

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.06.007

引用格式:王娇凤,刘昱成,杨世裕,等.垂穗披碱草*EnWRKY26*基因克隆及表达分析[J].草地学报,2026,34(6):2032–2042
WANG Jiao-feng, LIU Yu-cheng, YANG Shi-yu, et al. Cloning and Expression Analysis of the *EnWRKY26* Gene in *Elymus nutans* Griseb[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34 (6) :2032–2042

垂穗披碱草 *EnWRKY26* 基因克隆及表达分析

王娇凤,刘昱成,杨世裕,呼天明*,韩祥艳*,杨培志*
(西北农林科技大学草业与草原学院,陕西 杨凌 712100)

摘要: WRKY 转录因子广泛参与植物的生长发育过程,并在响应生物和非生物胁迫中发挥重要作用,本研究从‘巴青’垂穗披碱草(*Elymus nutans* Griseb ‘Ba Qing’)中成功克隆了 *EnWRKY26* 基因,并对其进行了生物信息学分析、亚细胞定位分析、基因表达分析和转录因子活性验证等。结果表明: *EnWRKY26* 全长 996 bp,共编码 331 个氨基酸,分子量为 35,501.70 Da; *EnWRKY26* 蛋白理论等电点为 9.49,不稳定系数为 53.78,疏水性平均值为 -0.652,是一种不稳定亲水性蛋白,整个蛋白序列无跨膜区域,二级结构以无规卷曲为主; *EnWRKY26* 与小麦 TraseCS7B02G418600 和小麦 TraseCS7D02G497700 亲缘关系最近;亚细胞定位分析显示 *EnWRKY26* 存在于细胞核中;转录因子活性验证表明其具有转录激活活性;在盐胁迫处理下, *EnWRKY26* 相对表达量呈现升高趋势。本研究为深入解析 *EnWRKY26* 调控垂穗披碱草响应盐胁迫的分子机制提供理论依据。

关键词: 垂穗披碱草; *EnWRKY26*; 基因克隆; 表达分析; 转录因子

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 1007-0435(2026)06-2032-11

Cloning and Expression Analysis of the *EnWRKY26* Gene in *Elymus nutans* Griseb

WANG Jiao-feng, LIU Yu-cheng, YANG Shi-yu, HU Tian-ming*, HAN Xiang-yan*, YANG Pei-zhi*

(Department of Grassland Science, College of Grassland Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi Province 712100, China)

Abstract: WRKY transcription factors are widely involved in plant growth and development and play important roles in biotic and abiotic stress responses. In this study we cloned the *EnWRKY26* gene from *Elymus nutans* Griseb ‘Ba Qing’ and conducted bioinformatics analysis, subcellular localization analysis, gene expression profiling, and transcription factor activity validation. The results indicated that *EnWRKY26* was 996 bp in length, encoding 331 amino acids, with a molecular weight of 35 501.70 Da. The theoretical isoelectric point of the *EnWRKY26* protein was 9.49, with an instability index of 53.78 and an average hydrophobicity of -0.652, indicating that it was an unstable hydrophilic protein. The entire protein sequence lacks transmembrane domains, and its secondary structure is predominantly composed of random coils. *EnWRKY26* is most closely related to TraseCS7B02G418600 and TraseCS7D02G497700 in terms of phylogenetic relationship. Subcellular localization analysis revealed that *EnWRKY26* was localized in the nucleus. Transcription factor activity validation confirmed that it possesses transcriptional activation activity. Under salt stress treatment, the relative expression level of *EnWRKY26* showed an increasing trend. This study provides a theoretical basis for an in-depth understanding of the molecular mechanism by which *EnWRKY26* regulates the response of *Elymus nutans* to salt stress.

Key words: *Elymus nutans*; *EnWRKY26*; Gene cloning; Expression analysis; Transcription factors

垂穗披碱草(*Elymus nutans* Griseb)是禾本科 一种多年生优良高产牧草,广泛分布于我国青藏高原、东北、华北及西南等海拔或高纬度地区^[1]。因

收稿日期:2025-11-10;修回日期:2026-01-12

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(32401478);国家自然科学基金-区域创新发展联合基金(U21A20240);国家自然科学基金-区域联合发展重点基金(U20A2050)资助

作者简介:王娇凤(2001-),女,汉族,山西忻州人,硕士研究生,主要从事牧草逆境生物学研究, E-mail: wang_jiaofeng@126.com; *通信 Author for correspondence, E-mail: hutianming@126.com; xy_han@nwfau.edu.cn; yangpei zhi@126.com

其具有环境适应性强、耐牧性好、营养价值高等特点,在维持当地畜牧业发展、水土保持及生态系统稳定中扮演着不可替代的角色^[2-4]。然而,在全球气候变化加剧及人为活动干扰日益频繁的背景下,气温不断升高导致蒸发加剧,以及不合理灌溉等人为因素的影响,共同造成了土壤盐渍化日益严重,影响范围不断扩大^[5]。尤其是在部分干旱、半干旱地区,蒸发量远大于降水量,土壤表层盐分持续累积^[6],垂穗披碱草面临着持续且强烈的盐胁迫干扰。盐胁迫不仅通过渗透胁迫和离子毒害作用影响植物正常生长发育,还会诱发氧化应激^[7],造成膜脂过氧化和蛋白质变性^[8]。研究表明,盐胁迫会显著抑制牧草种子萌发^[9],阻碍根系发育^[10],并引起叶片黄化、萎蔫等可见伤害^[11];在细胞水平上,盐胁迫会破坏牧草的离子稳态,导致 K^+ 、 Na^+ 比例失衡^[12],影响多种酶的活性^[13];在分子水平上,盐胁迫会诱导一系列胁迫相关基因的表达变化,涉及信号转导、渗透调节和活性氧清除等多个生理过程^[14-16]。长期盐胁迫最终导致垂穗披碱草生物量显著下降、群落退化,严重影响其生态功能和经济价值^[17]。因此,深入解析垂穗披碱草的耐盐机理,挖掘其耐盐相关基因资源,对于保障退化草地的生态修复与畜牧业可持续发展具有极为紧迫的现实意义。

WRKY 基因家族是植物中一类庞大且重要的转录因子家族^[18],目前研究表明,WRKY 转录因子参与植物的各种发育过程,包括种子萌发、次生代谢产物的生物合成、衰老等过程,在植物应对生物胁迫(如病原菌侵染)和非生物胁迫(如盐碱、干旱、低温等)过程中也参与重要的调控作用^[19-22]。有研究表明拟南芥 *AtWRKY22* 在暗处理下拟南芥叶片衰老过程中起正调控作用^[23];紫花苜蓿 *MsWRKY47* 在盐胁迫响应过程中可能发挥负调控作用^[24];在苹果的研究中发现 *MdWRKY26* 在干旱胁迫时相对表达量逐渐升高,可能参与响应干旱胁迫^[25]。近两年垂穗披碱草研究进展迅速,四川农业大学马啸团队和四川省草原科学研究院/西南科技大学白史且团队先后报道了其高质量参考基因组^[26-27],为系统性解析该物种卓越抗逆性的遗传基础提供了关键支撑,且白史且团队研究发现 WRKY 转录因子 EVM0129376 在垂穗披碱草中参与干旱和 UV-B 胁迫的响应。但整体而言,目前关于垂穗披碱草抗逆性研究仍比较少,尤其是 WRKY 基因家族的很多成员在垂穗披碱草逆境胁迫中的响应

