

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.03.006

引用格式:赵静玮,金宵激,崔梦兰,等.黄花苜蓿 *MfWRKY3* 基因克隆及特性分析[J].草地学报,2026,34(3):796–803
ZHAO Jing-wei, JIN Xiao-wei, CUI Meng-lan, et al. Cloning and Characterizatic Analysis of *MfWRKY3* Gene in *Medicago falcata*[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(3):796–803

黄花苜蓿 *MfWRKY3* 基因克隆及特性分析

赵静玮^{1,2}, 金宵激¹, 崔梦兰¹, 张立全^{1,3*}

(1. 内蒙古大学生命科学学院, 内蒙古呼和浩特010070; 2. 内蒙古包头市第四十中学, 内蒙古包头014030;
3. 牧草与特色作物生物学教育部重点实验室, 内蒙古呼和浩特010070)

摘要:为了探究 *MfWRKY3* 在调节黄花苜蓿 (*Medicago falcata*) 响应逆境胁迫过程中发挥的作用,本研究从野生黄花苜蓿中克隆获得了 *MfWRKY3* 基因,并对其编码蛋白特性和表达模式进行了研究。结果发现, *MfWRKY3* 基因开放阅读框为 1575 bp, 编码 524 个氨基酸的蛋白质,其分子量为 57.36 kDa, 理论等电点为 6.96。 *MfWRKY3* 蛋白具有转录激活特性并定位在细胞核内,属于 WRKY I 亚家族转录因子家族成员。 *MfWRKY3* 基因在黄花苜蓿叶中表达量最高,且在根、茎和叶中的表达均受盐和低温胁迫以及脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 处理的影响。其中,盐胁迫可显著诱导 *MfWRKY3* 基因的表达。这些结果为进一步探究 *MfWRKY3* 基因调节黄花苜蓿响应逆境胁迫的生物学功能和机理奠定了基础。

关键词:黄花苜蓿; *MfWRKY3*; 基因克隆; 特性分析

中图分类号:S541.9

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)03-0796-08

Cloning and Characterizatic Analysis of *MfWRKY3* Gene in *Medicago falcata*

ZHAO Jing-wei^{1,2}, JIN Xiao-wei¹, CUI Meng-lan¹, ZHANG Li-quan^{1,3*}

(1. College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot, Inner Mongolia 010070, China; 2. Inner Mongolia Baotou No. 40 Middle School, Baotou, Inner Mongolia 014030, China; 3. Key Laboratory of Forage and Endemic Crop Biology, Ministry of Education, Hohhot, Inner Mongolia 010070, China)

Abstract: To explore the role of *MfWRKY3* in regulating the response of *Medicago falcata* to stresses, the *MfWRKY3* gene was cloned from wild *Medicago falcata* in this study, and the characteristics of it encoded protein and the expression pattern were preliminarily identified. The results showed that the length of *MfWRKY3* ORF (open reading frame) is 1575 bp, encoding a protein with 524 amino acids, predicted molecular mass of 57.36 kDa and an isoelectric point of 6.96. The *MfWRKY3* had transcriptional activation activity and was localized in the nucleus, belonging to the WRKY I sub-group transcription factor member. Meanwhile, it was found that the *MfWRKY3* gene had the highest expression level in the leaves of *Medicago falcate*, and the its expression in the roots, stems and leaves were regulated by salt, low temperature and ABA treatment. However, the salt stress could significantly induce the expression of *MfWRKY3* gene. These findings laid a foundation for further investigating the biological function and molecular mechanism of *MfWRKY3* in regulating the response of *Medicago falcata* to abiotic stresses.

Key words: *Medicago falcata*; *MfWRKY3*; Gene cloning; Characterization analysis

WRKY 转录因子家族蛋白在植物的生长发育和响应各种胁迫中发挥着重要的调控作用^[1-2],其通过 WRKY 结构域与靶基因启动子区顺式作用元件 W-

box 特异性结合,调节靶基因的表达^[2]。依据 WRKY 蛋白含有 WRKY 结构域的数量和锌指基序的组成,可将 WRKY 家族蛋白分为 I, II 和 III 亚家族^[3]。

收稿日期:2025-04-17;修回日期:2025-07-16

基金项目:国家自然科学基金地区项目(32460339,31460628);内蒙古自然科学基金面上项目(2024MS03028);内蒙古自治区高等学校科学技术研究重点项目(NJZZ22331)资助

作者简介:赵静玮(1995-),女,汉族,内蒙古包头人,硕士研究生,主要从事苜蓿抗逆方面研究,E-mail:1120470879@qq.com;*通信作者 Author for corresponding, E-mail:zhangliquan430@126.com

