

核桃 WD40 转录因子 *JrATG18a* 基因的克隆及逆境响应

陈淑雯^{1,2}, 郝茜珣¹, 贾彩霞¹, 赵爱国¹, 李大培¹, 杨桂燕^{1,2}

(¹西北农林科技大学林学院/山阳核桃板栗试验示范站, 陕西杨凌 712100;

²西北农林科技大学林学院/陕西省经济植物资源开发利用重点实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要: WD40 转录因子在植物逆境响应中具有重要作用。本研究克隆获得核桃的一条 WD40 家族的自噬相关蛋白 (Autophagy-related protein) 18a 基因 (*JrATG18a*), 通过生物信息学和基因表达技术, 分析不同非生物及植物激素处理下 *JrATG18a* 基因的表达规律, 预测 *JrATG18a* 的基本生物功能。结果显示, *JrATG18a* 的开放阅读框 (ORF) 为 1371 bp, 编码蛋白含 456 个氨基酸, 分子量为 50.746 kD, 理论等电点为 5.97。与草莓、苹果、碧桃等具有较近的进化关系。其启动子含有热激响应 (HSE)、低温胁迫 (LTR)、水杨酸 (SA) 响应等相关元件。表达分析发现 *JrATG18a* 基因在热、寒、旱、SA、茉莉酸甲酯 (MeJA)、脱落酸 (ABA) 处理下能被不同程度的诱导, 且体现出根和叶的表达差异。这些结果表明, *JrATG18a* 基因能响应逆境参与核桃适应不良环境, 可作为核桃抗逆分子育种的重要候选基因。

关键词: 核桃; WD40 转录因子; 自噬蛋白; 基因表达; 非生物逆境胁迫

Identification and Stress Response Analysis of a WD40 Transcription Factor *JrATG18a* Gene from *Juglans regia*

CHEN Shu-wen^{1,2}, HAO Xi-xun¹, JIA Cai-xia¹, ZHAO Ai-guo¹, LI Da-pei¹, YANG Gui-yan^{1,2}

(¹College of Forestry, Northwest A & F University/Walnut and Chestnut Experiment Station of Shanyang, Shaanxi Yangling 712100;

²College of Forestry, Northwest A & F University/Key Laboratory of Economic Plant Resources Development and Utilization in Shaanxi Province, Shaanxi Yangling 712100)

Abstract: The WD40 protein, also known as WD-repeat protein, contains 6-16 copies of the conserved domain, starting from Gly-His to tryptophan-aspartate (Trp-Asp, WD). The WD40 protein contains numerous members and composed a transcription factor (TF) family that plays important roles in plant responses to stress stimulus. Autophagy-related protein is a type of WD40 TF involved in a variety of life activities such as plant growth, development, metabolism and response to adverse stimulus. However, the biological function of WD40 protein, especially the autophagy-related protein, was analyzed often in herbaceous plants, and its role on woody trees (e. g. walnut) remained poorly illustrated. In order to better explore the resistance mechanism of walnut tree to abiotic stresses, here an autophagy-related protein 18a (*ATG18a*) gene that belongs to WD40 TF was isolated from *Juglans regia* L. (referred *JrATG18a*). The *JrATG18a* gene contains a 1371-bp open reading frame (ORF) that putatively encodes 456 amino acids, with a predicted molecular weight of 50.746 kD and a theoretical isoelectric point of 5.97. The phylogenetic analysis revealed that *JrATG18a* grouped with the ATG proteins from *Fragaria vesca* L., *Malus domestica* (Suckow) Borkh., and *Prunus persica* (L.) Batsch. The predicted three-dimensional structure of *JrATG18a* protein is similar to that of strawberry FvATG18a and apple MdATG18a, implying that *JrATG18a* may share similar functions with FvATG18a and

收稿日期: 2018-01-21 修回日期: 2018-02-09 网络出版日期: 2018-06-12

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180612.0935.001.html>

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2018JQ3066); 中国博士后科学基金特别资助项目 (2017T100782); 中央高校基本科研业务费项目 (2452016057, 2452015171)

第一作者研究方向为野生植物资源利用。E-mail: 1486526955@qq.com

通信作者: 杨桂燕, 研究方向为林木遗传育种、野生植物资源利用。E-mail: yangguiyan@yahoo.com

MdATG18a. The 2090 bp upstream promoter segment contained several abiotic stress response *cis*-elements, such as heat shock element (HSE), low temperature response (LTR), and salicylic acid (SA). By quantitative real time PCR (qRT-PCR), the expression profiles of *JrATG18a* in root and leaf were analyzed, and this gene was inducible under heat, cold, drought, SA, MeJA, ABA treatments. These results suggested that *JrATG18a* might be involved in the response to abiotic stress in walnut, and possibly *JrATG18a* is an effective candidate gene for walnut molecular breeding.