机制尚不清楚。

本研究从‘巴青’垂穗披碱草中成功克隆了 *EnWRKY26* 基因,并对其进行生物信息学分析、亚细胞定位分析、转录因子活性验证和基因表达分析等。为后续深入探究 *EnWRKY26* 调控垂穗披碱草响应盐胁迫的分子机制提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

本研究以‘巴青’垂穗披碱草为材料,选取籽粒饱满的种子,经 10% 次氯酸钠溶液表面消毒 15 min 后,再用无菌蒸馏水冲洗 5~6 次。将消毒后的种子置于铺有两层湿润滤纸的培养皿中,于光照培养箱内进行萌发。培养 4 d 后,挑选萌发状态一致的幼苗,转移至含有 1/2 Hoagland 营养液的水培装置中,在人工气候室内继续培养,每 2 d 更换一次营养液。待幼苗生长 2 周后,用 $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液进行盐胁迫处理,分别于处理 0 h, 2 h, 6 h, 12 h 和 24 h 后取样。每个处理时间点均设 3 个生物学重复,样品采集后立即放进液氮中速冻,并保存于 -80°C 超低温冰箱,为后续 *EnWRKY26* 基因的克隆与表达分析提供可靠实验样本。

1.2 RNA 提取及反转录

采用 Trizol 法提取垂穗披碱草样品总 RNA,利用 Nanodrop 检测 RNA 浓度和纯度,接着通过 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。使用提取到的高质量总 RNA 为模板,使用 HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)试剂盒(诺唯赞, R323-01)进行反转录,产物 cDNA 于 -20°C 保存备用。

1.3 基因克隆

以‘巴青’垂穗披碱草 cDNA 为模板,使用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase(诺唯赞, P505-d3)对目的基因进行 PCR 扩增。反应体系为 cDNA 模板 $2\text{ }\mu\text{L}$ 、正反向引物(表 1)各 $2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2\times$ Phanta Max Buffer $25\text{ }\mu\text{L}$ 、ddH₂O 补足至 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 程序为预变性 95°C 3 min,变性 95°C 15 s,退火 58°C 15 s,延伸 72°C 90 s,最后彻底延伸 72°C 5 min,共 35 个循环。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表1 *EnWRKY26* 基因扩增及 qRT-PCR 引物Table 1 *EnWRKY26* Gene amplification and qRT-PCR primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
<i>EnWRKY26</i> -F	ATGGACGAGCAGTGGATGATCG
<i>EnWRKY26</i> -R	TCAAGCAACAGGGATCCGACC
<i>qEnWRKY26</i> -F	TACCAATGGCGAAAGTACGGGC
<i>qEnWRKY26</i> -R	ACCAGGTTCTTCTCTCTCCGC
<i>EnTubulin</i> -F	TGGCAAGGAGGATGCAGCC
<i>EnTubulin</i> -R	ACACTGTGAACCCAAGCTTGG
<i>EnActin</i> -F	TGACAATGGCACCAGGAATGGTC
<i>EnActin</i> -R	ACGAGCTCATTGTAGAAGGTG

1.4 生物信息学分析

使用在线软件 ExPasy-ProtParam 分析了 *EnWRKY26* 编码氨基酸数量、不稳定系数、脂肪族系数等;利用在线工具 Novopro 分析了蛋白亲疏水性;使用 SOPMA 在线软件预测了蛋白二级结构;利用在线软件 SWISS-MODEL 和 AlphaFold 分别预测蛋白质三级结构;利用 TMHMM 在线软件进行蛋白跨膜区分析;通过 Ensembl Plants 网站中的 Blast (<https://plants.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>) 分析垂穗披碱草 *EnWRKY26* 蛋白与其他植物同源蛋白的进化关系并绘制系统发育进化树,利用在线软件 MEGA12 进行多序列对比,利用在线软件 DNAMAN9 绘制氨基酸序列对比图。

1.5 亚细胞定位

为了分析 *EnWRKY26* 的亚细胞定位,分别构建了 Ubiquitin-GFP-*EnWRKY26* 和 Ubiquitin-*EnWRKY26*-GFP 载体,将构建好的载体转入农杆菌 GV3101 感受态细胞,28℃ 培养 2 天后挑取单克隆至含卡那霉素和利福平的 LB 液体培养基中过夜培养,向培养好的菌液中加入等体积的细胞核定位 marker pBI121MCS-mCherry 菌液^[28],混匀后将菌液离心收集菌体,用 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 溶液重悬菌体沉淀,调节 OD₆₀₀ 至 0.8~1.0,并加入 0.2 mmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮,避光静置 3 h 后将其注射烟草叶片。随后将烟草室温避光培养 48 h,光照培养 24 h,使用激光共聚焦显微镜观察和采集照片。

1.6 转录因子活性验证

为验证 *EnWRKY26* 转录因子活性,本研究依次在酵母及本氏烟草中进行了功能分析。实验中所用 pGreen II -0800-GAL4-DBD 载体系统由西北农林科技大学草业与草原学院强治全老师惠赠。

将 *EnWRKY26* 与 pGBKT7 载体进行连接,构建 pGBKT7-*EnWRKY26*,同时正负对照分别为 pGBKT7-VP16 和 pGBKT7。将上述质粒分别转化酵母 Y2HGold 感受态细胞,涂布 SD/-Trp 培养基,28℃~30℃ 培养 2~3 天。在每个平板中挑取新鲜单菌落,用 SD/-Trp 液体培养基培养,调整 OD₆₀₀ 至 0.2,用 ddH₂O 依次稀释 10 倍、100 倍(即 OD₆₀₀ 为 0.2,0.02,0.002),按照先后顺序,分别取 7 μL 点板于 SD/-Trp,SD/-His/-Trp 和 SD/-Ade/-His/-Trp 平板,于 28℃~30℃ 培养 2~3 天,观察每个样品在不同平板的生长状况。

随后通过农杆菌介导的本氏烟瞬时转化系统进行定量验证。将 *EnWRKY26* 与 pGreen II -0800-GAL4-DBD 载体进行连接,构建 pGreen II -0800-GAL4-DBD-*EnWRKY26*,同时正负对照分别为 pGreen II -0800-GAL4-DBD-VP16 和 pGreen II -0800-GAL4-DBD。将上述质粒以及 pGreen II -0800-GAL4-LUC 质粒转化农杆菌 GV3101(pSoup) 感受态细胞,28℃ 培养 2 天后挑取单克隆至液体培养基中过夜培养。菌液培养好后,室温条件下,5 000 rpm 离心 10 min,去除上清,收集菌体,用烟草转化液(表 2)重悬农杆菌菌体,OD₆₀₀ 调为 1.0。将 pGreen II -0800-GAL4-LUC 菌液按照体积比 1:1 分别与其他菌液混合,混好的菌液在 28℃ 黑暗条件下静置 2~3 h。随后使用 1 mL 注射器将混合菌液注射烟草叶片,标记注射的叶片及对应区域。暗培养 12 h,转入光下培养 2~3 d。以注射点为中心,在注射标记的叶片范围内,用打孔器(直径为 0.8 cm)获取 3~4 个烟草圆片放入 1.5 mL 的 EP 管中,用液氮速冻。使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒(酷来搏, MH107-100T)进行检测,测定萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性,以萤火虫荧光素酶活性与内参海肾荧光素酶活性的比值表示相对转录激活活性。