甜薯 (*Ipomoea batatas*) *SPF1* (sweet potato factors 1) 是首个被克隆获得的 WRKYs 家族基因^[4]。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *AtWRKY3* 编码与 *AtWRKY4* 结构相似的蛋白因子, 其表达受病菌和水杨酸 (Salicylic acid, SA) 诱导, *AtWRKY3* 属于 WRKY I 家族, 定位在细胞核内, 且具有结合 W-box 的特性, 在植物应答死体营养型 (necrotrophic) 病原菌的免疫过程中发挥正向调控的作用^[5]。盐胁迫通过显著上调 *AtWRKY3* 和 *AtWRKY4* 的表达, 进而增强拟南芥的活性氧 (Reactive oxygen, ROS) 清除能力, 最终提高拟南芥的耐盐性^[6]。渐狭叶烟草 (*Nicotiana attenuata*) *NaWRKY3* 是昆虫应答基因, 烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 撕咬创伤可促进 *WRKY3* 的表达^[7]。番茄 (*Solanum lycopersicum*) *SlWRKY3* 是可以结合 W-box 的核蛋白, *SlWRKY3* 的表达可被盐和干旱处理快速诱导, 并参与番茄耐盐性的调节^[8]。同时, *SlWRKY3* 通过结合 *TPK1b* (Tomato protein kinase 1b) 基因启动子的 W-box 抑制其表达, 进而通过调节下游 SA 和 ROS 途径负调控番茄对灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 的耐受性^[9]。醋栗番茄 (*Solanum pimpinellifolium*) *SpWRKY3* 通过诱导 *PR* (Pathogenesis-related) 基因表达和减少 ROS 积累保护细胞膜免受致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 的伤害, 正向调控番茄对致病疫霉的抗性^[10]。*WRKY3* 在大麦 (*Hordeum vulgare*) 白粉病免疫应答 *Bgh* (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) 真菌过程中发挥抑制因子作用, 且 *WRKY3* 被 *SnRK1* (Sucrose non-fermenting-related kinase 1) 磷酸化后可增强抑制作用^[11]。苹果 (*Malus domestica* Borkh.) *MdWRKY3* 通过结合多酚氧化酶 *MdPPO7* (polyphenol oxidase) 基因启动子的 W-box 元件调节其表达, 进而参与苹果切割后的褐化调节^[12]。桂花 (*Osmanthus fragrans*) *OfWRKY3* 的表达响应 SA, 茉莉酸 (Jasmonic acid, JA) 和脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 的处理, 且 *OfWRKY3* 可以结合类胡萝卜素裂解双加氧酶 *OfCCD4* (carotenoid cleavage dioxygenase) 基因启动子的 W-box, 进而正向调节 *OfCCD4* 的表达, 促进 β -紫罗酮的生物合成^[13]。以上研究报道表明 *WRKY3* 在调节植物响应逆境胁迫过程中发挥重要作用。

苜蓿属 WRKY 的研究已有报道, 蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) *MtWRKY76* 具有调节耐盐性和抗旱性的作用^[14], 紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)

MsWRKY33 通过激活 *MsERF5* 促进清除 ROS 来增强耐盐性^[15], *MsWRKY44* 可与 *MsMGT7* 和 *MsCIPK23* 启动子结合并调控其表达, 进而平衡 Mg 和 Al 离子转运和积累, 调节紫花苜蓿对酸和铝的耐受性^[16]。*MsWRKY42* 基因的表达受 NaCl, PEG、低温胁迫以及 ABA 的正向诱导, 可参与多种非生物胁迫应答^[17]。黄花苜蓿 (*Medicago falcata*) 生态适应性和抗逆能力高于紫花苜蓿^[18-19], 被视为苜蓿作物抗性育种的重要种质资源^[19-20]。但是, 黄花苜蓿 WRKY 蛋白的相关研究鲜有报道。*MfWRKY40* 的表达受干旱胁迫诱导, 且 *MfWRKY40* 通过提高脯氨酸含量以及抗氧化酶活性调节植物适应干旱胁迫^[21]。本课题组前期完成了盐、干旱胁迫黄花苜蓿的转录组深度测序^[19], 筛选了编码蛋白含有 WRKY 结构域的差异表达基因。在此基础上, 本研究克隆获得了差异表达基因 *MfWRKY3* 的 ORF 序列, 分析了 *MfWRKY3* 的表达模式、蛋白特性、编码蛋白亚细胞定位及转录激活活性等生物学特性, 为解析 *MfWRKY3* 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用植物材料为野生黄花苜蓿, 种子采自锡林郭勒盟草原。

1.2 试验方法

1.2.1 实验材料培养及 RNA 提取 选取饱满种子, 按文献^[22]方法播种并获得 4 周龄水培幼苗, 采集根、茎、叶置液氮速冻备用。将 4 周龄幼苗分别移栽于含有 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 的 1/2 Hoagland 营养液中进行处理。将 4 周龄幼苗移栽于 4°C 预冷的 1/2 Hoagland, 并置于低温生化培养箱 (SPX-0328, 杭州汇尔仪器设备有限公司) 4°C 下培养进行低温胁迫处理。在处理 0, 1, 3, 6, 12, 24 h 时, 分别采集根、茎、叶置液氮速冻备用。利用 TRIzol 试剂 (CWBio, 北京) 提取各样品的总 RNA。

1.2.2 *MfWRKY3* 的克隆 以上述叶片总 RNA 为模板, 经 Pri-meScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) 反转录获得 cDNA, 利用引物 MfW3-F/R (表 1) 进行 PCR 扩增。反应体系: cDNA $1 \mu\text{L}$ 、 $5 \times$ PrimeSTAR® GXL DNA Buffer $5 \mu\text{L}$ 、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase ($1.25 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$ 、dNTPs

($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2 \mu\text{L}$ 、引物($0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 $2 \mu\text{L}$ 和无菌水 $12 \mu\text{L}$ 。扩增条件为: 95°C 5 min ; 95°C 1 min , 57°C 30 s , 68°C 90 s , 30 个循环; 72°C 20 min 加 A。纯

化 PCR 产物后经 T_4 DNA Ligase 克隆至 pMD19-T 载体, 热激法转化 pMD19-T-*MfWRKY3* 至 DH5 α 后获得单克隆菌体, 并进行测序分析。

