

# 芥菜 *BjuWRKY71-1* 通过调节 *SOC1* 的表达促进开花

邓琴霖<sup>1,2</sup>, 王远达<sup>1,2</sup>, 冯俊杰<sup>1,2</sup>, 魏大勇<sup>1,2</sup>, 王志敏<sup>1,2</sup>, 汤青林<sup>1,2\*</sup>

1 西南大学园艺园林学院, 重庆 400715

2 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715

邓琴霖, 王远达, 冯俊杰, 魏大勇, 王志敏, 汤青林. 芥菜 *BjuWRKY71-1* 通过调节 *SOC1* 的表达促进开花[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1017-1028.

DENG Qinlin, WANG Yuanda, FENG Junjie, WEI Dayong, WANG Zhimin, TANG Qinglin. *Brassica juncea* *BjuWRKY71-1* accelerates flowering by regulating the expression of *SOC1*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1017-1028.

**摘要:** 芥菜(*Brassica juncea*)是十字花科芸薹属的蔬菜作物, 在我国广泛种植。茎用芥菜主要以膨大的变态茎为食用器官, 其产量和品质很大程度上取决于营养生长到生殖生长的过渡, 即开花。*WRKY* 转录因子家族在高等植物中普遍存在, 其成员参与调控许多生长发育进程, 包括生物/非生物胁迫响应、开花调控等。*WRKY71* 是 *WRKY* 家族中的一个重要成员, 但它在芥菜中的功能及作用机制还未见报道。本研究克隆得到芥菜 *BjuWRKY71-1* 基因, 对其进行生物信息学分析和系统进化树分析表明, 其蛋白具有一个保守的 *WRKY* 结构域, 属于 II 类 *WRKY* 蛋白, 与白菜 *BraWRKY71-1* 亲缘关系较近。*BjuWRKY71-1* 在叶和花中表达丰度显著高于根和茎, 且随着植株的发育表达量逐渐增多。烟草亚细胞定位显示 *BjuWRKY71-1* 位于细胞核中。过表达 *BjuWRKY71-1* 的转基因拟南芥开花时间较野生型显著提前。酵母单杂交和双荧光素酶试验结果显示, 其能够结合到开花整合子 *BjuSOC1* 的启动子上并促进相应基因的表达。综上所述, *BjuWRKY71-1* 蛋白能够直接靶向 *BjuSOC1* 从而促进植株开花。这一发现为深入研究芥菜 *BjuWRKY71-1* 开花调控的分子机制及其耐抽薹开花新种质创制等奠定了基础。

**关键词:** 芥菜; *BjuWRKY71-1*; 表达模式; *BjuSOC1* 启动子; 开花

资助项目: 重庆市自然科学基金(cstc2019jcyj-zdxmX0022); 重庆市研究生科研创新项目(CYB22134)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Chongqing, China (cstc2019jcyj-zdxmX0022) and the Graduate Scientific Innovation Program of Chongqing, China (CYB22134).

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68251274, E-mail: swutql@163.com

Received: 2023-05-31; Accepted: 2023-07-11; Published online: 2023-12-04

## *Brassica juncea* BjuWRKY71-1 accelerates flowering by regulating the expression of *SOC1*

DENG Qinlin<sup>1,2</sup>, WANG Yuanda<sup>1,2</sup>, FENG Junjie<sup>1,2</sup>, WEI Dayong<sup>1,2</sup>, WANG Zhimin<sup>1,2</sup>, TANG Qinglin<sup>1,2\*</sup>

1 College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Chongqing Key Laboratory of Olericulture, Chongqing 400715, China

**Abstract:** *Brassica juncea* (mustard) is a vegetable crop of *Brassica*, which is widely planted in China. The yield and quality of stem mustard are greatly influenced by the transition from vegetative growth to reproductive growth, i.e., flowering. The WRKY transcription factor family is ubiquitous in higher plants, and its members are involved in the regulation of many growth and development processes, including biological/abiotic stress responses and flowering regulation. WRKY71 is an important member of the WRKY family. However, its function and mechanism in mustard have not been reported. In this study, the *BjuWRKY71-1* gene was cloned from *B. juncea*. Bioinformatics analysis and phylogenetic tree analysis showed that the protein encoded by *BjuWRKY71-1* has a conserved WRKY domain, belonging to class II WRKY protein, which is closely related to BraWRKY71-1 in *Brassica rapa*. The expression abundance of *BjuWRKY71-1* in leaves and flowers was significantly higher than that in roots and stems, and the expression level increased gradually along with plant development. The result of subcellular localization showed that BjuWRKY71-1 protein was located in nucleus. The flowering time of overexpressing *BjuWRKY71-1 Arabidopsis* plants was significantly earlier than that of the wild type. Yeast two-hybrid assay and dual-luciferase reporter assay showed that BjuWRKY71-1 interacted with the promoter of the flowering integrator *BjuSOC1* and promoted the expression of its downstream genes. In conclusion, BjuWRKY71-1 protein can directly target *BjuSOC1* to promote plant flowering. This discovery may facilitate further clarifying the molecular mechanism of *BjuWRKY71-1* in flowering time control, and creating new germplasm with bolting and flowering tolerance in mustard.

**Keywords:** *Brassica juncea*; *BjuWRKY71-1*; expression pattern; *BjuSOC1*; flowering

开花期是植物生命周期中一个非常重要的时期,它是植物从营养生长转向生殖生长的过渡,对种子的产生和后代的繁殖具有举足轻重的作用。前人对于调控开花的分子网络进行了大量研究,目前已取得一些进展,例如,提出了多个开花调控途径(如光周期途径和赤霉素途径等)、发现了一些核心开花整合子,如成花素(*flowering locus T, FT*)、*suppressor of overexpression of constans 1 (SOC1)*<sup>[1-10]</sup>。*SOC1* 作为植物开花调控通路中的

整合子已经被广泛研究。*SOC1* 是一个典型的 MIKC 蛋白,包括保守的 MADS 域和 K 域以及不保守的 I 域和 C 端,其不同的结构域被认为具有不同的功能<sup>[11-12]</sup>。有研究表明 *SOC1* 主要在叶片和茎尖分生组织中表达以促进拟南芥开花<sup>[13-14]</sup>。此外,大量研究表明 *SOC1* 在植物开花调控网络中扮演着重要的角色,存在许多上游基因,如 *FT*、*CONSTANS (CO)*、*FLOWERING LOCUS C (FLC)*等<sup>[15-19]</sup>。