表2 烟草转化液配方(100 mL 体系)

Table 2 Composition of the tobacco transformation solution

组分 Component	体积 Volume
0.2 mol·L ⁻¹ AS	75 μL
0.5 mol·L ⁻¹ MES	2 mL
1 mol·L ⁻¹ MgCl ₂	1 mL
ddH ₂ O	补足至 100 mL

1.7 基因表达分析

根据 *EnWRKY26* 的 CDS 序列,设计 qRT-PCR 特异性引物,以盐胁迫处理 0 h,2 h,6 h,12 h,24 h

的垂穗披碱草 cDNA 为模板,以 *EnTubulin* 和 *EnActin* 为内参基因,使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (诺唯赞, Q711-03) 进行 qRT-PCR 表达分析,各处理设置 4 个重复,随后采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 *EnWRKY26* 基因相对表达量。qRT-PCR 使用引物见表 1。

1.8 基因功能验证

将 *EnWRKY26* 与 pYES2 载体连接,构建 *EnWRKY26*-pYES2,对照为 pYES2,将上述载体转入 INVSc1 感受态细胞,涂布 SG/-Ura 平板,29℃ 培养 48~96 h。随后在每个平板中挑取新鲜单菌落,用 SG/-Ura 液体培养基培养,调整 OD₆₀₀ 至 1.0,用 ddH₂O 依次稀释 10¹ 倍、10² 倍、10³ 倍、10⁴ 倍(即 OD₆₀₀ 为 1.0, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001),按照先后顺序,依次取 7 μL 菌液,点板于:SG/-Ura (0 mmol·L⁻¹ NaCl 对照),以及含 300, 325, 350, 400 mmol·L⁻¹ NaCl 的 SG/-Ura 平板上,于 29℃ 培养 2~3 天,观察每个样品在两个平板的生长状况。

2 结果与分析

2.1 垂穗披碱草 *EnWRKY26* 基因克隆

以垂穗披碱草 cDNA 为模板,利用 ORF 特异性引物对 *EnWRKY26* 基因进行扩增,经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物检测,获得一条特异性强、序列大小为 1000 bp 左右的基因片段,测序结果显示序列大小为 996 bp,表明成功克隆到目的基因(图 1)。

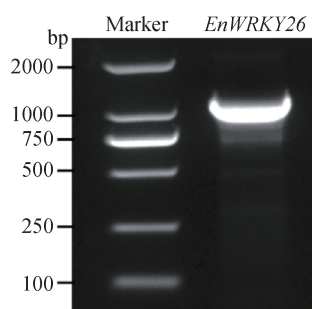


图 1 垂穗披碱草 *EnWRKY26* 基因克隆

Fig. 1 Cloning of the *EnWRKY26* gene from *Elymus nutans* Griseb

2.2 *EnWRKY26* 生物信息学分析

使用 Expasy-ProtParam 工具分析了 *EnWRKY26*

蛋白序列信息(图 2A),结果显示 *EnWRKY26* 共编码 331 个氨基酸,分子式为 C₁₅₀₉H₂₄₅₈N₄₇₂O₄₉₄S₁₂,分子质量为 35 501.70 Da,理论等电点为 9.49,不稳定系数为 53.78,是一种不稳定蛋白,脂肪族系数为 63.44。在 *EnWRKY26* 蛋白的氨基酸构成中,比例最高的为丙氨酸(Ala),含量达 12.4%,其次为精氨酸(Arg)、谷氨酰胺(Gln)、天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu),分别为 7.6%, 6.3%, 5.4% 和 4.8%,含量较少的为天冬酰胺(Asn) 2.7% 和半胱氨酸(Cys) 1.5%。通过该蛋白质的亲/疏水性分析,疏水性平均值为 -0.652,表明该蛋白为亲水性蛋白(图 2B)。使用 SOPMA 对蛋白二级结构预测,结果显示,该蛋白多肽链组成成分为无规卷曲(66.16%)、α-螺旋(23.87%)和延伸链(9.97%),共同形成其整体构象(图 2C)。利用在线软件 SWISS-MODEL 和 AlphaFold 预测蛋白质三级结构,与二级结构预测基本一致(图 2D)。利用 TMHMM 在线工具软件进行蛋白质跨膜区分析,结果表明预测到的跨膜螺旋数量为 0,整个蛋白序列都没有跨膜区域(图 2E)。

2.3 *EnWRKY26* 同源蛋白序列比对及系统发育进化关系分析

以垂穗披碱草 *EnWRKY26* 编码的蛋白序列为索引,通过 Ensembl Plants 网站中的 Blast(<https://plants.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>) 在单子叶物种小麦(*Triticum aestivum*)、水稻(*Oryza sativa*)和玉米(*Zea mays*)以及双子叶物种拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中进行同源序列比对,每个物种中选择比对率最高的两个基因,对其蛋白序列分析发现,均具有保守的 WRKY 结构域(图 3A)。系统发育进化分析结果显示,垂穗披碱草 *EnWRKY26* 与小麦中的两个同源蛋白 TraseCS7B02G418600 和 TraseCS7D02G497700 亲缘关系最近,聚集于同一进化枝,表明它们具有高度同源性。相比之下,*EnWRKY26* 与水稻中的 OsWRKY28 和玉米 Zm00001eb388620, Zm00001eb275080 亲缘关系较远,而与拟南芥 AtWRKY18, AtWRKY40 的遗传距离最大。这一结果反映出 *EnWRKY26* 在进化历程中与小麦 WRKY 蛋白具有更近的共同祖先,而与拟南芥有着较大的遗传差异(图 3B)。

