



引用格式: 文碧瑶, 彭喜旭, 田建红, 等. 苦荞 *FtWRKY28* 基因克隆及其在低磷与激素诱导下的表达分析[J]. 西北植物学报, 2024, 44(6): 0930-0937. [WAN B Y, PENG X X, TIAN J H, et al. Cloning and expression of the *FtWRKY28* gene from *Fagopyrum tataricum* under low phosphorus and hormone treatment[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2024, 44(6): 0930-0937.] DOI: 10.7606/j.issn.1000-4025.20230313

苦荞 *FtWRKY28* 基因克隆及其在低磷与激素诱导下的表达分析

文碧瑶¹, 彭喜旭^{1,2,3}, 田建红¹, 邬清韬¹, 王海华^{1,2,3*}, 唐新科^{1,2,3}

(1 湖南科技大学 生命科学与健康学院, 湖南湘潭 411201; 2 经济作物遗传改良与综合利用湖南省重点实验室, 湖南湘潭 411201; 3 重金属污染土壤生态修复与安全利用湖南省高校重点实验室, 湖南湘潭 411201)

摘要 【目的】WRKY 转录因子参与植物对低磷胁迫反应的调控。基于前期苦荞在低磷胁迫下的转录组数据, 克隆 *FtWRKY28* 基因, 预测基因及其编码蛋白的序列结构特征, 分析基因在各器官中以及在低磷和激素处理下的表达模式、蛋白的亚细胞定位与转录激活活性, 为阐明基因的生物学功能奠定基础。【方法】基于苦荞基因组数据库注释设计特异引物, 用逆转录 PCR 从低磷处理的苦荞根 RNA 样中克隆 *FtWRKY28* 的完整编码序列, 用生物信息学方法分析基因与蛋白的结构以及同源蛋白的进化关系, 用实时荧光定量分析基因的表达模式, 用拟南芥原生质体瞬时表达体系分析蛋白的亚细胞定位, 用酵母单杂交分析蛋白的转录激活活性。【结果】*FtWRKY28* 的完整编码序列长 876 bp, 编码 1 个含 291 个氨基酸、有 1 个 WRKY 结构域、锌指结构域为 C₂H₂ 型的蛋白, 归属 WRKY 家族 II 组。*FtWRKY28* 绝大部分定位于细胞核, 具有转录激活活性。*FtWRKY28* 在根中表达水平最高, 受低磷、吲哚乙酸、赤霉素 3 和 6-苊氨基嘌呤显著诱导。【结论】*FtWRKY28* 具有转录因子的基本结构与生物化学特征, 可能通过生长素、赤霉素、细胞分裂素信号网络的交互作用, 调控苦荞在低磷胁迫下的响应过程。

关键词 苦荞; 低磷胁迫; WRKY 基因; 基因表达; 结构预测; 生化特征

中图分类号 Q943.2; S517 文献标志码 A

Cloning and expression of the *FtWRKY28* gene from *Fagopyrum tataricum* under low phosphorus and hormone treatment

WEN Biyao¹, PENG Xixu^{1,2,3}, TIAN Jianhong¹,
WU Qingtao¹, WANG Haihua^{1,2,3*}, TANG Xinke^{1,2,3}

(1 School of Life and Health Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan, Hu'nan 411201, China; 2 Key Laboratory of Genetic Improvement and Multiple Utilization of Economic Crops in Hu'nan Province, Xiangtan, Hu'nan 411201, China; 3 Key Laboratory of Ecological Remediation and Safe Utilization of Heavy Metal-polluted Soils in Hu'nan Province, Xiangtan, Hu'nan 411201, China)

Abstract [Objective] WRKY transcription factors are involved in response to low phosphorus stress in plants. Based on transcriptome data of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) under low phosphorus stress, the aim of this study is to isolate *FtWRKY28* gene, to predict the structure of the gene and its de-

收稿日期: 2023-05-15; 修改稿收到日期: 2023-12-23

基金项目: 科技部国家重点研发计划项目(2017YFE0117600); 湖南省教育厅重点科研项目(19A176)

作者简介: 文碧瑶(1999-), 女, 在读硕士, 主要从事作物抗性生理与分子生物学研究。

* 通信作者: 王海华, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事作物抗性生理与分子生物学研究。

duced protein, to analyze the subcellular localization and transcription-activating activity, and to investigate gene expression in different organs under low phosphorus stress and hormone application, providing a basis for function identification of the gene. [Methods] Primer sequences were designed according to the Tartary buckwheat genome sequence. RT-PCR was used to amplify the CDS of *FtWRKY28* from the RNAs generated from Tartary buckwheat roots at low phosphorus. Bioinformatical tools were employed to analyze the structure of the gene and protein and the phylogenetic relationship of the homologous proteins. qRT-PCR was used to investigate gene expression pattern. Transient expression system of the *Arabidopsis* protoplast was used to analyze the subcellular localization of the protein. Yeast-one-hybrid was employed to analyze the transcription-activating activity of the protein. [Results] The obtained CDS of *FtWRKY28* was 876 bp in length, encoding a polypeptide of 291 amino acid residues consisting of one conserved WRKY domain with a zinc finger motif of C_2H_2 , belonging to WRKY group II. *FtWRKY28* was predominantly localized in nucleus, which had transcription-activating activity. The transcript abundance of *FtWRKY28* was relatively higher in roots, and was induced by low phosphorus and hormones such as indole acetic acid, gibberellin 3, and 6-benzylamino purine. [Conclusion] *FtWRKY28* has basic structural and biochemical characteristics of a putative transcription factor, and involves in response to low phosphorus, which may crosstalk with auxin, gibberellin, and cytokinin signaling networks.