WRKY 蛋白家族是在高等植物和藻类中均存在的一个转录因子超家族,其第一个成员 SPF1 早在 1994 年就在甘薯中被鉴定<sup>[20]</sup>。WRKY 蛋白包括一个或两个保守的 DNA 结合域,即 WRKY 域,其 N 端含有一个七肽序列 (WRKYGQK),之后紧邻一个 C2H2/C2HC 的锌指蛋白基序<sup>[20]</sup>。根据蛋白中的 WRKY 结构域数目和锌指基序的结构,WRKY 蛋白被划分为 I、II 和 III 三类,其中 II 类还可根据氨基酸的主要序列划分为 IIa、IIb、IIc、IId 和 IIe 这 5 个亚类<sup>[21]</sup>。经过多年的研究,科研人员发现 WRKY 蛋白参与植物生长发育的多个过程<sup>[22]</sup>,包括开花调控<sup>[23]</sup>、生物/非生物胁迫响应<sup>[24]</sup>等。例如,拟南芥 *WRKY26*、*WRKY45* 和 *WRKY71* 被荫蔽诱导以参与拟南芥生长发育<sup>[25]</sup>,*WRKY46* 转录因子通过整合调控蛋白 N-糖基化和游离型吲哚乙酸 (indoleacetic acid, IAA) 含量来抑制根伸长区  $\text{NH}_4^+$  的外流,以增强对铵离子毒性的耐受性<sup>[26]</sup>。

*WRKY71* (II 类 WRKY 蛋白) 是 WRKY 家族中一个重要成员,目前已有报道表明其参与了植物的生长发育调控。例如,拟南芥 *WRKY71* 会加速盐胁迫下的开花进程<sup>[27]</sup>,并且有研究表明其能够通过直接激活拟南芥 *FT* 和 *LEAFY (LFY)* 以促进开花<sup>[28]</sup>。在腊梅中,过表达 *CpWRKY71* 的转基因拟南芥开花时间较野生型显著提前,同时下游开花相关基因 *FT*、*LFY*、*APETALA1 (AP1)*、*FRUITFULL (FUL)* 及 *CAULIFLOWER (CAL)* 的表达量显著上调<sup>[29]</sup>。除此之外,拟南芥 *WRKY71* 也被证实通过 *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS1 (RAX)* 基因参与调控分枝发育<sup>[30]</sup>。这说明 *WRKY71* 可能存在生物学功能的多样性或分化。在芥菜型油菜中鉴定到了 4 个 *WRKY71* 同源基因,定量结果表明,这 4 个 *BjuWRKY71* 基因在高盐、脱落酸和低温胁迫下均存在响应<sup>[31]</sup>。但 *BjuWRKY71* 在调控芥菜开花

的功能和分子机制还未见报道。

芥菜 (*Brassica juncea*) 是十字花科芸薹属植物,作为食用蔬菜在我国被广泛种植。按照食用器官的差异,芥菜可分为茎用、叶用和根用等多种类型,其中茎用芥菜又包括茎瘤芥(榨菜)、棒菜和儿菜等,以肉质茎为食。在茎用芥菜的生产中,常发生“先期抽薹”现象,即提前开花导致变态茎发育不足,最终导致产量和品质大大降低。因此,研究茎用芥菜的开花调控机制对于开展芥菜的育种工作及其产业发展具有重要意义。本研究克隆了芥菜 *BjuWRKY71-1* (*BjuA023161*) 基因,并分析了它的表达模式、亚细胞定位和生物学功能,鉴定了其与开花整合子 *BjuSOC1* 基因启动子的作用关系,为解析芥菜开花调控机制以及培育耐抽薹新品种提供了新的思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

本试验中所用的芥菜、哥伦比亚型拟南芥和本氏烟草均来源于重庆市蔬菜学重点实验室,种植于人工气候箱 (16 h/8 h, 12 000 Lx/0 Lx, 22 °C/20 °C, 相对湿度 75%)。

PrimeSTAR 高保真酶购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌质粒提取试剂盒和产物纯化试剂盒购自 Vazyme 公司。酵母菌株 Y187 和 Y2HGold 等相关菌株由本实验室提供。金担子素 (aureobasidin A, AbA) 购自 Clontech 公司。农杆菌 GV3101 和 pSoup 菌株购自重庆伍佰生物技术有限公司。pGreenII62-SK、pGreenII0800-LUC 载体均由本实验室提供。

### 1.2 基 因 克 隆

取芥菜生殖生长期的叶片和花,液氮预冻后使用 BioFlux 公司 Biospin Plant Total RNA Extraction Kit 提取 RNA,然后对芥菜 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳,以检测其完整性。接下来使用

YEASEN公司的“HifairIII1st Strand cDNA Synthesis SuperMix”试剂盒进行反转录(20  $\mu$ L 体系), 获得单链 cDNA 用于 *BjuWRKY71* 等基因克隆。

从拟南芥数据库网站 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 获得 *AtWRKY71* 的编码序列 (coding sequence, CDS), 然后将其在 BRAD 网站 (<http://39.100.233.196/>) 进行 BLAST。根据多个 *BjuWRKY71* 同源基因的 CDS 序列设计克隆引物, 引物如表 1 所示, 采用同源克隆法进行 PCR 扩增, 克隆芥菜 *BjuWRKY71* 基因, 送样到北京擎科生物科技股份有限公司测序。

### 1.3 多序列比对及进化树分析

利用 BioXM 软件对拟南芥和芸薹属植物芥菜(Bju)、白菜(Bra)、油菜(Bna)、黑芥(Bni)和甘蓝(Bo)的 WRKY71 蛋白的氨基酸序列进行比对分析。以 MEGA 软件构建进化树, 采用方法为邻接法(neighbor-joining, 1 000 个 bootstrap 重复)。

### 1.4 实时荧光定量分析

分别取芥菜正常光周期条件下开花期的叶、花和茎, 以及长日照处理下不同发育时期的芥菜

叶片(四叶一心开始, 每隔 7 d 取样), 提取 RNA 并反转录后进行荧光定量聚合酶链式反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)。qPCR 所使用的试剂盒为“YEASEN”, 反应体系为 20  $\mu$ L 体系, 仪器为“CFX96tm real-time PCR detection system (Bio-Rad)”, 扩增方法为高特异性法, 程序如下: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。基因的相对表达量计算方法参考  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ <sup>[32]</sup>, 使用 SPSS 软件进行显著性分析, 显著水平  $\alpha=0.05$ 。本研究所使用的 qPCR 引物见表 1。

### 1.5 载体构建

根据基因 CDS 序列设计亚克隆引物, 分别构建芥菜 *BjuWRKY71* 的酵母表达载体、转基因载体和双荧光素酶融合载体等, 引物如表 1 所示。以中间克隆载体 pEASY-BjuWRKY71 的质粒为模板进行亚克隆, 并分别将亚克隆产物和相应载体进行双酶切, 凝胶电泳后分别回收大小正确的条带, 进一步使用 Solution I 连接酶进行连接实验并转化大肠杆菌。挑选阳性大肠杆菌菌