表 1 试验所有引物

Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'to 3')	酶切位点 Restriction enzyme cutting site	目的片段 Size of fragment
MfW3-F	GCTCTAGA CATATGATGTCAACAACCAC	<i>Xba</i> I, <i>Nde</i> I	1603 bp
MfW3-R	GAGCTC GTCGACTTATACAATGATTG	<i>Sal</i> I, <i>Sac</i> I	
MfW3-NT1-F	GCGAATTCATGTCAACAACCACC	<i>Eco</i> R I	699 bp
MfW3-NT1-R	GCGTCGACAGGTTTGTCAATAGG	<i>Sal</i> I	
MfW3-NT2-F	GCGAATTCATGTCAACAACCAC	<i>Eco</i> R I	1420 bp
MfW3-NT2-R	GCGTCGACGACATCATGATTATG	<i>Sal</i> I	
MfW3-CT1-F	GCGAATTCGCTGCTAGAAACAGC	<i>Eco</i> R I	181 bp
MfW3-CT1-R	GCGTCGACTTATACAATGATTGCTC	<i>Sal</i> I	
MfW3-CT2-F	GCGAATTCGACAGATGACGGC	<i>Eco</i> R I	911 bp
MfW3-CT2-R	CGCGTCGACTTATACAATGATTGTC	<i>Sal</i> I	
MfW3-D-F	GCGAATTCGACAGATGACGGC	<i>Eco</i> R I	743 bp
MfW3-D-R	GCGTCGACGACATCATGATTATG	<i>Sal</i> I	
pC-MfW3-F	GCGAGCTCATGTCAACAACCAC	<i>Sac</i> I	1591 bp
pC-MfW3-R	GCGTCGACTACAATGATTGCTC	<i>Sal</i> I	
MfEF1 α -F	GTGGTGGAGTCAATGATAAG		147 bp
MfEF1 α -R	TAAGGCTGAGCGTGAAAG		
MfW3q-F	TGGCTTCACCTCTTGCTTTCTCTTC		169 bp
MfW3q-R	GAAGGACTCAAACCAGGTGGAACAG		

1.2.3 *MfWRKY3* 序列分析 利用 SnapGene 软件分析 *MfWRKY3* 编码氨基酸序列, 用 SMART ([https://smart.Embl.de](https://smart.embl.de)) 分析蛋白质保守结构域, 经 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam>) 分析蛋白质的理化性质, 利用 MEGA 软件最大似然法 (Maximum likelihood) 构建进化树, Bootstrap 值设置为 1000, 利用 DNAMAN 6.0 软件进行蛋白质同源性比对。利用 DeepLoc-2.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.1/>) 预测亚细胞定位。利用 SOPMA (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测二级和三级结构。

1.2.4 *MfWRKY3* 的表达分析 分别取盐胁迫、低温胁迫、ABA 处理植株根、茎、叶总 RNA, 经 Prime-ScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser Kit (Takara) 进行反转录获得的 cDNA 为模板, *MfEF1 α* 为内参基因^[20], 利用 Chromo4 Real-Time PCR 仪 (Bio-Rad), 依照 TB Green Premix Ex TaqTM II (Takara) 说明进行 PCR 检测。检测体系为: TB Green Premix Ex Taq II ($2 \times$) $10.0 \mu\text{L}$, MfW3q-F/R ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (表 1) 各 $0.8 \mu\text{L}$, cDNA $2.0 \mu\text{L}$, 无

RNase 水 (RNase-free Water) $6.4 \mu\text{L}$ 。反应条件为: 95°C 1 min ; 95°C 5 s , 58°C 30 s , 72°C 20 s , 40 个循环; 溶解曲线 65°C 至 95°C , 每 0.5°C 持续 5 s 。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法^[23] 计算相对表达量。试验设 3 个生物学重复和 3 个技术重复。

1.2.5 *MfWRKY3* 亚细胞定位分析 利用引物 pC-MfW3-F/R (表 1), 以 pMD19-T-*MfWRKY3* 为模板扩增去除终止密码子的序列, 产物纯化后与 pCAMB-IA1300 (35S-sGFP) 经 *Sac* I 和 *Sal* I 酶切、纯化后构建 pCAMBIA1300 (35S: *MfWRKY3*-sGFP) 载体, 命名为 pC (35S: *MfW3*-sGFP), 转化 DH5 α 后获得单克隆菌体。经菌体 PCR、酶切鉴定及测序验证, 利用冻融法将 pC (35S: *MfW3*-sGFP) 转化至 GV3101。分别取转化菌体接种至 YEB 培养液 (含 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES) 中 28°C 震荡培养。当菌液 $\text{OD}_{600} \approx 1.2$ 时, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集菌体, 用缓冲液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES) 重悬菌液并稀释至 $\text{OD}_{600} = 1.0$ 。然后在黑暗中恒温孵育 4 h , 取菌液注入烟草下表皮, 弱光培养 36 h 后, 剪取适当大小叶片制片, 于避光条件下经 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 4,6-二脒基-2-苯吡啶 (4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色 20 min 后, 用

激光共聚焦显微镜观察。试验以转化 pCAM-BIA1300(35S-sGFP)的GV3101为对照。

1.2.6 *MfWRKY3* 转录激活验证 依据 *MfWRKY3* 结构域位置,分别设计编码全长及部分片段的引物 MfW3-NT1-F/R, MfW3-NT2-F/R, MfW3-CT1-F/R, MfW3-CT2-F/R 和 MfW3-D-F/R (表1),PCR扩增获得各片段并纯化后,以pGBKT7为骨架构建载体 pG-MfW3, pG-MfW3-NT1, pG-MfW3-NT2, pG-MfW3-CT1, pG-MfW3-CT2 和 pG-MfW3-domain,利用 LiAc 法将上述载体转化酵母菌 AH109,经SD/Trp⁻筛选及PCR鉴定获得阳性转化菌。取阳性菌体经SD/Trp⁻于30℃震荡培养至OD₆₀₀=0.5,稀释菌液至10⁻¹,10⁻²,10⁻³倍后分别滴在SD/Trp⁻和SD/Trp⁻His⁻/X-α-Gal(5 mg·mL⁻¹)固体培养基上,30℃培养3 d,观测菌体生长及显色。试验以转化 pGBKT7-53+pGADT7-T 为阳性,转化 pGBKT7-Lam+pGADT7-T 为阴性对照。

