MsWRKY2* was inhibited but *MsWRKY11* was not significantly changed under the control and salt stressed condition. This study will provide important gene resources for understanding the regulatory mechanism of WRKY transcription factors as well as for the genetic breeding of alfalfa.

Key word: *Medicago sativa*; salinity stress; WRKY; expression pattern

Received 2018-07-09 Accepted 2018-09-04

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2015JL012), the National Natural Science Foundation of China (31300220, 31501328), Postdoctoral Fund of China (2014M550366), and the Scientific Research Fund of Qufu Normal University (XKJ201320).

*Corresponding author (SYG-0423@163.com).