Key words *Fagopyrum tataricum* Gaertn.; low phosphorus stress; WRKY gene; gene expression; structure prediction; biochemical characteristics

磷是植物生长发育必需的大量元素^[1],参与核酸、磷脂等分子形成,在能量转移、信号转导、光合作用、酶的激活等多种生物学过程中发挥重要作用^[2]。可溶性无机磷是植物从土壤中吸收磷的唯一形式^[3],其在土壤中的含量与土壤 pH 相关。在 pH<5 的酸性土壤中,大部分磷被 Fe^{3+} 和 Al^{3+} 固定,而在碱性土壤中的磷被 Ca^{2+} 固定^[4],释放非常缓慢。因此,土壤中可溶性无机磷十分有限,缺磷是作物生产中经常遇到的问题^[5]。为了应对低磷胁迫,促进对磷的摄取与同化,植物进化发展了一系列复杂的形态、生理与分子机制。譬如,改善根的构型,增加根的表面积;分泌有机酸,螯合土壤 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 和 Ca^{2+} ,或分泌磷酸酶以水解有机磷,促进无机磷的释放。植物对磷的吸收以及磷在不同器官或组织之间的转运与再分配依赖于不同磷酸盐转运体(phosphate transporters, PHTs)之间的协同作用,而 PHTs 基因的转录活性必须受到精确调控,以适应土壤环境中的磷水平^[1]。事实上,大部分 PHTs 基因受低磷诱导。同时,植物对低磷胁迫的应答通过复杂的信号网络来实现^[1],其中转录因子位于磷信号网络的关键节点,在 PHTs 基因和其他低磷响应基因的转录调控中发挥重要作用。WRKY 转录因子是植物中最大的转录因子家族之一。WRKY 蛋白含有 1 或 2 个 WRKY 结构域,结构域的 N 端有保守的 WRKYGQK, C 端为 CCHH 或 CCHC 锌指结构^[6]。已有研究发现,WRKY 蛋白能调控植物对低磷的响应,在其中扮演正、负调节子的角色。张飞萃发现,

低磷胁迫下,拟南芥 *AtWRKY28* 正调控 *PHO1* 的表达,提高磷从根部向冠部的转运能力^[7]。同样, *AtWRKY42* 正调控 *PHO1* 和 *PHT1;1* 的表达,维持组织细胞中的磷稳态^[8],增强低磷耐受能力。相反, *AtWRKY75* 是低磷耐性的负调节子。当 *AtWRKY75* 表达受到抑制时,拟南芥的侧根和根毛数显著增加,侧根变长,在低磷条件下促进对磷的摄取^[9]。

荞麦为蓼科(Polygonaceae)蓼属(*Fagopyrum*)的 1 年或多年生植物,是传统的药食同源作物,有苦荞(*Fagopyrum tataricum*)和甜荞(*Fagopyrum esculentum*) 2 个栽培种。荞麦营养丰富,氨基酸组成全面均衡,黄酮类物质含量丰富^[10]。荞麦适应性强,可种植于营养贫薄的边缘山地,其磷摄取能力是小麦的 10 倍^[11]。在低磷条件下,荞麦侧根分化明显,侧根数量和密度增加,根系表面积增大,分泌有机酸,这是荞麦适应低磷环境的重要原因^[12]。然而,其内在的分子机理知之甚少。为研究低磷胁迫下 WRKY 基因在苦荞中发挥的作用,前期对低磷处理下苦荞进行转录组分析,筛选获得一批表达显著上调的苦荞 WRKY 基因,推测它们可能在调控苦荞应对低磷胁迫的反应。通过逆转录 PCR,从苦荞根的 RNA 样品中克隆获得其中的 1 个基因——*FtWRKY28* (FtPinG0007458900.01)^[13]的 cDNA 序列;通过生物信息学分析预测基因和蛋白质的基本结构特征;用实时荧光定量 PCR 分析基因在低磷和生长素、细胞分裂素(cytokinin, CTK)、赤霉素(gibberellin, GA) 3 种低磷响应相关激素处理下的表达

谱;用酵母单杂交实验分析蛋白是否具有转录激活活性,旨在为 FtWRKY28 功能鉴定积累前期数据。

1 材料和方法

1.1 植物培养与处理

苦荞(*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)品种为‘品苦一号’,在温室中用营养土培养,培养条件参照文献[14]。挑选长势一致的生长 35 d 的植株,用无菌水小心洗净根部,转移至霍格兰培养液中培养 3 d,再转至低磷霍格兰培养液中进行低磷处理。激素处理采用在霍格兰培养液中加入相应激素的方法,吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、GA₃ 和 6-苄氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)的浓度分别为 30, 100, 100 μmmol/L^[15]。3 次生物学重复。处理 0, 12, 24, 48, 72 h 后收集根, -80 ℃ 保存, 用于 RNA 提取。