1.3 数据处理

数据采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行处理和作图。

2 结果与分析

2.1 *MfWRKY3* 序列分析

经RT-PCR扩增及电泳检测,结果显示获得预期大小的条带(图1A),经测序分析获得1575 bp的开放阅读框序列,编码524个氨基酸的蛋白质(图1B)。结构域预测显示编码蛋白含有2个公认的WRKY结构域,分别位于蛋白质序列228~286位和410~469位(图1B,2A),并具有2个C₂H₂锌指结构(图1B),表明克隆获得的基因为WRKY基因家族成员,编码蛋白属于WRKY I 亚家族成员。蛋白质Blast分析表明该编码蛋白与MtWRKY3的同源性最高(98.0%),因此将该基因命名为 *MfWRKY3*。

2.2 *MfWRKY3* 结构分析

MfWRKY3 蛋白的分子量为57.36 kDa,理论等电点为6.96。进化树分析发现 *MfWRKY3* 与红车轴草(*Trifolium pratense*)、密花豆(*Spatholobus suberectus*)、大豆(*Glycine max*)等豆科植物WRKY3的亲缘关系较近(图2B)。二级结构预测

结果显示 *MfWRKY3* 主要由无规则卷曲(83.97%)、α-螺旋(7.44%)和完全伸展(8.59%)结构组成(图2C),且三级结构预测结果(图2D)与二级结构预测结果相符。

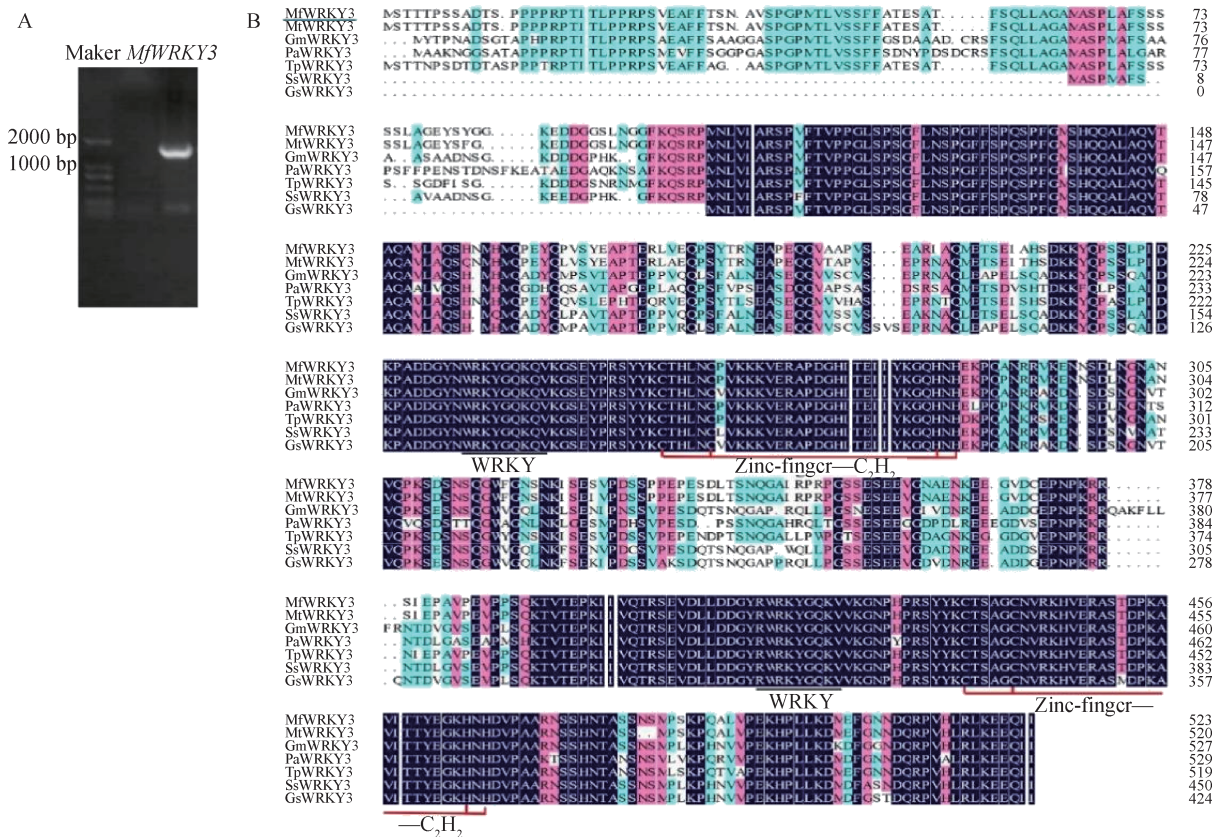
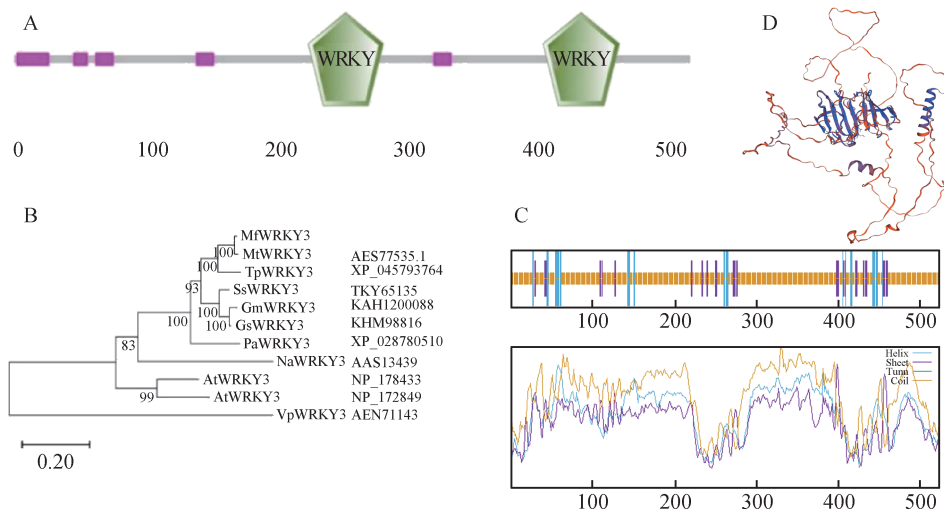
2.3 *MfWRKY3* 基因组织表达分析