表 1 本实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Sequences (5'→3')	Used for experiment
BjuWRKY71-F	ATGGATGATCAGGTTGACCACAA	Gene cloning
BjuWRKY71-R	TCAAGATTCATGCTTCAAGAATTT	Gene cloning
BjuWRKY71-qPCR-F	ACAGCCCTATCCAAGGAGT	qRT-PCR
BjuWRKY71-qPCR-R	CGTCGATGGGATTGGATGGT	qRT-PCR
BjuACTIN-qPCR-F	GCTGACCGTATGAGCAAAGA	qRT-PCR
BjuACTIN-qPCR-R	GTTGGAAAGTGCTGAGGGAT	qRT-PCR
AtTUB2-qPCR-F	ATCCGTGAAGAGTACCCAGAT	qRT-PCR
AtTUB2-qPCR-R	AAGAACCATGCACTCATCAGC	qRT-PCR
pBin35SRed3-WRKY71-F	CGCGGATCCATGGATGATCAGGTTGACCA	Overexpression
pBin35SRed3-WRKY71-R	CCGGAATTCCTCAAGATTCATGCTTCAAGAATTT	Overexpression
p1300-WRKY71-F	TGCTCTAGAAATGGATGATCAGGTTGACCA	Localization
p1300-WRKY71-R	CGGGGTACCAGATTCATGCTTCAAGAATTT	Localization
pGADT7-WRKY71-F	CGCGGATCCATGGATGATCAGGTTGACCA	Y1H
pGADT7-WRKY71-R	CCGGAATTCCTCAAGATTCATGCTTCAAGAATTT	Y1H
pGreenII 62-SK-WRKY71-F	CGCGGATCCATGGATGATCAGGTTGACCA	LUC
pGreenII62-SK-WRKY71-R	CCGGAATTCCTCAAGATTCATGCTTCAAGAATTT	LUC

The restriction enzymes are underlined.

斑, 摇菌 12–16 h, 送至北京擎科生物科技股份有限公司测序, 提取测序正确的菌液的质粒用于后续实验。*ProBjuSOC1* (*BjuA010734*)相关的载体由本实验室保存并提供。

### 1.6 亚细胞定位

将不含末端终止密码子的 *BjuWRKY71* 的 CDS 序列插入到绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)载体 pCAMBIA1300-GFP 多克隆位点处, 获得重组质粒 pCAMBIA1300-*BjuWRKY71*-GFP, 并转入 GV3101 农杆菌菌株, 将含有核 Marker 载体[红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)的农杆菌菌液与含有 *BjuWRKY71* 融合载体的农杆菌菌液混合注射烟草叶片, 36–48 h 后取样, 使用激光共聚焦显微镜观察荧光。

### 1.7 转基因植株鉴定

过表达载体为 pBin35SRed3, 所使用的引物见表 1。将重组质粒导入农杆菌菌株 GV3101 中, 并通过花浸渍法转化拟南芥。pBin35SRed3 载体中含有红色荧光蛋白(Red)基因(启动子为 35S), 因此利用红色激发光源照射种子以筛选转基因拟南芥。以转基因拟南芥 DNA 为模板, 使用特异引物进行 PCR 扩增, 在 DNA 水平检测其是否为转基因阳性植株。T3 代植株萌发后 15–25 d, 选择生长状态良好的植株提取叶片 RNA, 并通过 RT-qPCR 检测 *BjuWRKY71* 基因相对表达量(以同期的野生型拟南芥植株为对照)。分析了第一花序出现时每个植株的莲座叶数及开花天数。

### 1.8 酵母单杂交

将质粒 pAbAi-*ProBjuSOC1* 转化到 Y1H Gold 酵母菌株, 并涂于 SD/-Ura 琼脂板上培养 2–3 d, 筛选阳性菌株。前期工作中筛选得到的 pAbAi-*ProBjuSOC1* 背景 AbA 抑制浓度为 700 ng/mL。将 pGADT7-*BjuWRKY71* 转化到含有 pAbAi-*ProBjuSOC1* 质粒的酵母菌株中, 并分别点斑于 SD/-Leu/和 SD/-Leu/AbA<sup>700</sup> 的固体培养基, 置于 30 °C 生长 2–3 d 后观察酵母的生长情

况。酵母单杂实验操作方法参考 Matchmaker<sup>®</sup> Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System (TaKaRa)试剂盒说明书进行。

### 1.9 双荧光素酶报告系统检测

*ProBjuSOC1* 插入到 pGreenII 0800-LUC 载体中作为报告质粒, *BjuWRKY71-1* 插入到 pGreenII 62-SK 载体中作为效应质粒。将报告质粒和效应质粒分别转入至农杆菌 GV3101 (pSoup)中, 并在含有卡那霉素(kanamycin, Kana) (10 μg/mL)和利福平(rifampicin, Rif) (30 μg/mL)的 50 mL YEB 培养基中进行扩繁(28 °C), 培养至  $OD_{600}=0.9-1.1$  后离心 10 min (4 000 r/min)。使用 50 mL 重悬液[10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、100 μL 100 mmol/L 乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)和 100 μL 0.5 mol/L 2-吗啉乙磺酸(2-morpholinoethanesulphonic acid, MES)]重悬菌体, 室温黑暗放置 2–3 h 后注射至长势良好的烟草叶片。将处理的烟草植株移到正常生长条件下生长 36–48 h 后取样测定酶活。使用 GloMax<sup>®</sup>-Multi+多功能检测仪分别测定萤火虫素酶和海肾荧光素酶的酶活性并计算酶活比值, 使用 SPSS 软件进行显著性分析, 显著水平  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 芥菜 *BjuWRKY71-1* 基因的克隆与表征

为了预测 *BjuWRKY71* 基因的生物学功能, 首先将拟南芥 WRKY71 氨基酸序列在 BRAD 网站(Braju\_tum\_V1.5 版本)进行 BLAST 分析, 发现芥菜中存在 5 个 *BjuWRKY71* 同源基因, 这 5 个同源基因的基因结构见图 1A。与 *BjuWRKY71-1* 相比, *BjuWRKY71-4* 和 *BjuWRKY71-5* 在第一外显子处缺失部分序列, 而 *BjuWRKY71-3* 缺失第一外显子、第一内含子和部分第二外显子序列。同时基于与拟南芥中 *AtWRKY71* 基因序列的相似性, 本研究设计特异引物, 并克隆得到一个 BLAST 得分较高的芥菜 *BjuWRKY71-1* (*BjuA023161*) 基因作为代表用于后续研究。