1.2 FtWRKY28 cDNA 分离

总 RNA 的提取采用 Plant Total RNA Extraction Kit 试剂盒(Biospin), 逆转录用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, 辽宁大连), 按说明书进行。用 Premier premier 6 设计特异引物(表 1)。PCR 扩增条件: 95 ℃、1 min; 95 ℃、15 s; 62 ℃、1 min, 32 个循环。用 1.0% 的琼脂糖电泳检测 PCR 产物。产物回收后, 与 pClone007 Versatile 载体连接, 测序验证(生工生物工程公司, 上海)。

1.3 序列分析

用 Protein BLAST(<http://ncbi.nlm.nih.gov>)检索蛋白质同源序列, 用 MEGA 11.0 构建系统进化树

(邻接法)。选取 *FtWRKY28* 起始密码子 ATG 上游 1.5 kb 作为启动子序列, 在 PLACE(<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>)中进行顺式元件预测。在 GSDS 网站(<http://gsds.gao-lab.org/>)中预测基因的内含子、外显子以及非翻译区结构。在 Prabi(<https://doua.prabi.fr/software/cap3>)中预测蛋白质的二级结构。在 MEME(<https://meme-suite.org/meme/>)中预测蛋白质的保守结构域, 在 Netphos3.1a(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)中预测蛋白质的磷酸化位点, 在 WoLF PSORT(<https://wolfpsort.hgc.jp/links.html>)中预测蛋白质在细胞中的定位情况。

1.4 亚细胞定位分析和转录激活活性分析

用 PCR 扩增 *FtWRKY28* 的完整编码序列(不含终止密码子), 重组至 pBluescript-1511 载体的绿色荧光蛋白(GFP)基因的 3' 端, 构建 pBS1511-GFP-WRKY28 载体。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, Col-0 生态型)培养、原生质体制备和瞬时表达采用 Pomeranz 等^[16]的方法, 用激光共聚焦显微镜(Olympus, FV1000, 日本)。叶绿体荧光和 GFP 荧光的激发波长分别为 640 nm 和 488 nm。

用酵母单杂交分析转录激活活性^[15]。

1.5 qRT-PCR 分析

qRT-PCR 反应体系配制与程序参照文献[14]。以 *FtHiston3* (HM628903.1) 作为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算相对表达量, 数据分析用 SPSS 27.0, 引物见表 1。

表 1 研究采用的引物
Table 1 Primers used in this study

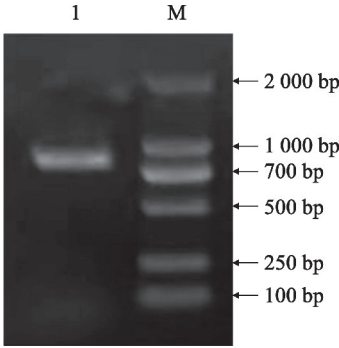
基因(登记号) Gene (accession number)	正向引物序列 Forward primer sequence (5'→3')	反向引物序列 Reverse primer sequence (5'→3')	用途 Use
FtWRKY28 (FtPinG0007458900.01)	AACTGCAGATGGGGTTTATGGAGTT-GCTAGG	CCGGAATTCATCTTCATTAACCCT-CATAAGGGAA	cDNA 克隆 cDNA cloning
	CGGAATTCATGGGGTTTATGGAGTT-GCTAGG (下划线为 <i>EcoR</i> I 酶切位点) Underline is the <i>EcoR</i> I enzymatic cleavage site.	ATTTGCGGCCGCTCAATCTTCATTA-ACCCTCATAAGGG (下划线为 <i>Not</i> I 酶切位点) Underline is the <i>Not</i> I enzymatic cleavage site.	转录激活分析 Analysis for transcription- activating activity
	caccATGGAGATAATAATTATAGCC	AAAAGATCCCTTCTGCTCATAG	亚细胞定位 Subcellular localization
FtHiston 3 (FtPinG0004454700.01)	ATGGGGTTTATGGAGTTGCTAGG	ATCTTCATTAACCCTCATAAGGGAA	qRT-PCR
	GAAATTCGCAAGTACCAGAAGAG	CCAACAAGGTATGCCTCAGC	qRT-PCR 内参 qRT-PCR internal reference