Key words: *Juglans regia* L.; WD40 transcription factor; autophagy-related protein; gene expression; abiotic stress

WD40 蛋白又称作 WD 重复蛋白 (WD-repeat protein), 蛋白分子含有 6 ~ 16 拷贝的保守域, 序列从甘氨酸-组氨酸 (Gly-His) 起始, 至色氨酸-天冬氨酸 (Trp-Asp, WD) 结尾^[1]。WD40 蛋白最早在哺乳动物的异源 G 蛋白中发现, 广泛存在于真核生物, 在细菌和蓝藻中也有发现, 但数量较少^[2-3]。目前, 研究发现 WD40 蛋白参与细胞分裂、跨膜信号转导、物质运输、mRNA 修饰、花发育、开花等过程^[4-5]。如, 华静静等^[6]认为 WD40 蛋白是植物花青素苷生物合成途径中的调控因子之一, 且在紫苏 (*Perilla frutescens* (L.) Britton)^[7]、苹果 (*Malus pumila* Mill.)^[8]等植物中均分离鉴定出了具有类似功能的 WD40 蛋白。近些年来, 有研究表明 WD40 蛋白参与植物的非生物胁迫响应, 如, 李洁^[9]通过克隆棉花 (*Gossypium hirsutum* L.) *Gh-WD40* 基因在拟南芥中表达发现 *Gh-WD40* 能调控盐和干旱胁迫响应并起到负调控作用; 李宝燕^[10]在烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 中克隆得到的 *NiTTG2* 基因含有 5 个 WD40 结构域, *NiTTG2* 在根、茎、叶、花中均有所表达, 且 *NiTTG2* 能通过生长素和水杨酸交叉调节作用协调烟草生长和抗病。

自噬相关蛋白 (Autophagy-related protein) 是 WD40 转录因子中的一类, 参与植株生长、发育、代谢等多种生命活动。如, 细胞质甘油-3-磷酸脱氢酶与 ATG3 相互作用以负调节自噬和免疫^[11]; *OsATG7* 是水稻 (*Oryza sativa* L.) 后期花药发育中自噬依赖性脂质代谢所必需的^[12], 表达谱及半定量 RT-PCR 分析表明, *OsATG6* 基因参与非生物胁迫 (热、冷和干旱) 和激素 (脱落酸) 反应^[13]; 野生小麦 (*Triticum aestivum* L.) *TdATG8* 能参与干旱和渗透胁迫响应^[14]。但目前对 WD40 蛋白的研究以草本植物为主, 在木本植物中的研究较少。本研究以重要木本油料植物核桃 (*Juglans regia* L.) 为研究试材, 克隆获得 1 条自噬相关蛋白基因 (*JrATG18a*), 以期通过分析其生物信息及逆境胁迫下的表达模式, 探讨 *JrATG18a* 基因的生物学功能, 为揭示核桃抗逆适应机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

以 2 年生香玲核桃同源嫁接盆栽苗为试材。胁迫处理包括 42 °C (高温)、5 °C (低温)、干旱 (20% PEG₆₀₀₀)、2 mg/L 水杨酸 (SA)、0.1 mmol/L 脱落酸 (ABA) 及 100 mg/L 茉莉酸 (JA)。干旱、SA、ABA 及 JA 胁迫均使用浇灌根部的方法进行处理, 且在胁迫时间内植株托盘有足够溶液保证处于胁迫状态。每个处理分别在 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 取样, 非处理植株为对照。分别收集各处理时间点的根和叶, 用液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱备用。每个处理设置 3 次重复, 每个重复包含 9 棵植株。

1.2 *JrATG18a* 基因的克隆与分析

以“WD40”为关键词在香玲核桃转录组中查找 *WD40* 基因, 并根据注释进行分类, 经 Blast 比对选取其中 1 条属于自噬蛋白亚家族的 *18a* 基因, 命名为 *JrATG18a* 进行分析。用 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 确定 *JrATG18a* 基因的开放读码框 (ORF), 根据 ORF 两端序列设计引物 *JrATG18a-F* 和 *JrATG18a-R* (表 1), 进行 PCR 扩增。扩增产物经纯化后与 pMD-18-T 载体连接并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆进行菌液 PCR 及测序确认。利用 Expasy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对确认的 *JrATG18a* 基因序列特征进行分析。利用 BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 进行序列同源性搜索; 利用 Clustal 3.0 软件对不同物种的 WD40 进行进化分析。使用 plantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析该基因启动子中含有的顺式作用元件。利用 Expasy 中 Swiss Model (<https://www.swissmodel.expasy.org/interactive>) 程序同源建模, 推测该蛋白的三维结构模型。

1.3 *JrATG18a* 基因的表达分析

各样品总 RNA 采用 CTAB 方法提取, RNA 经 DNA 消化酶处理后采用 PrimeScriptTM RT reagent Kit (CWBIO, 康为世纪, 中国) 反转录为 cDNA, 稀释

10 倍后用作实时荧光定量 RT-PCR (qRT-PCR) 的模板,内参 (*18S rRNA* 基因) 引物同前所述^[15]。qRT-PCR 使用 SYBR Green Real time PCR Master mix (CWBO) 进行。qRT-PCR 定量引物为 DL-F 和 DL-R (表 1)。定量反应仪器为 Applied Biosystems 生产的

StepOne™ Real-Time PCR System。反应程序为:94 ℃ 预变性 30 s;94 ℃ 变性 12 s,60 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,45 个循环;81 ℃ 读板 1 s,每个样品重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对定量结果进行相对分析^[16],相对表达水平为相对于内参基因及对照的表达值。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
18S rRNA	5'-GGTCAATCTTCTCGTTCCCTT-3'	5'-TCGCATTTTCGCTACGTTCTT-3'
<i>JrATG18a</i> -F/R	5'-ATGGCCACCCTCTCTACC-3'	5'-TCAGAAAGTTTCTTCTGG-3'
DL-F/R	5'-CATGACCACGATCAGAAC-3'	5'-CGAAACGGATCGCAGTTG-3'