首先将克隆产物构建到中间载体后进行测序以获得其完整的 CDS 序列,并结合 BRAD 数据库中芥菜的基因组数据分析发现, *BjuWRKY71-1* 由一个 1 443 bp 的基因组区域组成,包含 3 个外显

子和 2 个内含子(图 1A), 编码 277 个氨基酸。预测 *BjuWRKY71-1* 蛋白分子量为 31.6 kDa, 等电点为 8.35, 含有一个保守的 WRKY 结构域和一个保守的 C2H2 锌指结构(图 1B), 因此 *BjuWRKY71-1* 属

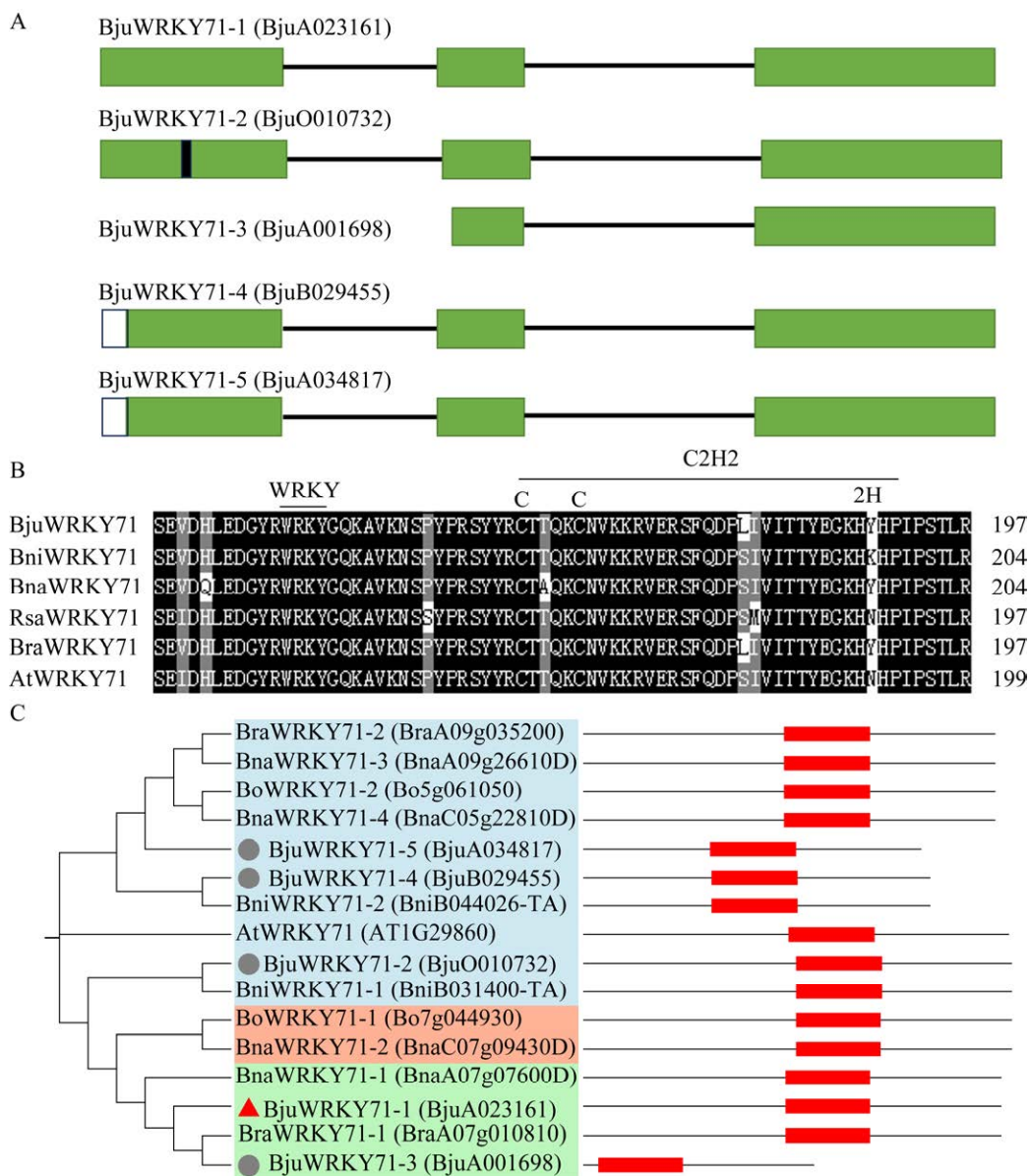


图 1 *BjuWRKY71-1* 基因表征

Figure 1 Characterization of *BjuWRKY71-1*. A: *BjuWRKY71* gene structure. The green parts indicate exons, the black lines indicate introns. The white box represents missing sequences, and the black box represents extra sequences, compared to *BjuWRKY71-1*. B: Alignment of the amino acid sequences of *BjuWRKY71* with *BniWRKY71*, *BnaWRKY71*, *BsaWRKY71*, *BraWRKY71* and *AtWRKY71* (partial sequences). WRKY domain and C2H2 structure are marked in the graph. C: Phylogenetic tree of WRKY71 proteins from different species. The solid gray circle indicates homologous proteins of *BjuWRKY71* in *Brassica juncea*, and the solid red triangle indicates protein studied in this article. The red box indicates the WRKY domain. Genes ID are shown in the bracket.

于 II 类 WRKY 蛋白<sup>[33]</sup>。

WRKY 保守结构域能够赋予蛋白与 DNA/蛋白质结合的能力, 因此进一步使用 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)网站分析 WRKY71 的保守结构域及其在蛋白中的位置。为了分析 *BjuWRKY71-1* 蛋白的系统发育关系, 从 BRAD 网站获取了其他芸薹属植物的 WRKY71 蛋白序列, 并利用 MEGA X 10.2.0 构建系统发育树以分析其进化关系(图 1C)。结果表明, *BjuWRKY71-1* 蛋白与 *BraWRKY71-1* 的亲缘关系较近。

## 2.2 芥菜 *BjuWRKY71-1* 的表达模式

为了研究芥 *BjuWRKY71-1* 在何时何部位表达, 本研究设计了特异性引物, 利用 RT-qPCR 检测芥菜 *BjuWRKY71-1* 基因表达, 分析该基因在不同芥菜组织及不同发育时期叶片的表达规律。结果表明: *BjuWRKY71-1* 在正常光周期条件下的花和叶中的表达量显著高于茎(图 2A)。并且在长日照处理过程中, 从第 I 阶段(苗龄 8 d), 随着芥菜植株的发育(第 IV 阶段开始现蕾开花),