2 结果与分析

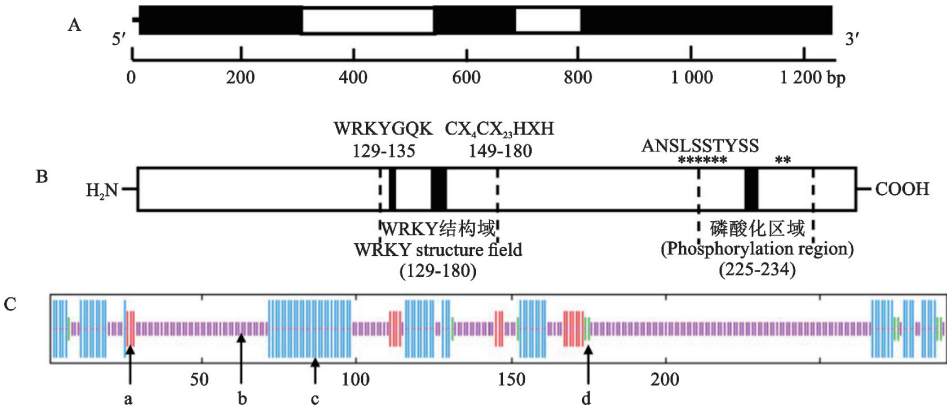
2.1 cDNA 序列的克隆与序列分析

用逆转录 PCR 扩增获得了 *FtWRKY28* cDNA 序列的特异条带(图 1)。割胶回收后,将其克隆至 pClone007 Versatile 载体中,经测序验证正确,片段长 876 bp,与预期大小一致。*FtWRKY28* 基因有 2 个内含子(图 2,A),编码 1 个由 291 个氨基酸组成的多肽,第 129—180 位为 WRKY 结构域。WRKY 结构域的 N 端为 WRKYGQK,C 端为 CX₇CX₂₃HXH 锌指(图 2,B),属于 WRKY 蛋白第 II 组^[6]。*FtWRKY28* 含有 62 个潜在的磷酸化位点,第 225—234 位 ANSLSSSTYSS 是磷酸化位点的密集区,该蛋白无典型的核定位信号,但预测定位在细胞核的可能性最大。*FtWRKY28* 蛋白含有 28.2%的 α -螺

旋、5.82%的延伸链、3.1%的 β -转角和 62.9%的无规则卷曲(图 2,C)。



1. 目的基因条带;M. 分子标记。
图 1 电泳检测 *FtWRKY28* cDNA 序列的 PCR 产物
1, band of target gene. M, molecular marker.
Fig. 1 Electrophoresis for PCR products
of *FtWRKY28* cDNA

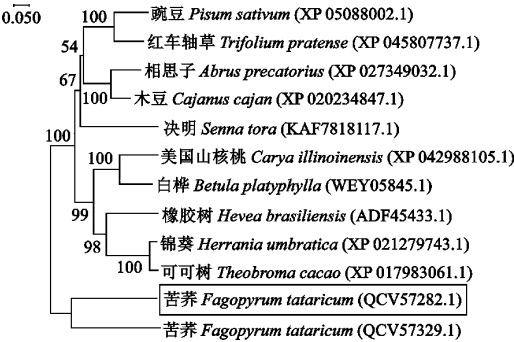


A. *FtWRKY28* 基因结构,内含子用白框表示,外显子用黑框表示,5'非翻译区用横线表示;B. *FtWRKY28* 蛋白结构。
*, *FtWRKY28* C-端的磷酸化作用位点;C. *FtWRKY28* 二级结构预测。a, b, c 和 d 分别代表延伸链、无规卷曲、 α -螺旋和 β -转角。

图 2 *FtWRKY28* 基因与编码蛋白质的结构

A. Structure of *FtWRKY28* gene. White and black boxes represent introns and exons, respectively. 5' untranslated region is indicated by a horizontal line. B. Structure of *FtWRKY28* protein. *, phosphorylation sites in the C-terminus of *FtWRKY28*. C. Secondary structure prediction of *FtWRKY28*. a, b, c, and d represent extended chains, random coils, α -helices, and β -turns, respectively.

Fig. 2 Structures of *FtWRKY28* gene and its deduced protein



分支上的数字表示自展值(Bootstrap)。 *FtWRKY28* 用方框标记。

图 3 *FtWRKY28* 与其同源蛋白的系统进化树

The numbers marked on the branches are bootstrap values.
FtWRKY28 is marked with a pane.

Fig. 3 Phylogenetic tree of *FtWRKY28* and
its homologous proteins

2.2 同源序列比对与进化树分析

FtWRKY28 (MK161275.1) 与 *FtWRKY23* (QCV57329.1)、三叶草(*Trifolium pratense*) *WRKY3* (XP 045807737.1) 和白桦(*Betula platyphylla*) *WRKY23* (WEY05845.1) 的同源性较高,序列同一性分别达到了 54.8%、51.6%和 50.7%。在系统发育树中,*FtWRKY28* 与 *FtWRKY23* (MK161322.1) 聚类在同一进化分支中(图 3),提示在后续的功能研究中,应注意两者可能存在的功能冗余。

2.3 亚细胞定位分析

拟南芥原生质体瞬时表达实验的结果表明,在单独表达 GFP 的原生质体中,其 GFP 信号分布于整个细胞;在表达 GFP-*WRKY28* 融合蛋白的原生质体

中,其 GFP 信号绝大部分分布于细胞核中,但在除液泡以外的细胞质中仍有极少量的零星分布(图 4),这与 FtWRKY28 的亚细胞定位预测结果是一致的。

2.4 转录激活活性分析

酵母单杂交的结果(图 5)表明,含 pBD-WRKY39(阳性对照)和 pBD-WRKY28 的酵母转化子能在 Trp-His-Ade 三缺培养基(含氨基三唑,AT)上生长