2 结果与分析

2.1 *JrATG18a* 基因全长 cDNA 序列分析

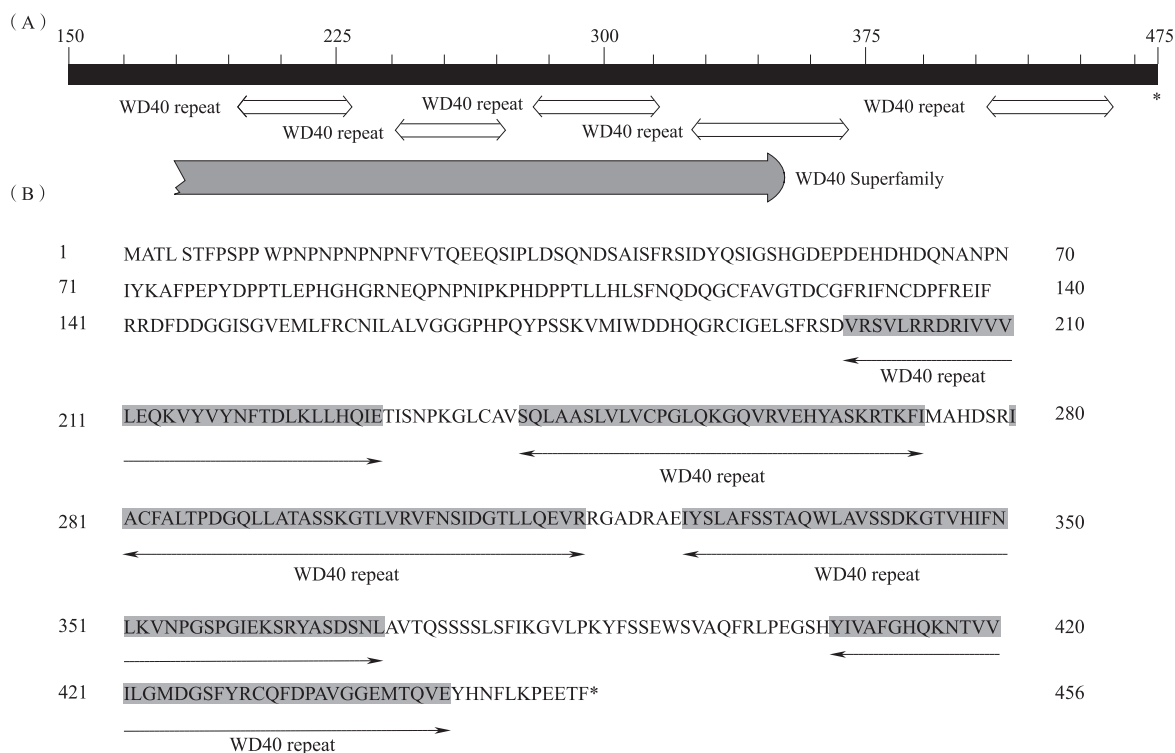
以核桃 cDNA 为模板,核桃转录组查找序列为依据,经 PCR 法克隆获得 1 条自噬相关蛋白 *18a* 基因,即 *JrATG18a*。*JrATG18a* 基因 ORF 长 1371 bp (图 1),编码的蛋白包含 456 个氨基酸,分子量为 50746.05 D,理论等电点为 5.97。BLAST 发现该基因与核桃基因组中登录号为 XM_018979918.1 的基

因一致。该蛋白含有 5 个 'WD40 repeat' 保守结构域,位于多肽的 178 ~ 352 氨基酸之间(图 2)。与草莓 (*Fragaria vesca* L.)、苹果 (*Malus domestica* (Suckow) Borkh.)、碧桃 (*Prunus persica* (L.) Batsch)、樱桃 (*Prunus avium* (L.) L.) 等具有较近的进化关系(图 3)。通过 Swiss Model 程序同源建模,推测该蛋白的三维结构如图 4 所示,与草莓 FvATG18a 及苹果 MdATG18a 的蛋白三维结构相似,推测 *JrATG18a* 与 FvATG18a 及 MdATG18a 具有相似功能。