其表达量逐渐升高(图 2B), 这暗示 *BjuWRKY71-1* 可能参与植株开花等生长发育。结合前人的报道<sup>[28]</sup>, 推测芥菜 *BjuWRKY71-1* 可能参与植物开花调控。

## 2.3 芥菜 *BjuWRKY71-1* 蛋白的亚细胞定位

转录因子一般定位于细胞核中, 通过结合到 DNA 上并激活或者抑制下游基因的转录以发挥作用。对芥菜 *BjuWRKY71-1* 蛋白核定位信号分析发现, 该蛋白具有一段核定位序列, 即 RKQGKKGKGEKKER (第 106–118 位氨基酸)。为了进一步鉴定芥菜 *BjuWRKY71-1* 的亚细胞定位, 本研究将去掉终止密码子的 *BjuWRKY71-1* 插入到 GFP 蛋白编码基因的 N 端(pCAMBIA1300 载体), 获得 *BjuWRKY71-1*-GFP 的融合蛋白。将阳性质粒转入农杆菌 GV3101 后侵染烟草叶片, 并通过激光共聚焦显微镜观察荧光信号, 发现在细胞核中有绿色荧光信号。由此表明芥菜 *BjuWRKY71-1* 蛋白定位于细胞核, 暗示其可能作为转录因子发挥作用(图 3)。

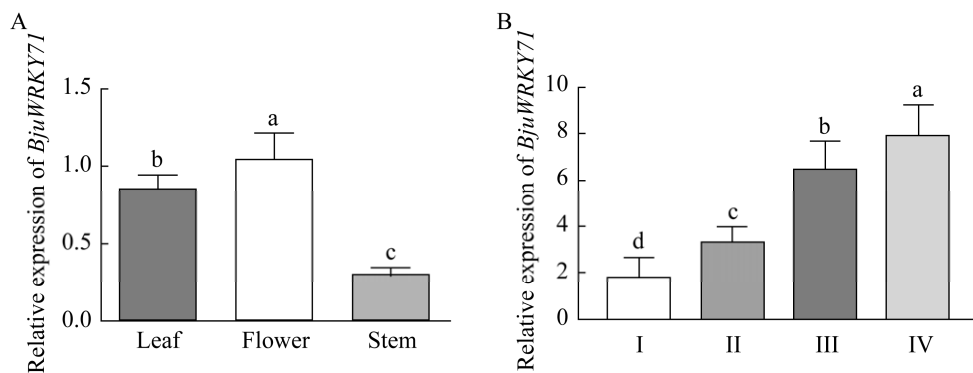


图 2 *BjuWRKY71-1* 的表达模式

Figure 2 Expression patterns of *BjuWRKY71-1* in *Brassica juncea*. A: Relative expression of *BjuWRKY71-1* in different tissue during flowering under normal photoperiod condition. B: Relative expression of *BjuWRKY71-1* in different periods from vegetative to reproductive phase under long-day condition. I, II, III and IV represent 8, 15, 25 and 35 days of seedling age, respectively. Different letters above columns indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

## 2.4 *BjuWRKY71* 基因异源表达促进开花

为了进一步鉴定 *BjuWRKY71-1* 的生物学功能, 将其插入到 pBin35SRed3 载体(35S 启动子启动), 并转入拟南芥中过表达, 观察转基因株

系的开花表型(图 4)。本研究共获得 6 个转基因拟南芥株系, 并将它们的 T3 代种植于长日照环境下分析其表型。结果表明: *BjuWRKY71-1* 在拟南芥中成功过表达(图 4A、4B), 并且转基因植

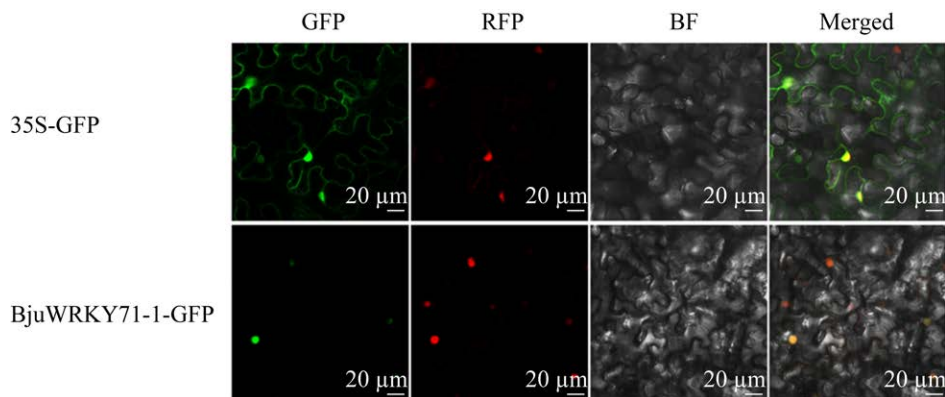


图 3 *BjuWRKY71-1* 蛋白亚细胞定位

Figure 3 Subcellular localization of *BjuWRKY71-1* protein. RFP: Red fluorescent protein (reference for nuclei); BF: Bright-field; Merged: merged image of GFP, RFP and BF.