良好,而含空载体(pBD)的酵母转化子则不能生长,说明 FtWRK28 具有转录激活活性。

2.5 启动子顺式元件分析

如表 2 所示,*FtWRKY28* 基因的启动子含有较多的根、茎、叶肉等器官或组织表达元件,也含有较多的细胞分裂素响应元件(ARR1AT)和低磷响应元件(P1BS-like、EBOXBNNAPA 和 W-box)。

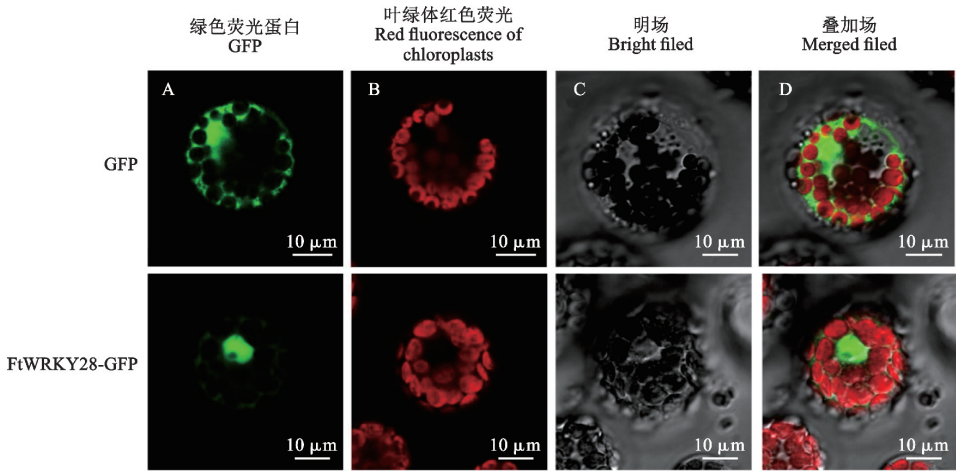


图 4 FtWRKY28 的亚细胞定位
Fig. 4 Subcellular localization of FtWRKY28

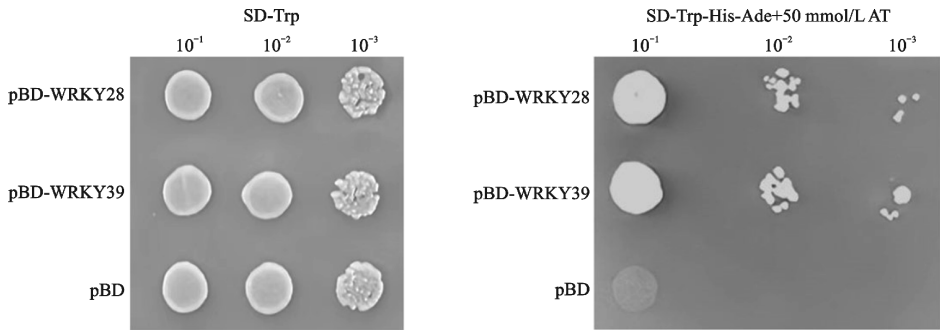


图 5 FtWRKY28 转录激活活性验证
Fig. 5 Transcription-activating activity of FtWRKY28

表 2 *FtWRKY28* 启动子中的顺式元件预测

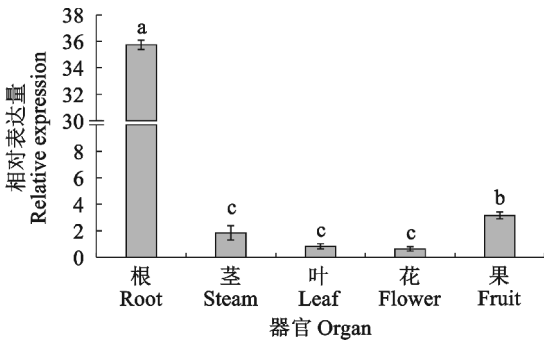
Table 2 Prediction of the *cis*-elements in the promoter of *FtWRKY28*

顺式元件名称 Name of <i>cis</i> -element	核心序列 Core sequence	可能的功能 Possible function	数目 Number
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	根表达元件 Root expression element	29
DOFCOREZM	AAAG	茎表达元件 Stem expression element	18
CACTFTPPCA1	YACT	叶肉表达元件 Mesophyll expression element	18
POLLEN1LELAT52	AGAAA	花粉和花药发育相关元件 Pollen and anther development element	5
NTBBF1ARROLB	ACTTTA	生长素响应元件 Auxin response element	1
GARE	TAACAAR	赤霉素响应元件 Gibberellic acid response element	1
ARR1AT	NGATT	细胞分裂素响应元件 Cytokinin response element	13
P1BS-like	GNATATNC	低磷响应元件 Low phosphorus response element	2
EBOXBNNAPA	CANNTG	低磷响应元件 Low phosphorus response element	6
W-box	TTGACY	低磷响应元件 Low phosphorus response element	5

2.6 *FtWRKY28* 表达的荧光定量 PCR 分析

FtWRKY28 在苦荞各器官中的表达情况表明,该基因在根中的表达量最高,其次是果中,在茎、叶、花中表达较低(图 6)。根是植物从土壤中吸收磷素和感受磷素信号的主要器官。生长素、CTK 和 GA 参与低磷胁迫下根构型的重建,包括初生根、侧根的生长和根毛的发生等。分析了苦荞根中 *FtWRKY28* 在低磷和 IAA、6-BA 和 GA₃ 处理下的表达变化趋势。