1	ATGGCCACCC	TCTCTACCTT	CCCATCCCCG	CCCTGGCCTA	ACCCTAAACC	TAATCCAAAC
61	OCTAATTTTG	TCACTCAAGA	GGAACAGTCT	ATTCCCTCG	ACTCTCAGAA	CGATTGCGCC
121	ATATCTTTCC	GATCAATTGA	TTACCAATCT	ATTGGATCC	ATGGGACGCA	ACCTGACGAA
181	CATGAOCCAG	ATCAGAACGC	TAACCTAAC	ATCTACAAGG	CGTTTCGGGA	GCCATATGAT
241	COGCCAACGC	TTGAACCCCA	TGGCCATGGC	CGTAACGAGC	AGCCTAATCC	TAACATCCCC
301	AAGCCGCATG	ATCCACCACG	CCTGCTCCAC	CTGTCGTTCA	ACCAGGAACCA	GGGGTGCTTC
361	GCCGTGGGTA	CTGACTGCGG	GTTCCGGATT	TTCAACTGCG	ATCCGTTTCG	CGAGATCTTC
421	CGCCGGGACT	TCGACGACGG	GGGGATCTCC	GGAGTAGAGA	TGCTCTTTCC	GTGCAACATC
481	CTGGCTCTCG	TCGGCGGGGG	ACCCACCCCT	CAGTACCCAT	CAAGCAAGGT	CATGATTTGG
541	GATGACCACC	AGGGCCGCTG	CATCGGCGAG	CTCTCTTTTC	GCTCCGACGT	CCGCTCCGTA
601	CGGCTGCGCC	GCGACAGGAT	CGTCGTCGTA	CTGGAGCAGA	AGGTCTACGT	GTACAACCTT
661	ACCGACTTGA	AGTTGCTCCA	CCAAATTGAG	AOCATCTCGA	ACCCTAAGGG	CCTATGCGCG
721	GTATCCCAAC	TGGCGGCGTC	GTTGGTCCTG	GTCTGCCCGG	GGTTGCAGAA	AGGACAAGTT
781	CGGGTCGAGC	ACTATGCTTC	GAAGAGAAOC	AAGTTTATCA	TGGCGCACGA	CTCGAGGATT
841	GCCTGCTTCG	CGCTCACGCC	GGAOGGGCAG	TTGCTGCTTA	CGGCGAGCTC	CAAGGGCACT
901	CTGGTCCGGG	TTTTCAATAG	CATCGACGGA	ACACTTCTTC	AAGAGGTTAG	GAGGGGTGCA
961	GATAGAGCAG	AGATCTACAG	CTTAGCATTG	TCTTCAACAG	CCCAGTGGTT	GGCAGTCTCA
1021	AGTGACAAGG	GAACCGTCCA	CATTTTAAAC	CTTAAGGTTA	ATCCTGGATC	ACCTGGGATT
1081	GAGAAGTCAC	GATATGCATC	TGATTCTAAT	CTTGCTGTTA	CACAATCAAG	CTCATCTCTC
1141	TCTTTCATTA	AGGGAGTGTT	GCCAAAGTAT	TTTAGCTCAG	AGTGGTCGGT	TGCACAGTTC
1201	CGCTTGCCCTG	AGGGTTCTCA	TTACATTGTT	GCTTTTGGTC	ACCAAAAAAA	TACAGTGTTA
1261	ATTCTTGGCA	TGGATGGAAG	CTTCTATCGC	TGTCAATTTG	ACCCAGCAGT	TGGAGGAGAG
1321	ATGACGCAAG	TGGAATATCA	CAACTTCTTA	AAGCCAGAAG	AAACTTCTCG	A