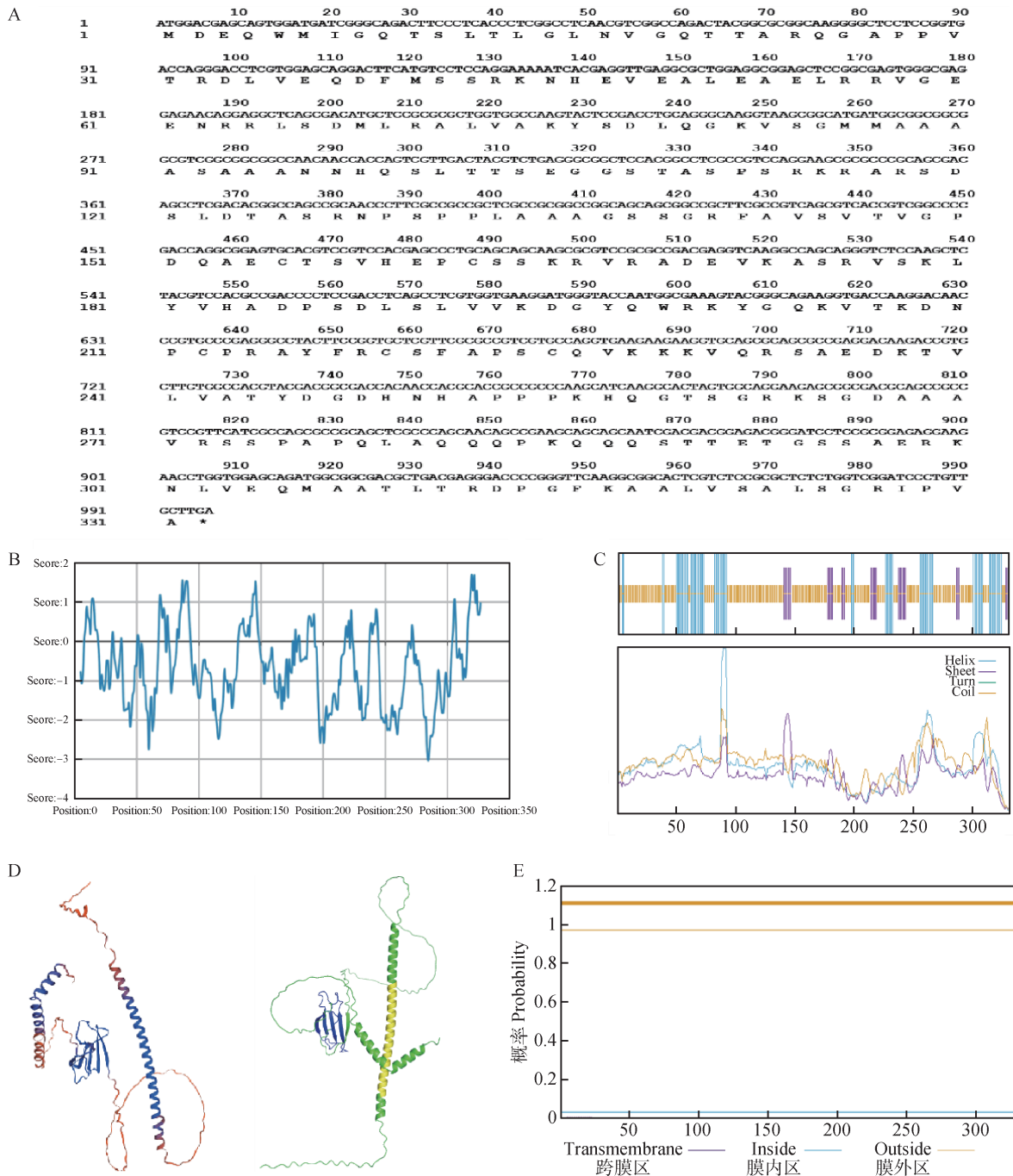


图 2 EnWRKY26 蛋白氨基酸序列 (A), 蛋白疏水性分析 (B), 蛋白二级结构 (C), 蛋白三级结构 (D) 和跨膜分析 (E)

Fig 2 Analysis of amino acid sequence (A), hydrophilicity analysis (B), protein secondary structure (C), protein tertiary structure (D) and transmembrane domain analysis (E) of EnWRKY26 protein

2.4 EnWRKY26 亚细胞定位分析

本研究采用农杆菌瞬时侵染烟草叶片技术, 分析了 EnWRKY26 的亚细胞定位情况。GFP 空载蛋白呈绿色荧光, 在细胞核和细胞膜上均有表达, 细胞核 Marker 为红色荧光, 重组载体在细胞核上表达且其红色荧光与空载细胞核的绿色荧光重叠, 结果表明 EnWRKY26 定位于细胞核 (图 4)。

2.5 转录因子活性分析

根据平板生长状况, 每个菌株在 SD/-Trp 平板上均可正常生长, pGBKT7 在 SD/-His/-Trp 平板上极少量生长, 在 SD/-Ade/-His/-Trp 平板上无法生长。正对照 pGBKT7-VP16 在 3 个平板均能生长, pGBKT7-EnWRKY26 在 3 个平板均能生长, 说明具有转录激活活性 (图 5A)。

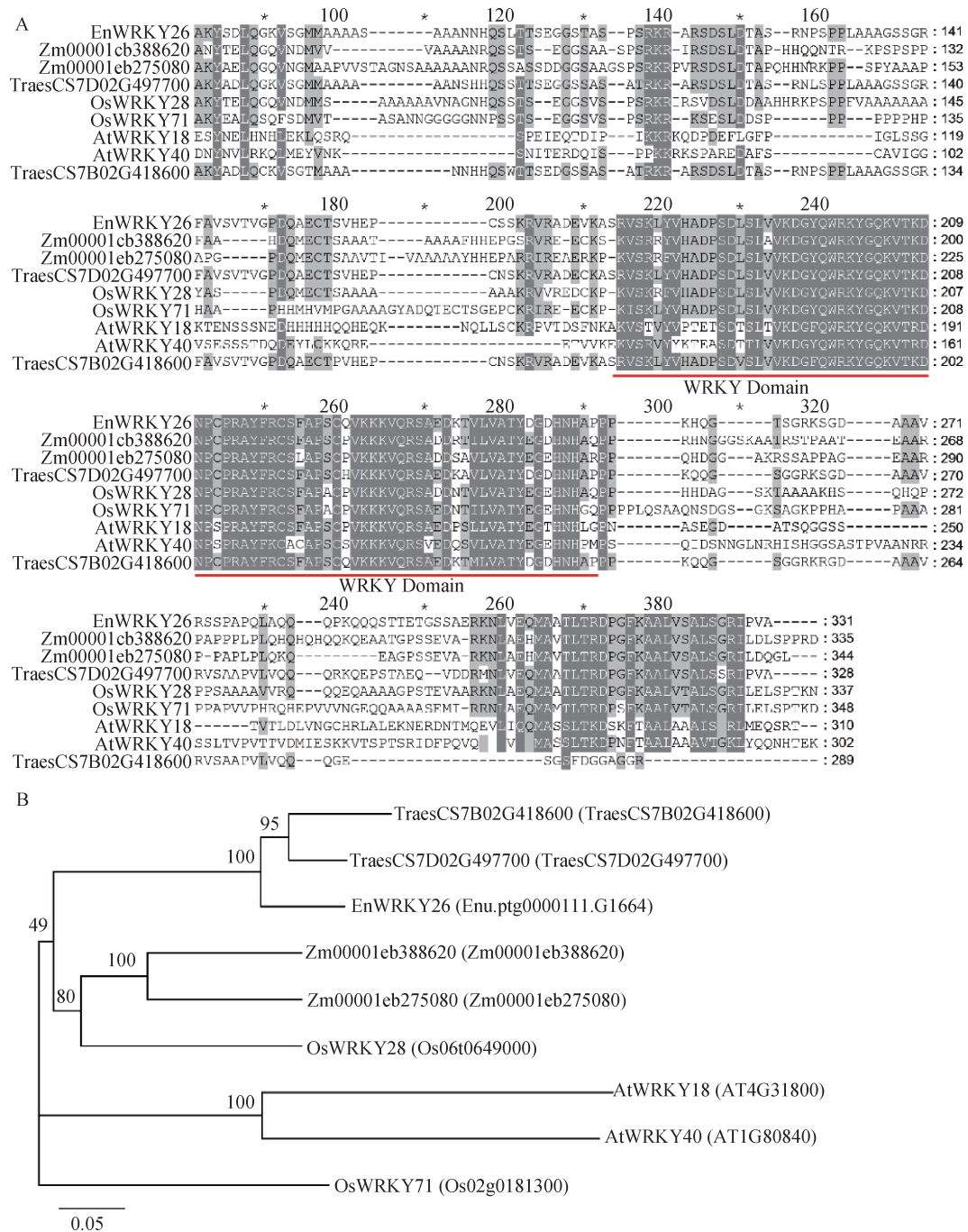
图3 *EnWRKY26*同源蛋白序列比对(A)和系统发育进化树分析(B)Fig. 3 Sequence alignments of *EnWRKY26* homologous proteins (A) and phylogenetic tree analysis (B)