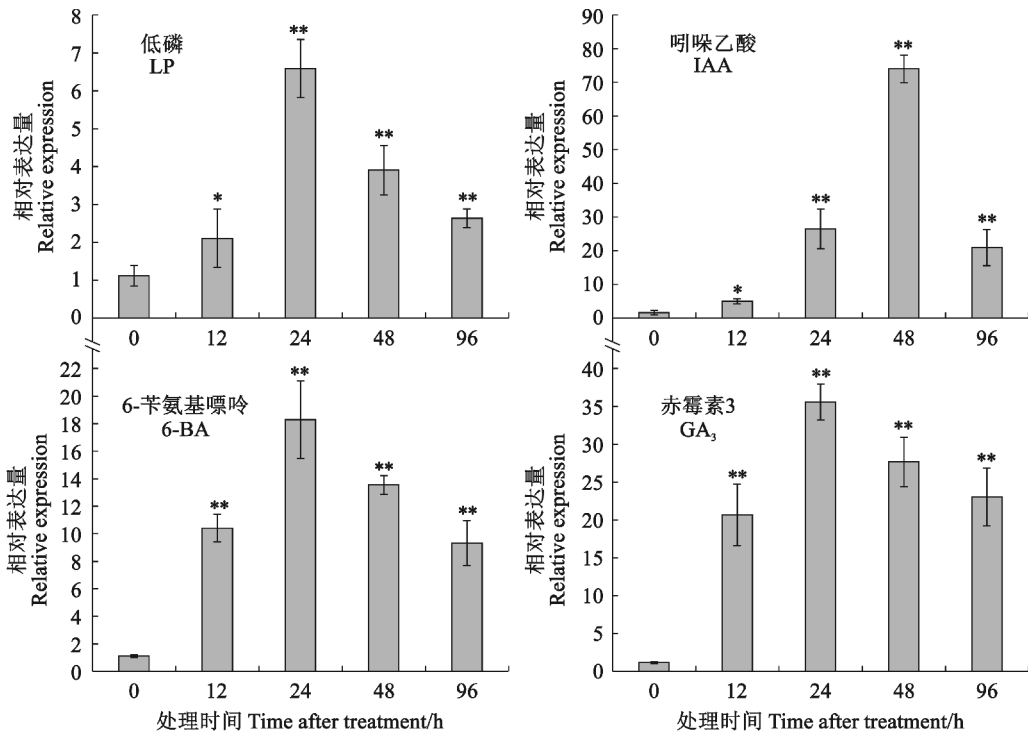
如图 7 所示,低磷条件下,*FtWRKY28* 的表达量显著上升,在处理 24 h 达到峰值,相较 0 h 升高了 5.9 倍。在 IAA、6-BA 和 GA₃ 处理下,*FtWRKY28* 的表达量也受显著诱导,在处理 48 h 或 24 h 达到峰值,分别上调了 46.9,16.4,30.4 倍(图 7)。上述结果显示,*FtWRKY28* 可能通过生长素、CTK 和 GA 激素信号途径的交互作用,参与苦荞对低磷的响应过程。



根、茎、叶、花和果在播种后 100 d 取样。试验重复 3 次,结果以平均值±标准差表示,不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著($n=5$,邓肯多重比较)。

图 6 *FtWRKY28* 在苦荞各器官中的表达差异分析
Roots, stems, leaves, flowers, and fruits were sampled 100 days after sowing. Three replicates of biological experiments were performed, and the results were expressed as mean ± standard deviation. Different lowercase letters indicate significant difference at the 0.05 level ($n=5$, Duncan's multiple range test).

Fig. 6 Differential expression of *FtWRKY28* in different organs of tartary buckwheat



试验重复 3 次,结果以平均值±标准差表示,*,** 分别表示在 0.05、0.01 水平差异显著。

图 7 *FtWRKY28* 在低磷、IAA、6-BA 和 GA₃ 处理下的差异表达分析

Three replicates of biological experiments were performed, and the results were expressed as mean ± standard deviation.

* and ** indicate significant difference at the 0.05 and 0.01 levels, respectively.

Fig. 7 Differential expression of *FtWRKY28* after the treatment of low phosphorus, IAA, 6-BA, and GA₃

3 讨论

植物对低磷的适应涉及一系列低磷响应基因的转录调控。转录因子通过与基因的启动子特异结

合,从而抑制或者激活低磷响应相关基因的转录,在植物低磷适应中扮演重要角色。目前,植物低磷响应中相关基因表达调控的机制仍不十分清楚。研究表明只有少数几类转录因子参与其中的调控过程,

如 MYB、WRKY、bHLH 等^[17]。关于 WRKY 基因响应低磷胁迫的研究在拟南芥^[7]、水稻^[18] 和大豆^[19]等植物中都有报道。苦荞具有较高的磷利用效率,预测其基因组拥有 78 个 WRKY 基因^[12],然而 WRKY 基因是否在苦荞对低磷胁迫的响应中发挥调节作用很少被关注。