MfWRKY3 的组织特异性表达分析结果(图3A)表明, *MfWRKY3* 在黄花苜蓿幼苗的根、茎和叶中均有表达,但是在叶片中的相对表达量极显著高于在根中的表达量($P<0.001$),而在茎中的表达量显著高于在根中的表达量($P<0.01$)。

2.4 *MfWRKY3* 响应胁迫的表达分析

本研究进一步利用 Real-time PCR 分析了盐胁迫、低温胁迫和 ABA 处理对 *MfWRKY3* 表达的影响,结果显示:盐胁迫处理均可上调 *MfWRKY3* 在黄花苜蓿根、茎和叶中的表达量(图3B),在胁迫6 h后,各组织中的表达量均与初始表达量呈极显著差异($P<0.001$),且在胁迫24 h后的表达量分别约是初始表达量的15.17倍、16.36倍和23.22倍。*MfWRKY3* 在黄花苜蓿根、茎、叶中响应 ABA 处理表现出不同的表达模式(图3C),ABA 诱导1 h可极显著诱导 *MfWRKY3* 在根中的表达($P<0.001$),此后表达量随处理时间延长而下降,但仍显著高于初始表达量($P<0.05$)。在茎中,ABA 处理后的前12 h内均显著上调 *MfWRKY3* 的表达($P<0.05$),但处理24 h时的表达量与初始表达量无显著差异。在叶片中,ABA 处理后的前3 h内均不影响 *MfWRKY3* 的表达,但处理6 h时可极显著诱导 *MfWRKY3* 的表达($P<0.001$),随后 *MfWRKY3* 的表达被下调并在处理24 h时的表达量与初始表达量无显著差异。

低温胁迫下(图3D), *MfWRKY3* 在黄花苜蓿根中的表达在胁迫1 h、12 h和24 h时均显著高于初始表达量($P<0.05$),而在胁迫6 h时显著高于初始表达量($P<0.01$); *MfWRKY3* 在茎中表达量仅在处理6 h和24 h时显著高于初始表达量($P<0.05$),其他处理时间点的表达量均与初始表达量无显著差异; *MfWRKY3* 在叶中表达量在低温处理3 h时显著高于初始表达量($P<0.01$),而在处理12 h和24 h时极显著高于初始表达量($P<0.001$)。综上所述盐胁迫时,黄花苜蓿 *MfWRKY3* 在根、茎和叶中均呈现规律性上调表达模式。

图 1 黄花苜蓿 *MfWRKY3* 克隆及蛋白序列比对分析Fig. 1 Cloning of *MfWRKY3* from *Medicago falcate* and sequences alignment analyses注: A 为 *MfWRKY3* 克隆图谱; B 为 *MfWRKY3* 编码蛋白序列及保守结构域Note: A, Amplification map of *MfWRKY3*; B, Sequence and conserved domain of protein encoded by *MfWRKY3* gene图 2 *MfWRKY3* 蛋白结构分析Fig. 2 Structural analysis of *MfWRKY3* protein注: A 为 *MfWRKY3* 保守结构域预测; B 为 *MfWRKY3* 进化树分析; C 为 *MfWRKY3* 的二级结构预测; D 为 *MfWRKY3* 的三级结构预测Note: A, prediction of conserved domain of *MfWRKY3*. B, phylogenetic tree analysis of *MfWRKY3*. C, prediction of the secondary structure of *MfWRKY3*. D, prediction of tertiary structure of *MfWRKY3*

2.5 *MfWRKY3* 的定位分析

经在线分析预测, *MfWRKY3* 定位在细胞核内的可能性最大, 约为 93.9%。为了进一步验证亚细

胞定位预测分析的结果, 利用农杆菌介导法在烟草上表皮细胞中瞬时表达 35S::*MfW3*-sGFP 和 35S::sGFP, 使用共聚焦显微镜观测, 结果显示瞬时表达