图5C结果显示GAL4-DB-VP16作为阳性对照有很强的激活活性,GAL4-DB作为阴性对照,其活性显著低于阳性对照组。而GAL4-DB-*EnWRKY26*的活性恢复到了与阳性对照没有显著差异的高水平,这意味着*EnWRKY26*具有转录激活活性。

2.6 不同盐胁迫时间下垂穗披碱草 *EnWRKY26* 的表达分析

为验证 *EnWRKY26* 在垂穗披碱草中对盐胁迫

的响应,本研究通过qRT-PCR分析其在盐胁迫不同处理时间下的表达水平。结果显示,随着盐胁迫时间的增加,该基因在垂穗披碱草中的表达呈现先升高后降低的趋势,在盐胁迫12 h时表达量最高,随后逐渐降低,但与对照相比,总体呈升高趋势且与对照有显著性差异(图6)。垂穗披碱草中 *EnWRKY26* 的表达受到盐胁迫的诱导,可能参与垂穗披碱草对盐胁迫的响应过程。

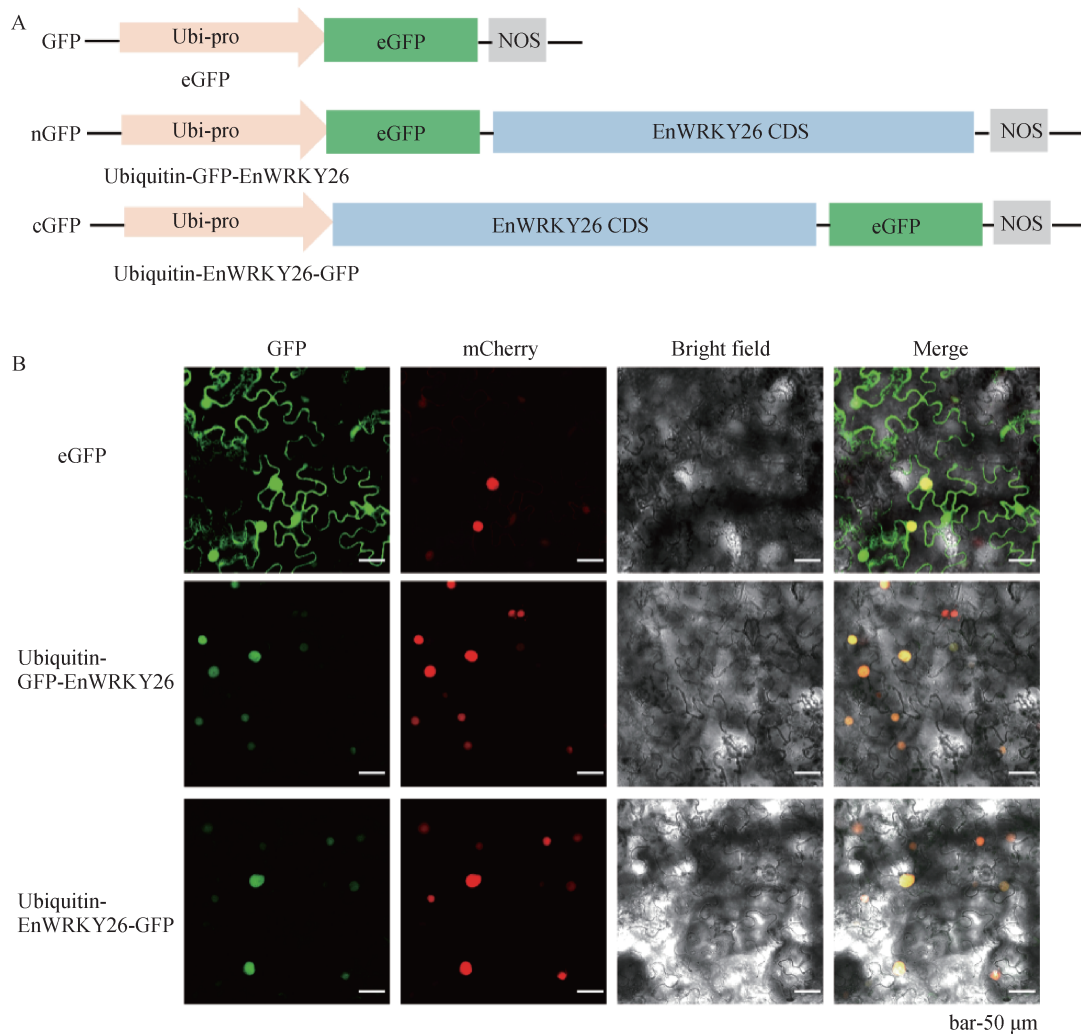


图 4 *EnWRKY26* 亚细胞定位载体构建示意图(A)和共聚焦分析(B)

Fig. 4 Subcellular localization vector construct (A) and confocal analysis (B) of *EnWRKY26*

2.7 基于酵母系统的垂穗披碱草 *EnWRKY26* 功能验证

在无盐胁迫的对照 SG/-Ura 平板上,空载 pYES2 和含有目的基因的 pYES2-*EnWRKY26* 在所有稀释梯度下都能够正常生长,形成清晰的菌落,二者生长状况没有明显差异。在盐胁迫实验组,即添加 300, 325, 350, 400 mmol·L⁻¹ NaCl 的 SG/-Ura 平板上,pYES2 空载菌株生长受到严重抑制,随着稀释倍数增加,菌落数量急剧减少,在盐浓度为 400 mmol·L⁻¹,稀释倍数为 10⁴ 时,菌株几乎无法正常生长。而随着盐浓度升高,pYES2-*EnWRKY26* 菌株始终表现出相对较强的适应性,菌株生长状况均显著优于 pYES2 空载,表明该菌株对盐胁迫有较强的耐受性(图 7)。因此,*EnWRKY26* 基因可能是一个与耐盐性相关的功能基因。

3 讨论

垂穗披碱草是广泛分布于青藏高原等高寒地区的优质多年生牧草^[29]。它因其极强的耐寒、耐旱、耐盐碱能力而成为维持高寒草地生态稳定的关键物种,在生态安全与牧区经济中扮演着不可替代的角色^[30-31]。高寒地区气候寒冷,土壤盐分更易累积,更易引发细胞脱水与膜系统损伤,显著抑制牧草种子萌发和根系发育,进而导致优质牧草减少,畜牧业的稳定发展受到制约,严重威胁当地生态系统的平衡与可持续性^[32]。目前,针对垂穗披碱草的研究主要聚焦于栽培利用^[33]、农艺性状^[34]及抗逆生理^[35]等层面,大量研究清晰地揭示了其广泛的遗传多样性^[36-37]、优异的种子萌发特性^[38]、以及极强的抗寒抗旱能力^[39-40]。然而,这些研究多停留在表型描述和生理层面,对于支撑这些优良性状的内在遗传