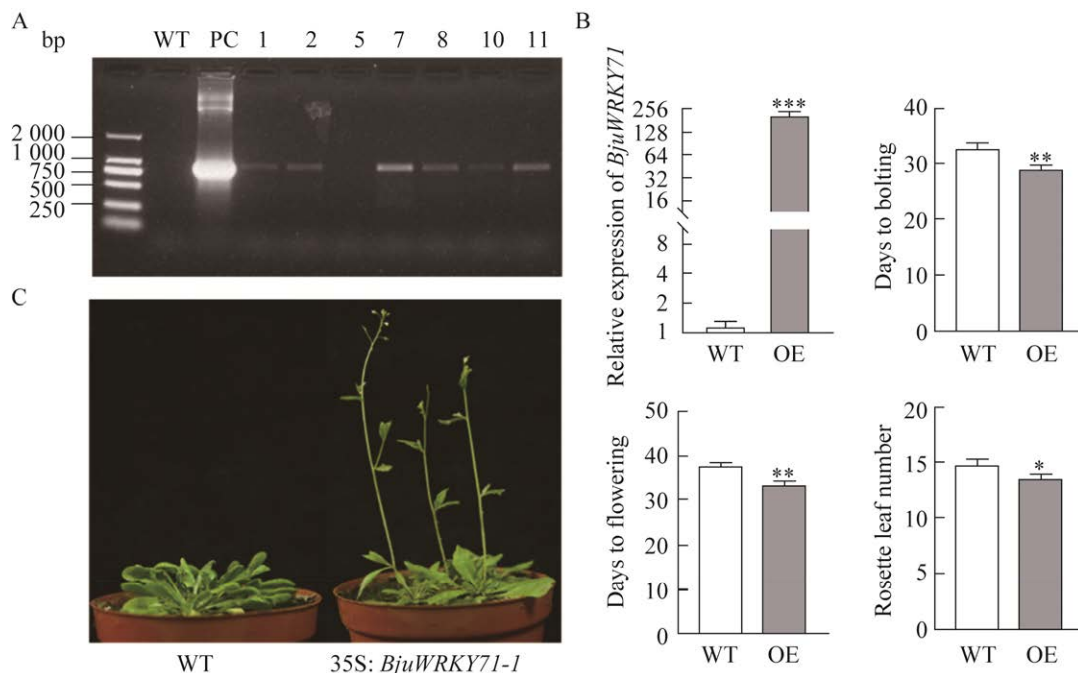


图 4 异源过量表达 *BjuWRKY71-1* 促进拟南芥开花

Figure 4 Overexpression of *BjuWRKY71-1* promotes flowering of *Arabidopsis thaliana*. A: PCR identification of T1 generation positive transgenic lines. PC: Positive control; 1, 2, 5, 7, 8, 10, and 11: Transgenic plants; WT: Wild type. B: *BjuWRKY71-1* expression, days to bolting or flowering, and number of rosette leaves respectively in transgenic lines and WT plants. OE: *BjuWRKY71-1* overexpression lines, WT: Wild type. Asterisks indicate significant differences between WT and transgenic lines ( $n \geq 10$ , \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ , by Student's *t*-test). C: 35S:*BjuWRKY71-1* exhibits early flowering than WT. WT: Wild type.



株开花时间显著早于野生型拟南芥(图 4C), 植株开花时的基部莲座叶数也显著少于野生型(图 4B)。由此暗示芥菜 *BjuWRKY71-1* 很可能具有促进开花的功能。

## 2.5 *BjuWRKY71-1* 转基因影响开花相关基因表达

为了探究芥菜 *BjuWRKY71-1* 提早开花的分子机制, 分析了部分开花信号整合子 *SOC1*、*FT* 及其下游基因 *LFY* 和 *FUL* 的转录水平。结果表明 *SOC1*、*FT*、*FUL* 和 *LFY* 在过表达 *BjuWRKY71-1* 的转基因株系中具有较高的表达水平(图 5)。由此推测, *BjuWRKY71-1* 可能通过诱导 *SOC1* 等一些成花基因来加速开花。

## 2.6 *BjuWRKY71-1* 与 *BjuSOC1* 启动子的互作分析

芥菜 *BjuWRKY71-1* 是否能直接靶向开花信号整合子 *SOC1* 基因, 行使开花调控功能呢? *SOC1* 作为一个开花整合子, 其调控开花的功能是非常保守的。本研究首先通过 New Place (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)网站分析, 发现 *BjuSOC1* 启动子区域具有 w-box (TTGACT/C), 它是 WRKY 家族成员的可能作用基序。因此 *BjuWRKY71-1* 可能与 *BjuSOC1* 基因的启动子具

有相互作用。

本研究首先进行了酵母单杂交鉴定, 将 *BjuWRKY71-1* 基因插入到酵母表达载体 pGADT7, 并转化到含有 pAbAi-*ProBjuSOC1* 线性化质粒的 Y1H Gold 酵母菌株中, 并在 SD/-Leu/AbA<sup>700</sup> 固体培养基中进行培养, 观察其是否能正常生长。如图 6A 所示, 含有 pGADT7-*BjuWRKY71-1* 的菌株能在酵母缺陷型培养基中正常生长, 而含空载 pGADT7 质粒的菌株无法生长。由此表明 *BjuWRKY71-1* 能够结合到 *ProBjuSOC1*, 发生蛋白-DNA 相互作用。

进一步通过双荧光素酶报告系统检测 *BjuWRKY71-1* 对 *BjuSOC1* 的激活或抑制作用。以 SK 空载与 pGreenII0800-*ProSOC1* 的混合菌液 (negative control, NC) 为对照, 以 *BjuWRKY71-SK* 与 pGreenII0800-*ProSOC1* 的混合菌液为处理组, 分别注射本氏烟叶片, 然后置于正常环境下生长 36-48 h, 利用酶标仪分别检测萤火虫素酶和海肾荧光素酶的酶活, 并计算 LUC/REN 的比值(图 6B)。结果显示, *BjuWRKY71-1* 处理组的酶活性比值显著高于对照, 说明 *BjuWRKY71-1* 能够结合到 *BjuSOC1* 的启动子从而促进相应基因的表达。

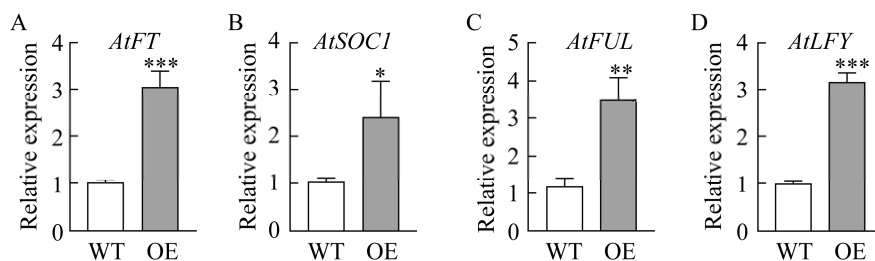


图 5 *BjuWRKY71-1* 转基因株系中开花相关基因的表达分析

Figure 5 Expression analysis of flowering related genes in *BjuWRKY71-1* transgenic lines. RT-qPCR analysis of genes involved in flowering between wild-type and transgenic *Arabidopsis*, including *AtFT* (A), *AtSOC1* (B), *AtFUL* (C) and *AtLFY* (D). OE: *BjuWRKY71-1* overexpression lines. Asterisks indicate significant differences between WT and transgenic lines ( $n \geq 10$ , \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ , by Student's *t*-test).