图 1 *JrATG18a* 基因的开放读码框序列

Fig. 1 The ORF sequence of *JrATG18a* gene



A: WD40 的位置分布; B: WD40 氨基酸分布

A: The sites of WD40 domain, B: The distribution of the WD40 amino acids

图 2 JrATG18a 蛋白的 WD40 结构域分布

Fig. 2 The conserved WD40 domains of JrATG18a protein

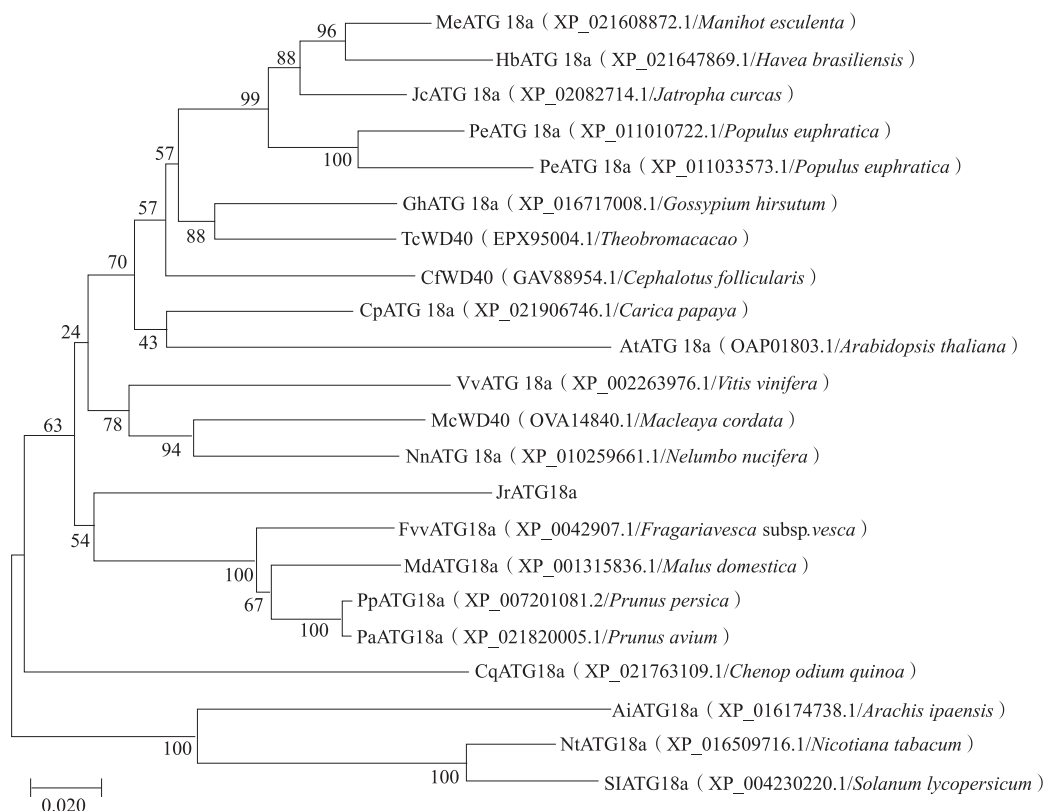


图 3 JrATG18a 与其他物种相似蛋白的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of JrATG18a with other ATG18a-like proteins from different species



图 4 *JrATG18a* 蛋白三维结构
Fig. 4 The predicted three-dimensional structure of *JrATG18a* protein

表 2 *JrATG18a* 启动子中的主要顺式作用元件

Table 2 The main *cis*-acting elements in the *JrATG18a* promoter

顺式作用元件 <i>Cis</i> -element	起始位点(方向) Start site/bp(direction)	序列 Sequence	特性 Characteristic
5UTR Py-rich stretch	400(-)/1147(+); 1479(+)/1475(+)/1487(+)/ 1471(+)/1483(+)	TTTCTTCTCT; TTTCTCTCTCTCTC	赋予高表达水平 conferring high transcription levels
AACA_motif	1161(+)	TAACAAACTCCA	胚乳特异负表达 endosperm-specific negative expression
Skn-1_motif	660(+)	GTCAT	胚乳表达 endosperm expression
ARE	761(+)	TGGTTT	厌氧诱导 essential for the anaerobic induction
Box III	107(-)	CATTTACACT	蛋白结合位点 protein binding site
Box-W1	626(+)	TTGACC	真菌诱导 fungal elicitor responsive element
CAT-box	578(-)	GCCACT	分生组织表达 meristem expression
OCT	1251(-)	CGCGGATC	茉莉酸响应 MeJA-responsiveness
CGTCA-motif	659(+)	CGTCA	乙烯响应 ethylene-responsive element
TGACG-motif	659(-)	TGACG	赤霉素响应 gibberellin-responsive element
ERE	966(+)/1075(+)	ATTTCAAA	热胁迫响应 heat stress responsiveness
GARE-motif	1278(-)	AAACAGA	低温胁迫响应 low temperature responsiveness
P-box	788(+)	CCTTTTG	防卫及胁迫响应 defense and stress responsiveness
HSE	2749(+)	AAAAAATTTT	
LTR	128(+)	CCGAAA	
TC-rich repeats	135(-)	GTTTTCTTAC	

2.2 *JrATG18a* 基因启动子分析

从 NCBI 数据库中获得 *JrATG18a* 基因起始密码子上游 2090 bp 的 DNA 序列进行启动子生物信息学分析,PlantCare 预测显示,*JrATG18a* 启动子中除了 TATA-box、CAAT-box 等核心或常见元件外,还包含多个与逆境响应及激素调控相关的顺式作用元件,如热激响应元件(HSE)、低温胁迫元件(LTR)、水杨酸(SA)及茉莉酸甲酯(MeJA)响应元件等(表 2),推测其具有调控 *JrATG18a* 基因参与逆境刺激的能力。

2.3 非生物胁迫下 *JrATG18a* 基因的表达模式

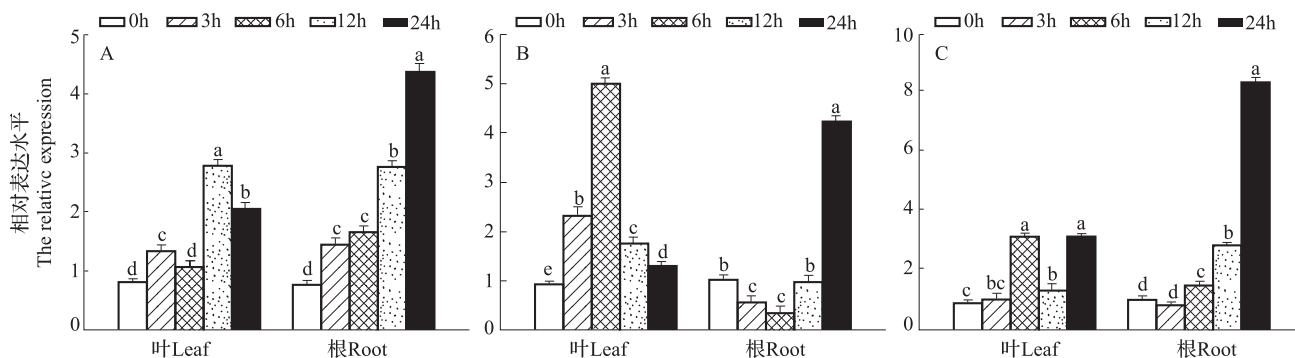
通过 qRT-PCR 技术分析 *JrATG18a* 基因在热、寒、旱 3 种非生物胁迫下的表达水平,有利于预测

表 2(续)