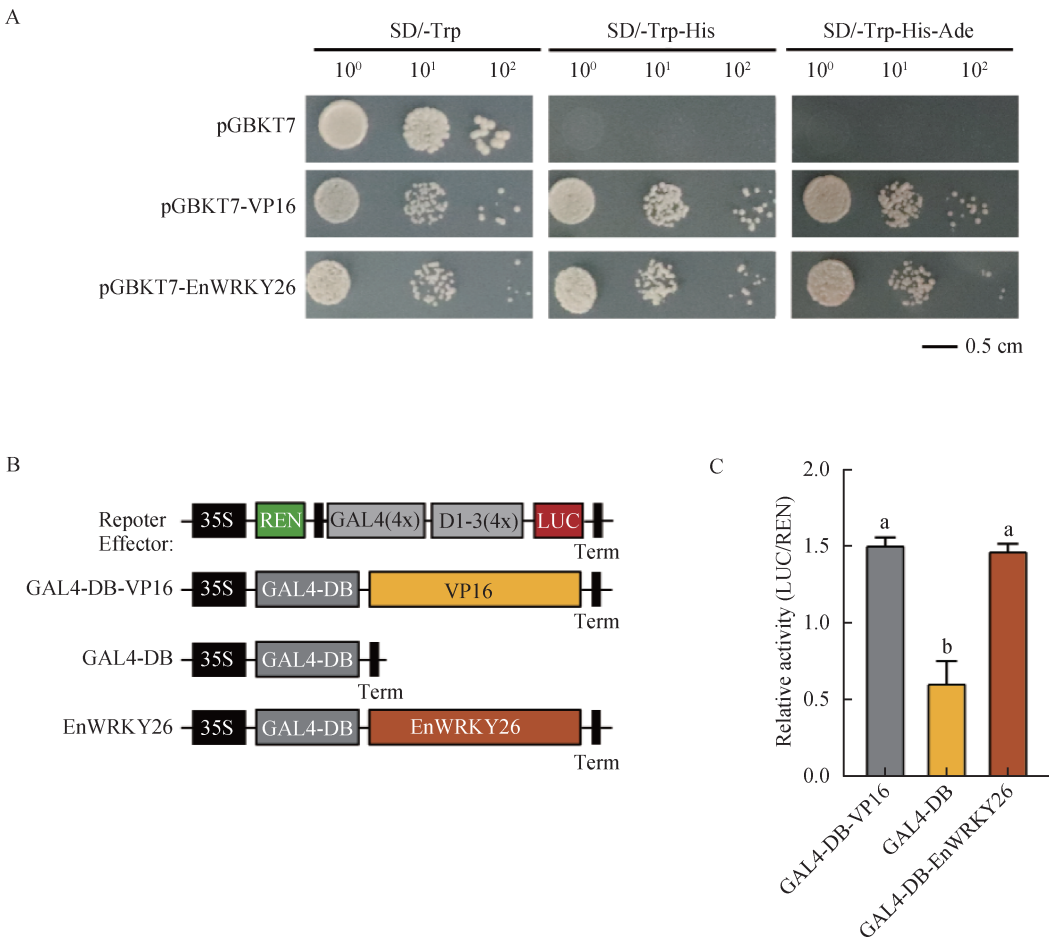


图 5 *EnWRKY26* 转录因子活性的酵母系统分析(A)、双荧光素酶实验载体构建(B)和双荧光素酶检测分析(C)

Fig. 5 Yeast growth assay (A), dual-luciferase reporter vector construction (B) and dual-luciferase assay analysis (C) for transcriptional activation of *EnWRKY26*

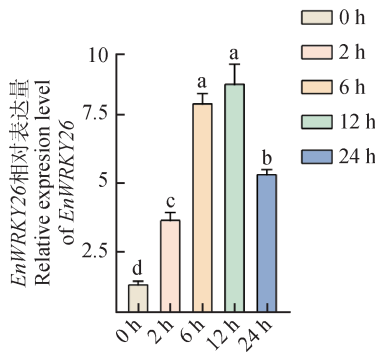


图 6 不同盐胁迫时间下垂穗披碱草 *EnWRKY26* 的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of *EnWRKY26* in *Elymus nutans* under salt stress at different time points

基础和分子调控机制,特别是关键基因的功能认知,仍存在巨大空白。因此,在当前研究背景下,发掘其耐盐基因具有重要意义。

序列比对显示垂穗披碱草 *EnWRKY26* 与水稻 *OsWRKY71*, *OsWRKY28* 等蛋白在 WRKY 结构域

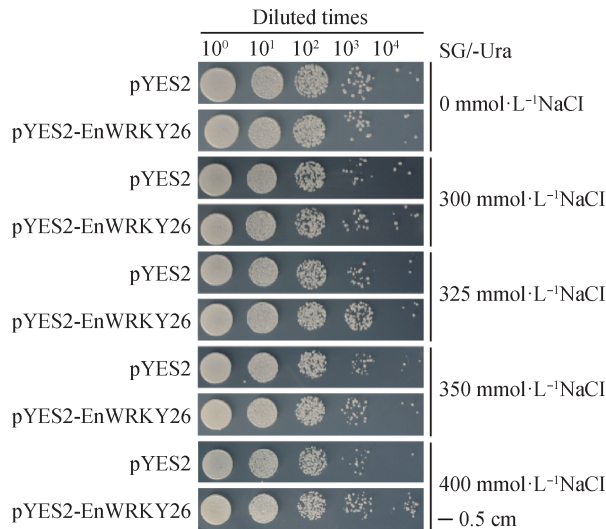


图 7 盐胁迫下 *EnWRKY26* 的酵母生长表型分析

Fig. 7 Yeast growth phenotype of *EnWRKY26* under salt stress

高度保守,而现有文献普遍报道这些同源蛋白主要参与调控植物抗病、抗冷等反应,并没有报道其耐

盐作用。例如,OsWRKY71被证实通过激活水杨酸信号通路正调控水稻对白叶枯病的抗性^[41]、对植株耐冷发挥积极的功能^[42];OsWRKY28负向调控水稻对稻瘟病菌的基础抗性,其作用是防止免疫反应过度激活,维持免疫稳态^[43];拟南芥AtWRKY18可以正向调节防御相关基因的表达和抗病性^[44]。而本研究中垂穗披碱草EnWRKY26表现出对盐胁迫的响应,丰富了WRKY转录因子家族功能的多样性,为深入研究其抗盐功能及分子机制提供依据。

基因相对表达量结果表明,该基因的表达受盐胁迫诱导,其表达水平先升高,在胁迫处理后的12小时达到峰值,随后虽有所下降,但在整个处理期间仍高于对照组。这种快速诱导并随后回落的表达模式是许多胁迫响应基因,特别是转录因子的典型特征^[45-46]。该基因表达的迅速上调,暗示着它可能是一个早期应答基因。且该蛋白为不稳定蛋白,不稳定的蛋白往往参与快速响应机制,以便及时被清除,避免持续激活下游通路,这也支持了EnWRKY26可能作为“早期响应转录因子”的假设,其不稳定性有助于精确调控胁迫响应。

本研究主要从表达层面揭示了该基因的响应模式,其确切的生物学功能仍有待进一步探究。目前垂穗披碱草已经有转化体系^[47],未来的研究将通过转基因功能验证(如在模式植物中过表达/敲除)等技术手段,深入阐明EnWRKY26在垂穗披碱草耐盐性中的具体分子机制。