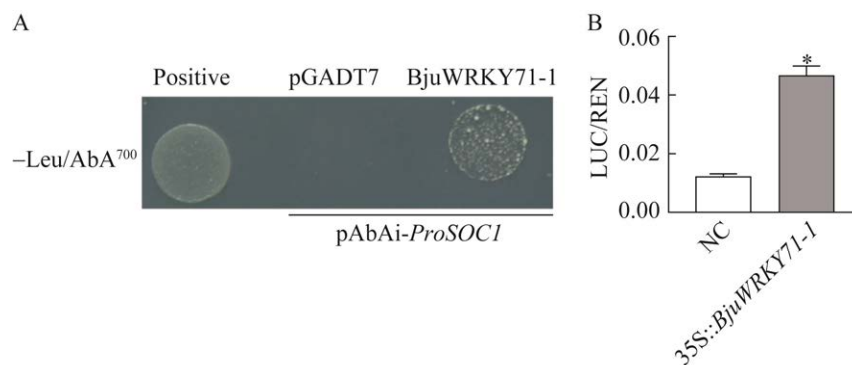


图6 BjuWRKY71-1与BjuSOC1启动子互作

Figure 6 Interaction between BjuWRKY71-1 proteins with *BjuSOC1* promoter. A: pGADT7-BjuWRKY71-1 was co-transformed into Y1H yeast strains in combination with pAbAi-Pro*BjuSOC1*. The transformed strains all grew on SD/-Leu selective medium containing AbA (700  $\mu$ g/L). B: The comparison of luciferase activity. The transcriptional activity of these infiltrated tobacco leaves based on the ratio of LUC to REN was investigated with a dual luciferase reporter gene assay kit. “\*” represents significance at  $P < 0.05$  comparing with Negative control (NC).

### 3 讨论与结论

#### 3.1 芥菜 *BjuWRKY71-1* 很可能通过靶向 *BjuSOC1* 促进开花

WRKY 蛋白家族参与了植物生长发育的许多过程, 包括成花转变。本研究克隆芥菜 *BjuWRKY71-1* 基因, 并分析了其表达模式: 在芥菜叶和花中的表达量高于茎, 且随着植株发育该基因的表达量逐渐升高(图 2B)。进一步分析发现, *BjuWRKY71-1* 蛋白定位在细胞核中。由此表明, 它可能作为核转录因子直接调控开花基因的表达从而参与开花调控(图 3)。为了进一步表征 *BjuWRKY71-1* 的生物学功能, 将其转入拟南芥中进行异源过表达, 发现 *BjuWRKY71-1* 过表达拟南芥植株相较于野生型具有明显的早花表型(图 4), 说明 *BjuWRKY71-1* 极有可能具有促进开花的功能。

已有研究表明 *SOC1* 是一个功能保守的开花整合子, 例如, 在拟南芥中, *AtSOC1* 涉及 3 个开花调控通路<sup>[14]</sup>, 并且水稻的 *SOC1* 同源物 *OsMADS50* 也是一个重要的开花促进因子<sup>[34]</sup>。

本研究通过酵母单杂交实验、双荧光素酶报告系统实验证明了 *BjuWRKY71-1* 能够直接结合到 *BjuSOC1* 的启动子区域, 并促进相关基因的转录。另外, 本研究还发现 *BjuWRKY71-1* 转基因株系中 *SOC1* 表达量显著高于野生型, 且表现出提早开花的表型, 这与上述 *BjuWRKY71-1* 与开花整合子 *SOC1* 相互作用的结果也相吻合。

已有报道表明, 在拟南芥中, *WRKY71* 也可通过激活 *FT* 和 *LFY* 从而促进开花<sup>[28]</sup>, 并且能够加速盐胁迫下的开花进程<sup>[27]</sup>, 此外 *WRKY71* 还可调控分枝和花序等<sup>[30]</sup>。这表明 *WRKY71* 确实可以参与开花调控。本研究发现芥菜 *BjuWRKY71-1* 是一个核定位蛋白, 并能够直接结合到 *BjuSOC1* 基因的启动子上以促进其下游基因的表达从而调控开花, 因此本研究在一定程度上解析了芥菜 *BjuWRKY71-1* 的生物学功能及其分子机制, 为芥菜的育种工作提供了一定的理论基础。但是芥菜 *BjuWRKY71-1* 除了能够直接靶向开花整合子 *BjuSOC1* 之外, 是否还能直接作用 *FT*、*LFY* 或 *FUL* 等其他开花相关基因呢? 这些有待后续深入研究。

### 3.2 芥菜 *BjuWRKY71-1* 及其成员很可能处于更复杂的开花调控网络

不同的开花调控途径由不同的因素所诱导,例如光周期开花途径的上游因素为日照,即植物能够感受不同的日照长度,并作出相应的反应以调节自身的成花转变。有研究表明,拟南芥 *AtWRKY71* 可能不参与光周期途径调控开花<sup>[28]</sup>,但是芥菜中是否也是如此还是未知的。因此,有必要进一步研究 *BjuWRKY71-1* 的上游调控因子及其诱导因素,这对于解析芥菜开花调控网络具有重要意义。

芥菜作为一种异源四倍体,其基因组中存在 5 个 *BjuWRKY71* 基因,它们各自具有何种生物学功能在很大程度上是未知的。与 *BjuWRKY71-1* 相比, *BjuWRKY71-4* 和 *BjuWRKY71-5* 在第一外显子处缺失部分序列,而 *BjuWRKY71-3* 缺失第一外显子、第一内含子和部分第二外显子序列,由此推测这几个成员与 *BjuWRKY71-1* 功能可能存在差异。而 *BjuWRKY71-2* 只在第一外显子处较 *BjuWRKY71-1* 多 21 bp,保守结构域未发生改变,由此推测 *BjuWRKY71-2* 与 *BjuWRKY71-1* 可能存在功能冗余。本研究发现芥菜 *BjuWRKY71-1* 具有促进开花的功能,这可能是通过促进开花基因 *BjuSOC1* 的表达来实现的。但这几个成员在调控芥菜开花中的功能及分子机制需要进一步分析。此外,有研究表明拟南芥 *WRKY71* 通过 *RAX* 基因参与了分枝发育<sup>[30]</sup>,那么芥菜 *BjuWRKY71* 同源基因是否也有与此类似的调控机制呢?在漫长的进化过程中,这些 *WRKY71* 同源基因是否发生了功能分化呢?这在很大程度上也是未知的。因此,研究不同 *BjuWRKY71* 基因的生物学功能及精细的分子机制,有助于更好地理解进化选择模式和解析芥菜的开花调控网络。这对于芥菜耐抽薹和晚开花的分子调控、种质创新及新品种选育等具有重要意义。