FtWRKY28 具有转录因子的基本结构与生化特征。FtWRKY28 含 1 个 WRKY 结构域,具有 C₂H₂ 锌指(图 2),属于 WRKY 蛋白第Ⅱ组^[6]。FtWRKY28 虽无典型的核定位信号,但预测其定位在细胞核中几率最大,原生质体瞬时表达实验证实了 FtWRKY28 集中分布在细胞核中,这与课题组前期报道的 FtWRKY39^[14]类似。此外,FtWRKY28 富含 Ser 和 Thr 等磷酸化位点(图 2),提示其具有转录激活活性^[20],酵母单杂交实验(图 5)证实了这一点。

生长素、GA 和 CTK 等激素信号参与了植物在低磷胁迫下的根系形态构建^[21],其中转录因子发挥了中继和介导作用。朱毅勇等发现,在缺磷条件下白羽扇豆(*Lupinus albus*)排根大量形成与生长素(1-naphthaleneacetic acid, NAA)及其极性运输有关;NAA 信号途径中的 NAC1 转录因子的表达在排根初生、成熟和衰老过程中呈先上升、后下调的特征,且受上游 miR164 的负调控,说明低磷信号、NAC1、生长素信号与排根发育之间很可能组成了 1 个级联系统^[22]。Zhang 等发现,在低磷胁迫下的玉米根中,一方面生长素输入载体基因 *AUX1* 和输出载体基因 *PIN1a* 的表达被诱导,不同的 ARF 转录因子基因在根尖分生区和侧根发生区表现出表达上的差异;另一方面 GA 合成相关基因——*AN1*、*GA20ox1* 和 *GA20ox2* 的表达量上调,催化 GA 从活性转变为非活性形式的相关基因——*GA2ox1* 和 *GA2ox2* 表达量下调。上述结果显示,低磷胁迫下生长素和 GA 信号共同参与了植物根系的重构以及低磷适应过程^[23]。同时,植物低磷胁迫(包括磷饥饿)信号与激素信号之间存在交互作用,转录因子作为传递信号的组分,在其中充当重要角色。外源施加 6-BA 能缓解水稻对磷饥饿的反应,在宏观上表

现为根部和地上部分的磷含量均有显著增加,在微观上表现为磷饥饿响应信号的系统弱化^[24]。本研究中,低磷和外源 IAA、GA₃ 和 6-BA 处理显著诱导了苦荞根中 *FtWRKY28* 的表达,预示 FtWRKY28 可能通过生长素、赤霉素和细胞分裂素信号网络参与了苦荞对低磷胁迫的调控过程,且可能与根系结构的重构相关。笔者同样发现,低磷和外源 IAA、GA₃ 和 6-BA 也可诱导 *FtWRKY6* 的表达,但诱导的进程与程度存在一定差异^[15],今后需注意其与 FtWRKY28 在调节低磷反应中是否存在上、下游或功能上的(部分)重叠关系。

转录因子需要与启动子中的顺式元件特异性结合才能启动基因转录^[17]。预测表明 *FtWRKY28* 启动子含有多个根、茎、叶、花表达或发育相关元件、低磷响应元件和 CTK 等激素反应元件(表 2),推测低磷胁迫和激素可能调节 *FtWRKY28* 的表达,qRT-PCR 分析的结果(图 6、图 7)证实了该推测。WRKY 转录因子能够特异性结合 W-box^[7]。许多 WRKY 基因自身的启动子中含有 W-box^[10],*FtWRKY28* 基因本身就含有多个 W-box,推测 *FtWRKY28* 可能具有自我调节作用,或能与其他 WRKY 蛋白互作,但有待实验证实。

4 结 论

(1)从苦荞中克隆了 *FtWRKY28* 的完整编码序列,长为 876 bp,编码 1 个含 291 个氨基酸、具有 1 个 WRKY 结构域的蛋白,其锌指结构为 C₂H₂ 类型,归属 WRKY 家族Ⅱ组。

(2)*FtWRKY28* 在根中的表达量最高,受低磷、IAA、GA₃ 和 6-BA 激素显著诱导,推测可能通过这些激素信号的交互作用参与苦荞对低磷胁迫的响应。

(3) FtWRKY28 蛋白具有 WRKY 转录因子典型的结构特征和生化特征,其绝大部分定位于细胞核中,具有转录激活活性。目前已获得 *FtWRKY28* 在拟南芥中的异源超表达株系,将通过抗性生理实验以明确其在低磷胁迫响应中的调控功能。

参考文献:

[1] ZHANG Z L, LIAO H, LUCAS W J. Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, 56 (3): 192-220.

[2] ANAWAR H M, RENGEL Z, DAMON P, *et al.* Arsenic-phosphorus interactions in the soil-plant-microbe system: Dynamics of uptake, suppression and toxicity to plants[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 233: 1003-1012.

[3] GU M, CHEN A Q, SUN S B, *et al.* Complex regulation of

plant phosphate transporters and the gap between molecular mechanisms and practical application: What is missing? [J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(3): 396-416.

[4] PRATHAP V, KUMAR A, MAHESHWARI C, *et al.* Phosphorus homeostasis: Acquisition, sensing, and long-distance signaling in plants[J]. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(8): 8071-8086.