4 结论

本研究从‘巴青’垂穗披碱草中成功克隆了EnWRKY26基因,其编码区全长996 bp,共编码331个氨基酸。生物信息学分析表明其为一种不稳定亲水性蛋白,且无跨膜结构域,系统进化分析显示其与小麦中的同源蛋白亲缘关系最近,亚细胞定位证实该蛋白定位于细胞核,功能验证显示该蛋白具有转录激活活性,表达分析表明EnWRKY26受盐胁迫诱导,呈现先上升后下降的动态响应趋势,盐胁迫下酵母表型证明其可能响应盐胁迫。本研究初步揭示了EnWRKY26在垂穗披碱草盐胁迫应答中的调控作用,为进一步解析其分子机制提供了重要理论支撑,也为高寒盐渍区草地恢复与分子育种提供了候选基因和理论依据。

参考文献

- [1] 王传旗,梁莎,扎西次仁,等. 温度对西藏3种野生披碱草属牧草种子萌发的影响[J]. 西藏大学学报(自然科学版),2016,31(2):63-67
WANG C Q, LIANG S, ZHAXICIREN, et al. Effects of temperature on seed germination of three wild *Elymus* species in Tibet[J]. Journal of Tibet University, 2016, 31(2): 63-67
- [2] 张典业,张丽静,黄德君,等. 高寒地区垂穗披碱草种质资源综合评价[J]. 草地学报,2015,23(6):1239-1246
ZHANG D Y, ZHANG L J, HUANG D J, et al. Comprehensive evaluation of germplasm resource of *Elymus nutans* in Alpine Region[J]. Acta Agrestia Sinica, 2015, 23(6): 1239-1246
- [3] 龙建廷,许赵佳,苏志刚,等. 巴青垂穗披碱草种子产量与农艺性状相关性分析[J]. 草业科学,2024,41(1):99-105
LONG J T, XU Z J, SU Z G, et al. Correlation analysis of seed yield with agronomic traits in *Elymus nutans* ‘Baqing’ [J]. Pratacultural Science, 2024, 41(1): 99-105
- [4] 郭荣明,赵芯,高国荣,等. 垂穗披碱草的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学,2024,45(2):73-81
GUO R M, ZHAO X, GAO G R, et al. Research progress on *Elymus nutans*[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2024, 45(2): 73-81
- [5] EGAMBERDIEVA D, WIRTH S, BELLINGRATH-KIMURA S D, et al. Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2791
- [6] SHRIVASTAVA P, KUMAR R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2015, 22(2): 123-131
- [7] METHELA N J, ISLAM M S, DAS A K, et al. Antioxidant mechanisms in salt-stressed Maize (*Zea mays* L.) seedlings: comparative analysis of tolerant and susceptible genotypes[J]. Applied Biological Chemistry, 2024, 67(1): 109
- [8] LONG J T, DONG M J, WANG C Q, et al. Effects of drought and salt stress on seed germination and seedling growth of *Elymus nutans*[J]. PeerJ, 2023, 11: e15968
- [9] 曹仕龙,廖暑杰,胡龙兴,等. 4种饲草种子在不同浓度盐胁迫下的萌发特性和产量[J]. 草业科学,2024,41(10):2355-2367
CAO S L, LIAO S J, HU L X, et al. Effects of salt stress on seed germination and yields of four forage species[J]. Pratacultural Science, 2024, 41(10): 2355-2367
- [10] 付江涛. 青海西宁盆地两种披碱草属植物耐盐能力及水土保持能力研究[J]. 水土保持,2020(4):45-56
FU J T. Soil and water conservation and salt resistance capacity of two *Elymus* species in the Xining Basin, Qinghai[J]. Open Journal of Soil and Water Conservation, 2020(4): 45-56
- [11] 罗天,黄翠碧,牟腾慧,等. 盐碱胁迫对苏丹草种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 畜牧与饲料科学,2025,46(3):83-88

- LUO T, HUANG C B, (MOU/MU) T H, et al. Effects of salt and alkali stress on seed germination and seedling growth of sorghum sudanense[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2025, 46(3): 83-88
- [12] 李琬玉, 李承龙, 王耀浦, 等. 外源物质缓解植物盐胁迫研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2025, 31(3): 597-609
- LI W Y, LI C L, WANG Y P, et al. Research progress of exogenous substances alleviating plant salt stress[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2025, 31(3): 597-609
- [13] 张碧茹, 米俊珍, 赵宝平, 等. 盐碱胁迫下燕麦幼苗生长生理差异及耐盐碱阈值[J]. 西北农业学报, 2024, 33(10): 1849-1857
- ZHANG B R, MI J Z, ZHAO B P, et al. Physiological difference and saline-alkali tolerance threshold of oat seedlings under saline-alkali stress[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2024, 33(10): 1849-1857
- [14] ZHANG H, HAN B, WANG T, et al. Mechanisms of plant salt response: insights from proteomics[J]. Journal of Proteome Research, 2012, 11(1): 49-67
- [15] 孙启国, 张凯露, 彭路平, 等. 蒺藜苜蓿耐盐关键基因 *MtCML17* 的非生物胁迫表达及耐盐性[J]. 江苏农业科学, 2025, 53(15): 54-62
- SUN Q G, et al. Abiotic stress expression and salinity tolerance of key salt-tolerant gene *MtCML17* in *Medicago truncatula*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2025, 53(15): 54-62
- [16] NEFISSI OUERTANI R, ARASAPPAN D, ABID G, et al. Transcriptomic analysis of salt-stress-responsive genes in barley roots and leaves[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(15): 8155
- [17] 王沛, 陈玖红, 王平, 等. 披碱草属植物抗逆性研究现状和存在的问题[J]. 草业学报, 2019, 28(5): 151-162
- WANG P, CHEN J H, WANG P, et al. Status of research into the abiotic stress tolerance of *Elymus* species[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(5): 151-162
- [18] PHUKAN U J, JEENA G S, SHUKLA R K. WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 760
- [19] 罗贵, 朱历勇, 谷雷, 等. WRKY 转录因子调控植物次生代谢物研究进展[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2025, 53(3): 115-128
- LUO G, ZHU L Y, GU L, et al. Research progress on WRKY transcription factors in regulating plant secondary metabolites[J]. Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition), 2025, 53(3): 115-128
- [20] WANI S H, ANAND S, SINGH B, et al. WRKY transcription factors and plant defense responses: latest discoveries and future prospects[J]. Plant Cell Reports, 2021, 40(7): 1071-1085
- [21] 谢政文, 王连军, 陈锦洋, 等. 植物 WRKY 转录因子及其生物学功能研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(3): 46-54
- XIE Z W, WANG L J, CHEN J Y, et al. Studies on WRKY transcription factors and their biological functions in plants[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2016, 18(3): 46-54
- [22] JIANG J J, MA S H, YE N H, et al. WRKY transcription factors in plant responses to stresses[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2017, 59(2): 86-101
- [23] AHMAD Z, RAMAKRISHNAN M, WANG C Y, et al. Unravelling the role of WRKY transcription factors in leaf senescence: genetic and molecular insights[J]. Journal of Advanced Research, 2025, 74: 191-206
- [24] 严帅凤, 赵梦冉, 徐倩, 等. 紫花苜蓿 *MsWRKY47* 基因的克隆及耐盐功能分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(4): 38-47
- YAN S F, ZHAO M R, XU Q, et al. Cloning and functional analysis of *MsWRKY47* gene in alfalfa under salt stress[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2025, 51(4): 38-47
- [25] 王荣, 王朋飞, 石晓英, 等. 苹果 WRKY 转录因子 MdWRKY26 克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2025, 23(8): 2578-2582
- WANG R, WANG P F, SHI X Y, et al. Cloning and expression analysis of apple WRKY transcription factor Md WRKY26[J]. Molecular Plant Breeding, 2025, 23(8): 2578-2582
- [26] XIONG Y, YUAN S, XIONG Y L, et al. Analysis of allohexaploid wheatgrass genome reveals its Y haplome origin in Triticeae and high-altitude adaptation[J]. Nature Communications, 2025, 16: 3104
- [27] CHANG D, JIA S G, SUN M, et al. A reference genome assembly of the Alpine forage grass *Elymus nutans*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23(9): 3900-3902
- [28] 于颖, 刘佳欣, 周美琪, 等. 用于植物基因研究的 mCherry 表达载体构建及定位表达[J]. 植物研究, 2017, 37(2): 194-199
- YU Y, LIU J X, ZHOU M Q, et al. Construction and expression of mCherry expression vector used in plant[J]. Bulletin of Botanical Research, 2017, 37(2): 194-199
- [29] 邱涌森, 郑玉莹, 谢文刚. 我国垂穗披碱草遗传育种研究进展[J]. 中国草地学报, 2022, 44(2): 98-106
- QIU Y S, ZHENG Y Y, XIE W G. Advances in genetics and breeding of *Elymus nutans* in China[J]. Chinese Journal of Grassland, 2022, 44(2): 98-106
- [30] 段成伟, 杨鑫光, 孙华方, 等. 柴达木盆地 8 种高寒禾草耐盐碱性评价[J]. 干旱地区农业研究, 2025, 43(3): 22-33
- DUAN C W, YANG X G, SUN H F, et al. Evaluation of saline-alkali tolerance of eight Alpine grasses in the Qaidam Basin[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2025, 43(3): 22-33
- [31] 陆光平, 聂斌. 垂穗披碱草利用价值评价[J]. 草业科学, 2002, 19(9): 13-15
- LU G P, NIE B. Field evaluation of *Elymus nutans* under Alpine grassland conditions[J]. Pratacultural Science, 2002, 19(9): 13-15
- [32] 徐田伟, 赵新全, 张晓玲, 等. 青藏高原高寒地区生态草牧业可持续发展: 原理、技术与实践[J]. 生态学报, 2020, 40(18): 6324-6337