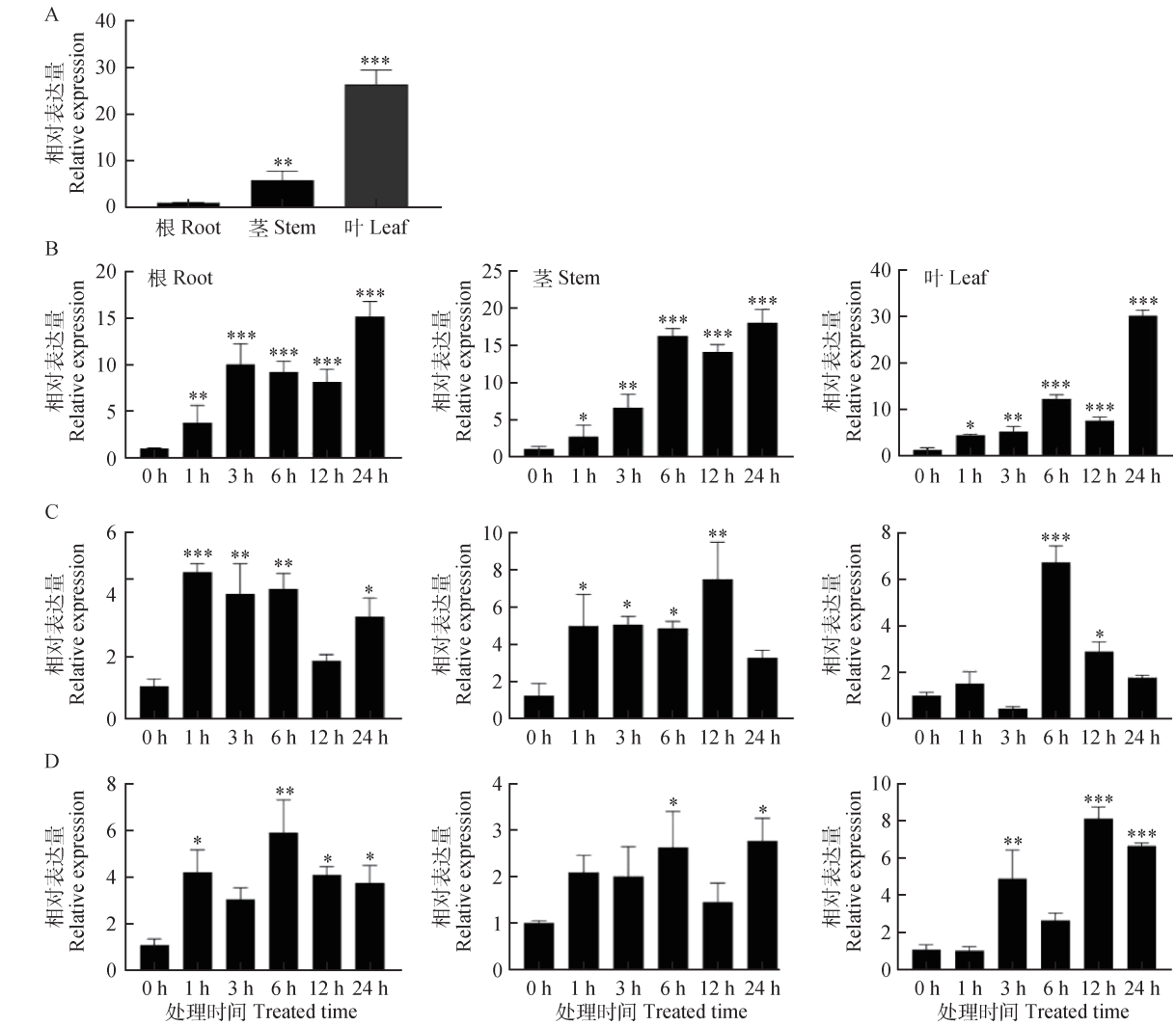


图 3 *MfWRKY3* 的表达分析

Fig. 3 Expression patterns of *MfWRKY3*

注: A 为组织表达模式分析; B 为盐胁迫处理; C 为 ABA 处理; D 为低温胁迫处理。*, ** 和 *** 分别代表在 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$ 水平差异显著

Note: A, tissue-specific expression pattern analysis. B, salt treatment. C, ABA treatment. D, low-temperature treatment. *, ** and *** indicate a significant difference at $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$, respectively

35S-sGFP 的绿色荧光均匀分布在细胞膜、细胞质和细胞核内,而瞬时表达 35S:*MfW3*-sGFP 的绿色荧光仅在细胞核内显现,并与 DAPI 染色重合(图 4),

表明 *MfWRKY3* 蛋白定位在细胞核内,与预测分析结果一致。

2.6 *MfWRKY3* 转录激活分析

以 pGBKT7 为骨架构建了含有 *MfWRKY3* 蛋白全长及部分片段的载体,获得转化酵母菌 AH109,分别涂布在 SD/Trp⁻ 和 SD/Trp⁻His⁻/X-α-Gal(5 mg·mL⁻¹) 固体培养基上,30℃ 恒温培养 3 d 后观测。结果(图 5)显示转化 *MfWRKY3* 蛋白全长及含有蛋白 C 端的载体的菌体生长良好并显示蓝色,表现出 α-半乳糖苷酶活性,表明 *MfWRKY3* 蛋白具有转录激活特性,且转录激活结构域位于蛋白的 C 末端。

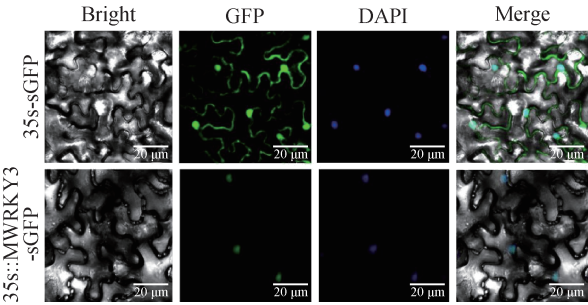


图 4 *MfWRKY3* 亚细胞定位分析

Fig. 4 Subcellular localization analysis of *MfWRKY3*

3 讨论

WRKY 家族蛋白是植物中重要的调控因子,广泛参与植物的生长发育、逆境胁迫响应和病原菌防御^[1-2]。黄花苜蓿具有抗旱、耐寒、耐盐碱、耐贫瘠等特点,且耐性比紫花苜蓿更强,是苜蓿高耐逆性性状分子育种的重要资源和基因库^[18-20]。