[5] 孟超敏, 耿翡翠, 卿桂霞, 等. 陆地棉低磷胁迫应答基因 *Gh-ERF5* 的克隆与表达分析[J]. 西北植物学报, 2023, 43(3): 382-388.

MENG C M, GENG F F, QING G X, *et al.* Cloning and expression analysis of phosphorus deficiency stress gene *GhERF5* in *Gossypium hirsutum* L. [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, 43(3): 382-388.

[6] JAVED T, GAO S J. WRKY transcription factors in plant defense[J]. *Trends in Genetics*, 2023, 39(10): 787-801.

[7] 张飞苹. 拟南芥 WRKY28 和 WRKY42 调控磷吸收和转运的机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.

[8] SU T, XU Q, ZHANG F C, *et al.* WRKY42 modulates phosphate homeostasis through regulating phosphate translocation and acquisition in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2015, 167(4): 1579-1591.

[9] DEVAIAH B N, KARTHIKEYAN A S, RAGHOTHAMA K G. WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(4): 1789-1801.

[10] 王霜, 雒晓鹏, 姚英俊, 等. 苦荞 R2R3-MYB 转录因子调控原花青素生物合成的研究[J]. 西北植物学报, 2019, 39(11): 1911-1918.

WANG S, LUO X P, YAO Y J, *et al.* Characterization of an R2R3-MYB transcription factor involved in the synthesis of proanthocyanidins from Tartary buckwheat[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, 39(11): 1911-1918.

[11] ZHU Y G, HE Y Q, SMITH S E, *et al.* Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) has high capacity to take up phosphorus (P) from a calcium (Ca)-bound Source [J]. *Plant and Soil*, 2002, 239(1): 1-8.

[12] AMANN C, AMBERGER A. Phosphorus efficiency of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) [J]. *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde*, 1989, 152(2): 181-189.

[13] HE X, LI J J, CHEN Y, *et al.* Genome-wide analysis of the WRKY gene family and its response to abiotic stress in buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J]. *Open Life Sciences*, 2019, 14: 80-96.

[14] 邬清韬, 王海华, 申权, 等. 苦荞麦叶斑病原诱导的 *FtWRKY39* 基因克隆、表达与生化特性分析[J]. 植物生理学报, 2021, 57(7): 1480-1490.

WU Q T, WANG H H, SHEN Q, *et al.* Cloning of leaf spot pathogen-induced *FtWRKY39* gene in *Fagopyrum tataricum* and analysis of its expression and biochemical characteristics[J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57(7): 1480-1490.

[15] 田建红, 彭喜旭, 邬清韬, 等. 苦荞麦 *FtWRKY6* 基因的克隆及其在低磷与激素诱导下根中的表达分析[J]. 华北农学报, 2023, 38(1): 32-39.

TIAN J H, PENG X X, WU Q T, *et al.* The cloning and expression analysis of *FtWRKY6* gene in roots of *Fagopyrum tataricum* treated by low phosphorus and hormones[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2023, 38(1): 32-39.

[16] POMERANZ M C, HAH C, LIN P C, *et al.* The *Arabidopsis* tandem zinc finger protein AtTZF1 traffics between the nucleus and cytoplasmic foci and binds both DNA and RNA[J]. *Plant Physiology*, 2010, 152(1): 151-165.

[17] CAI R H, DAI W, ZHANG C S, *et al.* The maize WRKY transcription factor ZmWRKY17 negatively regulates salt stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. *Planta*, 2017, 246(6): 1215-1231.

[18] DAI X Y, WANG Y Y, ZHANG W H. OsWRKY74, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(3): 947-960.

[19] LIU X Q, YANG Y M, WANG R Y, *et al.* *GmWRKY46*, a WRKY transcription factor, negatively regulates phosphorus tolerance primarily through modifying root morphology in soybean[J]. *Plant Science*, 2022, 315: 111148.

[20] LIU J Q, CHEN X J, LIANG X X, *et al.* Alternative splicing of rice *WRKY62* and *WRKY76* transcription factor genes in pathogen defense[J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(2): 1427-1442.

[21] KOU X H, ZHAO X Y, WU B D, *et al.* Auxin response factors are ubiquitous in plant growth and development, and involved in crosstalk between plant hormones: A review[J]. *Applied Sciences*, 2022, 12(3): 1360.

[22] 朱毅勇, 曾后清, 董彩霞, 等. 缺磷条件下白羽扇豆排根发育与生长素及 miR164 的关系[J]. 西北植物学报, 2010, 30(2): 317-322.

ZHU Y Y, ZENG H Q, DONG C X, *et al.* Relationships between auxin, miR164 and development of proteoid roots of white lupin under P deficiency[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 30(2): 317-322.

[23] ZHANG X R, WANG B M, ZHAO Y J, *et al.* Auxin and GA signaling play important roles in the maize response to phosphate deficiency[J]. *Plant Science*, 2019, 283: 177-188.

[24] WANG X M, YI K K, TAO Y, *et al.* Cytokinin represses phosphate-starvation response through increasing of intracellular phosphate level[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2006, 29(10): 1924-1935.