- XU T W, ZHAO X Q, ZHANG X L, et al. Sustainable development of ecological grass-based livestock husbandry in Qinghai-Tibet Plateau Alpine area: principle, technology and practice[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40(18): 6324-6337
- [33] 姚泽英, 李军, 宋连昭, 等. 垂穗披碱草与紫花苜蓿不同时期交叉混播效果研究[J]. *草地学报*, 2020, 28(5): 1454-1459
- YAO Z Y, LI J, SONG L Z, et al. Study on the effect of cross sowing of *Elymus nutans* and *Medicago sativa* in different periods[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2020, 28(5): 1454-1459
- [34] 赵永强, 张俊超, 赵旭红, 等. 垂穗披碱草落粒性评价及农艺性状的相关性分析[J]. *草业科学*, 2017, 34(8): 1711-1720
- ZHAO Y Q, ZHANG J C, ZHAO X H, et al. Assessment of seed shattering and analysis of agronomic traits in *Elymus nutans*[J]. *Pratacultural Science*, 2017, 34(8): 1711-1720
- [35] 田彦婷, 高童童, 王鑫渝, 等. 外源甜菜碱对NaCl胁迫下垂穗披碱草种子萌发的影响[J]. *高原农业*, 2022, 6(1): 1-10
- TIAN Y T, GAO T T, WANG X Y, et al. Effects of exogenous *Glycine* betaine on seed germination of *Elymus nutans* Griseb under NaCl stress[J]. *Journal of Plateau Agriculture*, 2022, 6(1): 1-10
- [36] 路兴旺, 刘博, 陶小燕, 等. 同域分布垂穗披碱草和达乌力披碱草遗传多样性和遗传结构分析[J]. *广西植物*, 2021, 41(3): 418-428
- LU X W, LIU B, TAO X Y, et al. Genetic diversity and genetic structure in populations of sympatric *Elymus nutans* and *E. dahuricus*[J]. *Guihaia*, 2021, 41(3): 418-428
- [37] DOU Q W, YU F, LI Y, et al. High molecular karyotype variation revealed in indigenous *Elymus nutans* in the Qinghai Plateau[J]. *Plant Diversity*, 2017, 39(3): 117-122
- [38] 马凯凯, 白梅梅, 李颖, 等. 休牧时期对高寒草甸垂穗披碱草种子大小和萌发特性的影响[J]. *草原与草坪*, 2024, 44(3): 178-184
- MA K K, BAI M M, LI Y, et al. Effects of rest grazing periods on seed size and germination characteristics of *Elymus nutans* in Alpine meadow[J]. *Grassland and Turf*, 2024, 44(3): 178-184
- [39] 罗鑫, 闫利军, 李达旭, 等. 野生垂穗披碱草种质资源抗旱性筛选与评价[J]. *草地学报*, 2024, 32(7): 2158-2168
- LUO X, YAN L J, LI D X, et al. Screening and evaluation of drought resistance of wild *Elymus nutans* Griseb [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2024, 32(7): 2158-2168
- [40] FU J J, GENG J C, MIAO Y J, et al. Transcriptomic analyses reveal genotype- and organ-specific molecular responses to cold stress in *Elymus nutans*[J]. *Biologia Plantarum*, 2018, 62(4): 671-683
- [41] LIU X Q, BAI X Q, WANG X J, et al. OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164(8): 969-979
- [42] BATALLER S, DAVIS J A, GU L K, et al. Disruption of the *OsWRKY71* transcription factor gene results in early rice seed germination under normal and cold stress conditions[J]. *BMC Plant Biology*, 2024, 24(1): 1090
- [43] CHUJO T, MIYAMOTO K, SHIMOGAWA T, et al. OsWRKY28, a PAMP-responsive transrepressor, negatively regulates innate immune responses in rice against rice blast fungus[J]. *Plant Molecular Biology*, 2013, 82(1): 23-37
- [44] CHEN C H, CHEN Z X. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* Transcription factor[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(2): 706-716
- [45] 付乾堂, 余迪求. 拟南芥 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 在非生物胁迫条件下的表达分析[J]. *遗传*, 2010, 32(8): 848-856
- FU Q T, YU D Q. Expression profiles of *AtWRKY25*, *AtWRKY26* and *AtWRKY33* under abiotic stresses[J]. *Hereditas*, 2010, 32(8): 848-856
- [46] LI C, GUAN J, LIANG W H, et al. OsWRKY72 enhances salt tolerance in rice via SKC1-mediated Na⁺ regulation[J]. *Plant Stress*, 2025, 17: 100962
- [47] LI C, PENG X M, ZHANG Z S, et al. Establishment of Agrobacterium-mediated genetic transformation and CRISPR/Cas9-guided gene editing in *Elymus nutans* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2025, 310: 154513

(责任编辑 彭露茜)