本研究从黄花苜蓿中克隆获得了 *MfWRKY3*

基因,系统进化树分析及多序列比对结果显示编码的蛋白 *MfWRKY3* 与 *MtWRKY3* 及其他豆科类物种的 WRKY 的同源性较高(图 2B),并含有 2 个 WRKY 结构域和 2 个 C₂H₂ 锌指结构(图 1B),属于 WRKY I 亚家族成员^[23]。蛋白质特性分析发现 *MfWRKY3* 定位在细胞核内(图 4)并具有转录激活功能(图 5),与生物信息学预测结果相同,进一步表明 *MfWRKY3* 基因是 WRKY 转录因子家族成员。

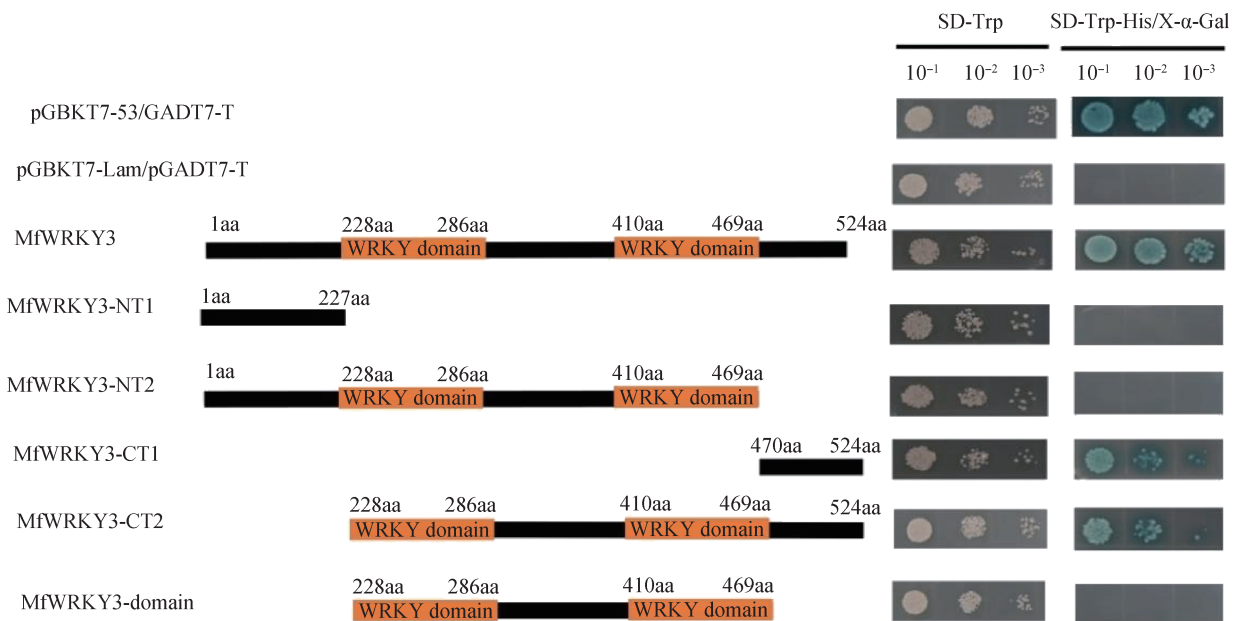


图5 *MfWRKY3* 转录激活分析

Fig. 5 Transcriptional activation analysis of *MfWRKY3*

WRKY I 家族成员中, *AtWRKY3* 在植物耐盐及病原菌防御过程中发挥作用^[3], 红车轴草 *TpWRKY3* 的表达受干旱胁迫、MeJA 和 ABA 处理诱导, 但是被低温胁迫抑制^[24]。菊叶薯蓣 (*Dioscorea composita*) *DcWRKY3* 的表达受盐胁迫显著诱导, 且异源表达 *DcWRKY3* 可提高转基因拟南芥种子在盐胁迫处理时的发芽率以及幼苗的根长, 同时转基因植株的脯氨酸含量和抗氧化酶活性增强, 而 ROS 和 MDA 积累减少, 进而正向调节植株的耐盐性^[25]。本研究分析 *MfWRKY3* 基因表达的组织特异性和响应胁迫处理的表达模式, 揭示 *MfWRKY3* 基因主要在黄花苜蓿叶中表达, 而在根、茎、叶中的表达均受盐、低温胁迫和 ABA 处理的调节, 但是盐胁迫可显著持续地诱导 *MfWRKY3* 基因的表达, 暗示 *MfWRKY3* 基因可能具有参与黄花苜蓿响应盐胁迫的调控功能。

4 结论

本研究克隆获得了黄花苜蓿 *MfWRKY3* 基因, 其编码蛋白是定位在细胞核内的转录因子。 *MfWRKY3* 基因在黄花苜蓿根、茎和叶中均有表达, 但在叶中的表达量最高。盐胁迫、低温胁迫和 ABA 处理均可调节 *MfWRKY3* 的表达, 但盐胁迫呈现持续上调 *MfWRKY3* 表达的模式。本研究结果为进一步探究 *MfWRKY3* 基因调节黄花苜蓿抗逆性功能和机理提供了依据。

参考文献

- [1] 陈彩锦, 马琳, 包明芳, 等. WRKY 基因家族在植物中的研究进展[J]. 草地学报, 2025, 33(7): 2059-2069
CHEN C J, MA L, BAO M F, et al. Research progress on the role of WRKY family genes in plants[J]. Acta Agrestia Sinica, 2025, 33(7): 2059-2069