### REFERENCES

- [1] ANDRÉS F, COUPLAND G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13(9): 627-639.
- [2] DALLY N, XIAO K, HOLTGRÄWE D, JUNG C. The B2 flowering time locus of beet encodes a zinc finger transcription factor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(28): 10365-10370.
- [3] BLÜMEL M, DALLY N, JUNG C. Flowering time regulation in crops—what did we learn from *Arabidopsis*?[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 32: 121-129.
- [4] SIMPSON GG, DEAN C. *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time?[J]. *Science*, 2002, 296(5566): 285-289.
- [5] BLÁZQUEZ MA, AHN JH, WEIGEL D. A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature Genetics*, 2003, 33(2): 168-171.
- [6] AMASINO R. Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(10): 2553-2559.
- [7] HALLIDAY KJ, SALTER MG, THINGNAES E, WHITELAM GC. Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2003, 33(5): 875-885.
- [8] HAN P, GARCÍA-PONCE B, FONSECA-SALAZAR G, ALVAREZ-BUYLLA ER, YU H. *AGAMOUS-LIKE 17*, a novel flowering promoter, acts in a FT-independent photoperiod pathway[J]. *The Plant Journal*, 2008, 55(2): 253-265.
- [9] FORNARA F, de MONTAIGU A, COUPLAND G. SnapShot: control of flowering in *Arabidopsis*[J]. *Cell*, 2010, 141(3): 550-550.e2.
- [10] FREYTES SN, CANELO M, CERDÁN PD. Regulation of flowering time: when and where?[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2021, 63: 102049.
- [11] LEE J, OH M, PARK H, LEE I. SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates leafy[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2008, 55(5): 832-843.
- [12] KAUFMANN K, MELZER R, THEISSEN G. MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants[J]. *Gene*, 2005, 347(2): 183-198.
- [13] SAMACH A, ONOUCHI H, GOLD SE, DITTA GS, SCHWARZ-SOMMER Z, YANOFSKY MF, COUPLAND G. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*[J]. *Science*, 2000, 288(5471): 1613-1616.

- [14] LEE H, SUH SS, PARK E, CHO E, AHN JH, KIM SG, LEE JS, KWON YM, LEE I. The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*[J]. *Genes & Development*, 2000, 14(18): 2366-2376.
- [15] YU YC, QIAO LF, CHEN JC, RONG YH, ZHAO YH, CUI XK, XU JP, HOU XM, DONG CH. *Arabidopsis* REM16 acts as a B3 domain transcription factor to promote flowering time *via* directly binding to the promoters of *SOC1* and *FT*[J]. *The Plant Journal*, 2020, 103(4): 1386-1398.
- [16] LEE J, LEE I. Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(9): 2247-2254.
- [17] HOU XL, ZHOU JN, LIU C, LIU L, SHEN LS, YU H. Nuclear factor Y-mediated H3K27me3 demethylation of the *SOC1* locus orchestrates flowering responses of *Arabidopsis*[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4601.
- [18] HEPWORTH SR, VALVERDE F, RAVENSCROFT D, MOURADOV A, COUPLAND G. Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by *CONSTANS* and *FLC* *via* separate promoter motifs[J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(16): 4327-4337.
- [19] HELLIWELL CA, WOOD CC, ROBERTSON M, JAMES PEACOCK W, DENNIS ES. The *Arabidopsis* *FLC* protein interacts directly *in vivo* with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex[J]. *The Plant Journal*, 2006, 46(2): 183-192.
- [20] ISHIGURO S, NAKAMURA K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and  $\beta$ -amylase from sweet potato[J]. *Molecular and General Genetics* MGG, 1994, 244(6): 563-571.
- [21] RUSHTON PJ, SOMSSICH IE, RINGLER P, SHEN QJ. WRKY transcription factors[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(5): 247-258.
- [22] WANG HP, CHEN WQ, XU ZY, CHEN MF, YU DQ. Functions of WRKYs in plant growth and development[J]. *Trends in Plant Science*, 2023, 28(6): 630-645.
- [23] LI W, WANG HP, YU D. *Arabidopsis* WRKY transcription factors WRKY12 and WRKY13 oppositely regulate flowering under short-day conditions[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(11): 1492-1503.
- [24] PANDEY SP, SOMSSICH IE. The role of WRKY transcription factors in plant immunity[J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(4): 1648-1655.
- [25] ROSADO D, ACKERMANN A, SPASSIBOJKO O, ROSSI M, PEDMALE UV. WRKY transcription factors and ethylene signaling modify root growth during the shade-avoidance response[J]. *Plant Physiology*, 2022, 188(2): 1294-1311.
- [26] DI DW, SUN L, WANG M, WU JJ, KRONZUCKER HJ, FANG S, CHU JF, SHI WM, LI GJ. WRKY46 promotes ammonium tolerance in *Arabidopsis* by repressing *NUDX9* and indole-3-acetic acid-conjugating genes and by inhibiting ammonium efflux in the root elongation zone[J]. *The New Phytologist*, 2021, 232(1): 190-207.
- [27] YU YC, WANG L, CHEN JC, LIU ZH, PARK CM, XIANG FN. WRKY71 acts antagonistically against salt-delayed flowering in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2018, 59(2): 414-422.
- [28] YU YC, LIU ZH, WANG L, KIM SG, SEO PJ, QIAO M, WANG N, LI S, CAO XF, PARK CM, XIANG FN. WRKY71 accelerates flowering *via* the direct activation of *FLOWERING LOCUS T* and *LEAFY* in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2016, 85(1): 96-106.
- [29] HUANG RW, LIU DF, HUANG M, MA J, LI ZN, LI MY, SUI SZ. *CpWRKY71*, a WRKY transcription factor gene of wintersweet (*Chimonanthus praecox*), promotes flowering and leaf senescence in *Arabidopsis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(21): 5325.
- [30] GUO DS, ZHANG JZ, WANG XL, HAN X, WEI BY, WANG JQ, LI BX, YU H, HUANG QP, GU HY, QU LJ, QIN GJ. The WRKY transcription factor WRKY71/EXB1 controls shoot branching by transcriptionally regulating *RAX* genes in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(11): 3112-3127.
- [31] 袁玉辉, 王舸泓, 董浩然, 宋博文, 刘显军. 芥菜型油菜 WRKY71 转录因子基因家族的鉴定及表达分析[J]. *西北植物学报*, 2018, 38(10): 1801-1808.
- YUAN YH, WANG GH, DONG HR, SONG BW, LIU XJ. Identification and expression analysis of *WRKY71* transcription factor family gene in *Brassica juncea*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2018, 38(10): 1801-1808 (in Chinese).
- [32] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method[J]. *Methods (San Diego, Calif)*, 2001, 25(4): 402-408.
- [33] JANG JY, CHOI CH, HWANG DJ. The WRKY superfamily of rice transcription factors[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2010, 26(2): 110-114.
- [34] LEE S, KIM J, HAN JJ, HAN MJ, AN G. Functional analyses of the flowering time gene *OsMADS50*, the putative *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1/AGAMOUS-LIKE 20(SOC1/AGL20)* ortholog in rice[J]. *The Plant Journal*, 2004, 38(5): 754-764.

(本文责编 郝丽芳)