顺式作用元件 <i>Cis-element</i>	起始位点(方向) Start site/bp(direction)	序列 Sequence	特性 Characteristic
TCA-element	401(+)	GAGAAGAATA	水杨酸响应 salicylic acid responsiveness
as-2-box	110(+)	GATAATGATG	芽特异表达及光响应 shoot-specific expression and light responsiveness
circadian	116(-)/722(-)	CAANNNNATC	生物钟控制 circadian control
I-box	61(-)	GATAAGGTC	光响应
Box I	967(+)/1076(+)	TTTCAAA	part of a light responsive element
CATT-motif	469(+)/680(+)	GCATTC	
GATA-motif	63/743(-)	AAGGATAAGG	
ATCT-motif	1245(-)	AATCTAATCC	
G-box	705(-)	CACGTC	
ACE	1110(-)	AAAACGTTTA	
TCT-motif	776(+)/989(+)	TCTTAC	
chs-CMA1a	991(+)	TTACTTAA	
Sp1	631(+)/711(-)	CC(G/A)CCC	

JrATG18a 基因响应热、寒、旱等刺激的功能。结果显示, *JrATG18a* 基因能被高温、低温及干旱胁迫不同程度地诱导, 不同胁迫时间下, 在叶和根中的表达水平存在显著差异; 在同一时间点, 其在叶和根中的表达水平具有差异性, 体现了 *JrATG18a* 基因在高温、低温及干旱胁迫响应中具有时间表达及组织表达特异性(图 5)。具体来说, 在高温(45 °C)胁迫下, *JrATG18a* 基因被诱导表达, 在叶中胁迫 12 h 上调最大, 为对照的 2.78 倍; 在根中的表达水平随胁迫时间延长而增强, 在 24 h 最大, 为对照的

4.37 倍(图 5A)。低温胁迫下, *JrATG18a* 在根和叶中的表达趋势相反, 胁迫 6 h 时, 在叶中的表达达到最大值, 为对照的 4.99 倍; 而在根中的最小值出现在 6 h, 为对照的 32.61%, 最大值出现在 24 h, 为对照的 4.24 倍(图 5B)。干旱胁迫下, 在胁迫 3 h 情况下, *JrATG18a* 基因的转录水平被抑制低于或近于对照, 当胁迫时间高于 3 h 后, 则被明显诱导。叶中 6 h 和 24 h 的表达相近, 分别为对照的 3.02 倍、3.05 倍; 根中 24 h 表达最大, 为对照的 8.32 倍(图 5C)。



A: 高温胁迫; B: 低温胁迫; C: 干旱胁迫; 误差来自于 qRT-PCR 的 3 次重复。

图中小写字母表示在同一组织中各个时间点之间的差异显著性 ($P < 0.05$)。下同

A: Heat stress, B: Cold stress, C: Drought stress, error bars were obtained from three biological replicates of qRT-PCR. The lowercase mean the significant differences ($P < 0.05$) among the different treatment time points in the same tissue. The same as below

图 5 *JrATG18a* 基因在非生物胁迫下的表达水平

Fig. 5 Expression of *JrATG18a* gene under abiotic stresses

2.4 *JrATG18a* 基因响应外源激素的表达模式

JrATG18a 基因的转录表达受外源激素影响,且也体现了时空表达特性和组织表达特性(图 6)。SA 处理下,*JrATG18a* 基因在叶中的表达在 6 h 表达最低,为对照的 69.73%;最大值在 24 h,为对照的 6.96 倍。在根中的表达比较稳定,为对照的 2.13 ~ 2.38 倍(图 6A)。JA 处理下,在叶中的表达呈“N”

字形变化,在根中的表达呈倒“V”字形变化。在叶和根中的最大表达水平分别为对照的 4.63 倍、66.10 倍(图 6B)。ABA 处理下,*JrATG18a* 基因在叶和根中的表达趋势相似,即均随着胁迫时间的延长而增高,到 24 h 达到最大值,分别为对照的 11.13 倍、11.63 倍(图 6C)。