- [2] YANG L, FANG S Y, LIU L, et al. WRKY transcription factors: hubs for regulating plant growth and stress responses[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2025, 67(3): 488-509
- [3] LI S L, KHOSO M A, WU J B, et al. Exploring the mechanisms of WRKY transcription factors and regulated pathways in response to abiotic stress[J]. Plant Stress, 2024, 12: 100429
- [4] 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 β -amylase from sweet potato[J]. Molecular and General Genetics, 1994, 244(6): 563-571
- [5] LAI Z B, VINOD K, ZHENG Z Y, et al. Roles of *Arabidopsis* WRKY3 and WRKY4 transcription factors in plant responses to pathogens[J]. BMC Plant Biology, 2008, 8: 68
- [6] LI P, LI X W, JIANG M. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of WRKY3 and WRKY4 function decreases salt and MeJA stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(8): 5821-5832
- [7] SKIBBE M, QU N, GALIS I, et al. Induced plant defenses in the natural environment: *Nicotiana attenuata* WRKY3 and WRKY6 coordinate responses to herbivory[J]. The Plant Cell, 2008, 20(7): 1984-2000
- [8] HICHRI I, MUHOVSKI Y, ŽIŽKOVÁ E, et al. The *Solanum lycopersicum* WRKY3 transcription factor SIWRKY3 is involved in salt stress tolerance in tomato[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1343
- [9] LUO D, CAI J, SUN W H, et al. Tomato SIWRKY3 negatively regulates *Botrytis cinerea* resistance via TPK1b[J]. Plants, 2024, 13(12): 1597
- [10] CUI J, XU P S, MENG J, et al. Transcriptome signatures of tomato leaf induced by *Phytophthora infestans* and functional identification of transcription factor SpWRKY3[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2018, 131(4): 787-800
- [11] HAN X Y, ZHANG L, ZHAO L F, et al. SnRK1 phosphorylates and destabilizes WRKY3 to enhance barley immunity to powdery mildew[J]. Plant Communications, 2020, 1(4): 100083
- [12] ZOU H, LI C Z, WEI X Y, et al. Expression of the polyphenol oxidase gene MdPPO7 is modulated by MdWRKY3 to regulate browning in sliced apple fruit[J]. Plant Physiology, 2024, 197(1): kiae614
- [13] HAN Y J, WU M, CAO L Y, et al. Characterization of OfWRKY3, a transcription factor that positively regulates the carotenoid cleavage dioxygenase gene OfCCD4 in *Osmanthus fragrans*[J]. Plant Molecular Biology, 2016, 91(4): 485-496
- [14] LIU L P, ZHANG Z Q, DONG J L, et al. Overexpression of MtWRKY76 increases both salt and drought tolerance in *Medicago truncatula*[J]. Environmental and Experimental Botany, 2016, 123: 50-58
- [15] MA L, LI X, ZHANG J J, et al. MsWRKY33 increases alfalfa (*Medicago sativa* L.) salt stress tolerance through altering the ROS scavenger via activating MsERF5 transcription[J]. Plant Cell & Environment, 2023, 46(12): 3887-3901
- [16] WEN W W, SU L T, GAO L, et al. MsWRKY44 regulates Mg-K homeostasis of shoots and promotes alfalfa sensitivities to acid and Al stresses[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 473: 134610
- [17] 刘佼佼, 王学敏, 马琳, 等. 紫花苜蓿 MsWRKY42 的分离、鉴定及其对非生物胁迫的响应[J]. 中国农业科学, 2020, 53(17): 3455-3466
- LIU J J, WANG X M, MA L, et al. Isolation, identification, and response to abiotic stress of MsWRKY42 gene from *Medicago sativa* L.[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(17): 3455-3466
- [18] LI W Y, LI X Z, LI W, et al. A haplotype-resolved genome assembly of tetraploid *Medicago sativa* ssp. *falcata*[J]. Science China Life Sciences, 2025, 68(4): 1186-1189
- [19] 王树栓, 张雨桐, 石如如, 等. 野生黄花苜蓿胚性愈伤诱导研究[J]. 草地学报, 2024, 32(7): 2143-2150
- WANG S S, ZHANG Y T, SHI R R, et al. Study on embryogenic callus induction of wild *Medicago falcata* L.[J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(7): 2143-2150
- [20] ZHANG L Q, JIA X H, ZHAO J W, et al. Molecular characterisation and expression analysis of NAC transcription factor genes in wild *Medicago falcata* under abiotic stresses[J]. Functional Plant Biology, 2020, 47(4): 327-341
- [21] 蒋智虎. 黄花苜蓿 *MfWRKY40* 基因的克隆及功能研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2024: 41-51
- JIANG Z H. Cloning and functional characterization of *MfWRKY40* gene in *Medicago falcata* L. [D] Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2024: 41-51
- [22] 张立全, 常娜, 赵志远, 等. 黄花苜蓿 *MfNAC34* 基因克隆及特性分析[J]. 中国草地学报, 2024, 46(3): 22-27
- ZHANG L Q, CHANG N, ZHAO Z Y, et al. Cloning and characteristic analysis of *MfNAC34* in *Medicago falcata* L.[J]. Chinese Journal of Grassland, 2024, 46(3): 22-27
- [23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [24] YUAN G X, ZHANG N J, ZOU Y M, et al. Genome-wide identification and expression analysis of WRKY gene family members in red clover (*Trifolium pratense* L.)[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1289507
- [25] YU S J, LAN X, ZHOU J C, et al. *Dioscorea composita* WRKY3 positively regulates salt-stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* L.[J]. Journal of Plant Physiology, 2022, 269: 153592

(责任编辑 闵芝智)