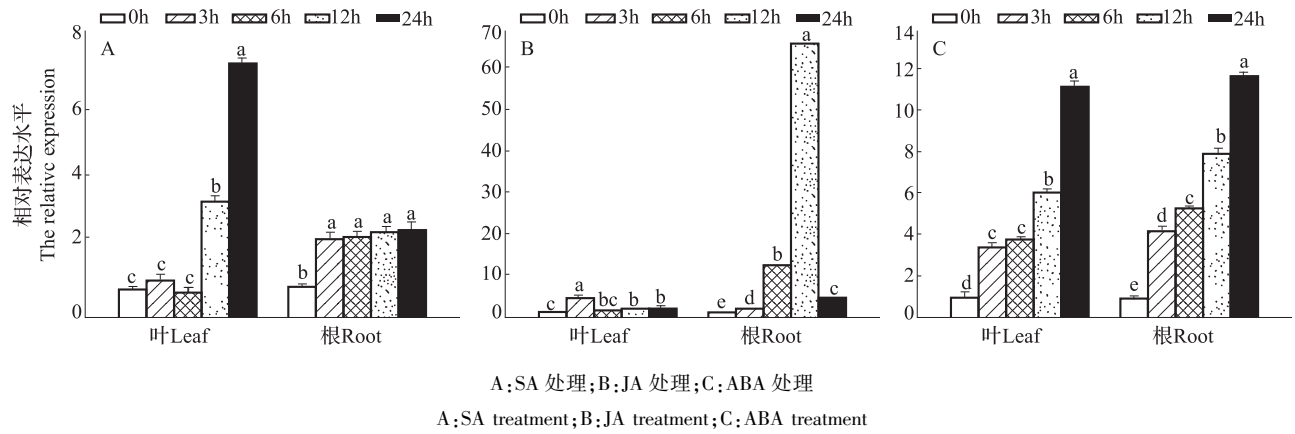


图 6 *JrATG18a* 基因在激素处理下的表达水平

Fig. 6 Expression of *JrATG18a* under hormone treatments

3 讨论

核桃是我国主要经济树种之一,也是构成我国多地扶贫攻坚项目的重要树种之一,在推动区域经济发展上具有重要作用。但近年来全球环境的变化,环境因子特别是西北地区越冬入春出现的“倒春寒”及夏秋核桃成熟期严重的高温干旱等气候现象,严重制约了核桃产业的发展。因此,筛选核桃逆境响应重要基因,研究其逆境响应功能机制,选育抗逆优良核桃品种将对推进我国核桃产业的总体效益起到重要作用。而目前有关核桃抗逆适应分子机制方面的研究鲜见报道,挖掘抗逆响应相关基因进行适应机制探索,亟待进行。在前期研究中,我们克隆获得了一些核桃逆境响应相关基因,包括 WD40 类转录因子。WD40 是一个超家族,包含不同的亚类,与植株的生长、发育等过程密切相关,也与植株响应逆境的调控有关^[4]。其中自噬蛋白亚家族在植物逆境响应中的作用明显。本研究中获得 1 个核桃 WD40 转录因子,通过多序列比对和进化分析发现其属于自噬蛋白亚家族 18a 类似物,因此命名为 *JrATG18a*。在进化上与苹果、樱桃等的 ATG 蛋白相近,推测其可能与这些蛋白具有相似功能。

启动子通常包含多种不同的顺式作用元件,与

调控基因功能有关。如,柞柳 *ThVHAc1* 基因启动子包含有 WRKY、MYB、DOF 等与逆境响应相关的元件,经分析发现,上游调控因子通过识别这些元件调控 *ThVHAc1* 的抗逆功能^[17]。玉米 *ZmCIPK10* 和 *ZmZIP71* 基因启动子序列中含有 ABA、SA、低温等相关顺式作用元件,在盐、干旱、低温胁迫下,*ZmCIPK10* 和 *ZmZIP71* 的表达量上升,表明其参与了玉米的逆境响应^[18-19]。本研究鉴定获得 *JrATG18a* 基因的上游 2090 bp 启动子中也含有 SA、JA、热、低温等响应元件,预测该启动子也能调控 *JrATG18a* 基因参与植物生长发育及逆境响应过程。因此,对核桃进行了高温、低温、干旱、SA、JA 及 ABA 等不同处理,分析了根和叶中 *JrATG18a* 的表达水平,结果发现,*JrATG18a* 在这些胁迫下能被不同程度的诱导;同时,在相同处理下体现出组织特异性,在相同时间处理下,体现出该基因对不同处理响应的差异性(图 5、图 6)。这与其他逆境响应相关基因在根和叶组织中的表达特性具有相似性。如,核桃 WRKY 转录因子家族基因 *JrWRKY6* 和 *JrWRKY53* 在 NaCl、PEG₆₀₀₀、低温、ABA 胁迫下也表现出胁迫时间及根、叶差异表达^[20]。*JrGSTTaul* 基因在低温胁迫下的表达也体现了根、叶组织特异性和时序性^[15]。柞柳 *ThVHAc1* 基因在 CdCl₂ 胁迫不同时间下的表达差异较大,且在根和叶中的转录水平也不同^[17]。这些基

因都被证实为逆境响应调控基因。可见,逆境响应相关基因在不同时间胁迫及不同组织中的表达具有差异性,也表明 *JrATG18a* 基因在不同胁迫下的诱导表达与逆境响应调控具有重要关系。

ATG 基因参与逆境响应主要通过调节植株的生理响应等途径改善植株的抗性。如,小米 (*Setaria italica* (L.) P. Beauv.) *SiATG8a* 基因能响应不同的逆境胁迫,过表达时能通过改变植株的叶绿素含量、ROS 积累及脯氨酸代谢来增强转基因拟南芥的氮饥饿和干旱胁迫的抗性^[21];小麦 *ATG4* 和 *ATG8* 在生物和非生物胁迫下具有积极响应功能,且与 ABA、MeJA、乙烯等激素信号通路相关^[22];水稻 *OsATG6* 基因在非生物胁迫(热、冷和干旱)和激素(ABA)刺激下也能积极反应^[13]。本研究中,*JrATG18a* 基因上游启动子含有众多与逆境响应相关的顺式作用元件,其中包括了 SA、JA 等激素响应相关元件。且 *JrATG18a* 基因能被 SA、JA 及 ABA 等激素诱导,表现出较高的表达水平(图 6),可以推测 *JrATG18a* 基因在参与逆境响应过程中,也会涉及 SA、JA 及 ABA 等激素信号通路,并与 ROS 及脯氨酸代谢具有重要联系。在后续研究中,将通过过量表达等方法全面分析 *JrATG18a* 基因的逆境响应功能。

参考文献

- [1] Yamagishi K, Nagata N, Yee K M, Braybrook S A, Pelletier J, Fujioka S, Yoshida S, Fischer R L, Goldberg R B, Harada J J. *TAN-MEI/EMB2757* encodes a WD repeat protein required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2005, 139(1): 163-173
- [2] Fong H K, Hurley J B, Hopkins R S, Mlake-Lye R, Johnson M S, Doolittle R F, Simon M I. Repetitive segmental structure of the transducin β subunit; Homology with the *CDC4* gene and identification of related mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83(7): 2162-2166
- [3] Grigorieva G, Shestakov S. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *Fems Microbiology Letters*, 1982, 13(4): 367-370
- [4] Li D, Roberts R. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 2001, 58(14): 2085-2097
- [5] 孙玉燕, 段蒙蒙, 邱杨, 张晓辉, 沈镒, 王海平, 李锡香. 心里美萝卜花青素合成酶基因 *RsANS* 克隆及花青素生物合成相关基因表达分析. *植物遗传资源学报*, 2016, 17(5): 889-896
- [6] 华静静, 陈晓静. 植物体中 WD40 蛋白的研究进展. *黑龙江农业科学*, 2015(5): 153-156
- [7] Sompornpailin K, Makita Y, Yamazaki M, Saito K. A WD-repeat-containing putative regulatory protein in anthocyanin biosynthesis in *Perilla frutescens*. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50(3): 485-495
- [8] An X H, Tian Y, Chen K Q, Wang X F, Hao Y J. The apple WD40 protein MdTTG1 interacts with bHLH but not MYB proteins to regulate anthocyanin accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169(7): 710-717
- [9] 李洁. 棉花 *GhWD40* 基因的克隆及功能验证. 武汉: 华中农业大学, 2013
- [10] 李宝燕. 烟草 WD40 蛋白 TTG2 对生长发育和抗病性的调控作用. 南京: 南京农业大学, 2012
- [11] Han S, Wang Y, Zheng X, Jia Q, Zhao J, Bai F, Hong Y, Liu Y. Cytoplasmic Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with ATG3 to negatively regulate autophagy and immunity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, 2015, 27: 1316-1331
- [12] Kurusu T, Koyano T, Hanamata S, Kubo T, Noguchi Y, Yagi C, Nagata N, Yamamoto T, Ohnishi T, Okazaki Y, Kitahata N, Ando D, Ishikawa M, Wada S, Miyao A, Hirochika H, Shimada H, Makino A, Saito K, Ishida H, Kinoshita T, Kurata N & Kuchitsu K. Os-ATG7 is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development. *Autophagy*, 2014, 10: 878-888
- [13] Rana R M, Dong S, Ali Z, Huang J, Zhang H S. Regulation of ATG6/Beclin-1 homologs by abiotic stresses and hormones in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetic Molecular Research*, 2012, 11: 3676-3687
- [14] Kuzuoglu-Ozturk D, Cebeci Yalcinkaya O, Akpinar B A, Mitou G, Korkmaz G, Gozuacik D, Budak H. Autophagy-related gene, *TdAtg8*, in wild emmer wheat plays a role in drought and osmotic stress response. *Planta*, 2012, 236: 1081-1092
- [15] Yang G, Xu Z, Peng S, Sun Y, Jia C, Zhai M. In planta characterization of a tau class glutathione S-transferase gene from *Juglans regia* (*JrGSTTaul*) involved in chilling tolerance. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(3): 681-692
- [16] Livak K J and Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [17] Yang G, Wang C, Wang Y, Guo Y, Zhao Y, Yang C, Gao C. Overexpression of *ThVHAcl* and its potential upstream regulator, *ThWRKY7*, improved plant tolerance of Cadmium stress. *Scientific Reports*, 2016, 6: 18752-18752.
- [18] 赵晋锋, 余爱丽, 王寒玉, 杜艳伟, 王高鸿, 常海霞. 非生物逆境胁迫下 *ZmCIPK10* 基因表达分析. *生物技术进展*, 2011, 1(2): 130-134
- [19] 刘彦丹, 英生, 张登峰, 石云素, 宋燕春, 白志川, 王天宇, 黎裕. 玉米逆境胁迫响应基因 *ZmbZIP71* 的克隆与表达分析. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(5): 775-781
- [20] Yang G, Zhang W, Sun Y, Zhang T, Hu D, Zhai M. Two novel WRKY genes from *Juglans regia*, *JrWRKY6* and *JrWRKY53*, are involved in ABA-dependent stress responses. *Biologia Plantarum*, 2017, 61(4): 611-621
- [21] Li W W, Chen M, Zhong L, Liu J M, Xu Z S, Li L C, Zhou Y B, Guo C H, Ma Y Z. Overexpression of the autophagy-related gene *SiATG8a* from foxtail millet (*Setaria italica* L.) confers tolerance to both nitrogen starvation and drought stress in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 468: 800-806
- [22] Pei D, Zhang W, Sun H, Wei X, Yue J, Wang H. Identification of autophagy-related genes *ATG4* and *ATG8* from wheat (*Triticum aestivum* L.) and profiling of their expression patterns responding to biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, 2014, 33: 1697-1710