

荔枝 *LcWRKY47* 基因的克隆、亚细胞定位、表达及延缓果实褐变的功能初探

程南谱^{1,2}, 王 鑫^{1,3}, Muhammad Muzammal ASLAM^{1,2}, 邵远志^{1,4}, 李 雯^{1,2*}

1. 海南大学三亚南繁研究院, 海南三亚 572025; 2. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 3. 海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570228; 4. 海南大学生命健康学院, 海南海口 570228

摘 要: 荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 是亚热带地区重要的经济作物之一, 但荔枝采后难贮存、易褐变, 是目前保鲜过程中存在的最大问题之一。WRKY 家族是植物中常见的一类转录因子, 主要调控植物的逆境胁迫响应以及成熟衰老等生理过程。为了探究 WRKY 对采后荔枝果实成熟衰老的影响, 本研究以妃子笑荔枝为试验对象, 克隆 *LcWRKY47* 基因, 长度为 1077 bp; *LcWRKY47* 编码的蛋白中含有 WRKY 保守结构域, 二级结构以无规则卷曲为主, 占比 65.64%, 三级结构主要为无规则卷曲和 α -螺旋。通过 motif 分析及多序列比对, 发现 *LcWRKY47* 蛋白属于第 II 类 WRKY 转录因子; 系统进化分析树表明荔枝 *LcWRKY47* 与同为无患子科的龙眼 *DIWRKY47* 亲缘关系最近; 亚细胞定位试验表明, *LcWRKY47* 蛋白定位在细胞核中; RT-qPCR 分析表明, 2 mmol/L 草酸处理后 *LcWRKY47* 基因在荔枝果皮和果肉中的表达趋势相同, 均先升后降, 后期处理组表达量均显著高于对照组, 推测草酸处理后该转录因子在荔枝果实成熟衰老过程中起正调控作用。过表达 *LcWRKY47* 基因发现, 转基因果实中 *LcWRKY47* 的表达量显著高于对照果实, 且转基因荔枝衰老褐变情况明显优于处理组。综上推测, *LcWRKY47* 转录因子可能在荔枝衰老与褐变过程中起着调节作用。

关键词: 荔枝; WRKY 转录因子; 基因克隆; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: S667.1 文献标志码: A

Preliminary Study on the Cloning, Subcellular Localization and Expression of *LcWRKY47* in Litchi and its Function in Delaying Fruit Browning

CHENG Nanpu^{1,2}, WANG Xin^{1,3}, Muhammad Muzammal ASLAM^{1,2}, SHAO Yuanzhi^{1,4}, LI Wen^{1,2*}

1. Sanya Nanfan Research Institute of Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 3. School of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 4. School of Life and Health Science, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) is one of the important economic crops in subtropical areas. However, it is difficult to store litchi after picking and easy to browning, which is one of the biggest problems in the preservation process. WRKY family is a common transcription factor in plants, which mainly regulates physiological processes such as plant stress response and maturation. In order to research the effect of WRKY on the ripening and senescence process of litchi fruit after harvest, this study took Feiziao litchi as the experimental object, and cloned *LcWRKY47* gene. The gene length was 1077 bp. The protein contains WRKY conserved domain. The secondary structure is dominated by random curling, accounting for 65.64%, and the tertiary structure is dominated by random curling and α -helix. Through motif analysis and multiple sequence alignment, *LcWRKY47* protein was found to be a class II WRKY transcription factor. Phylogenetic analysis showed that *LcWRKY47* in litchi was closely related to *DIWRKY47* in longan, which are all classified as Sapindaceae. Subcellular localization experiments showed that *LcWRKY47* protein was localized in the nucleus. RT-qPCR analysis showed that after treatment with 2 mmol/L oxalic acid, the expression of *LcWRKY47* gene in

收稿日期 2024-04-02; 修回日期 2024-05-24

基金项目 海南省院士团队创新中心建设项目 (No. SQ2021YSPTJXRWS0074); 海南省热带果蔬保鲜联盟 (No. HDLM201901)。

作者简介 程南谱 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 果树采后保鲜。*通信作者 Corresponding author: 李 雯 (LI Wen), E-mail: liwen9-210@163.com。

the peel and pulp of litchi showed the same trend, which increased first and then decreased, and the expression level of *LcWRKY47* gene in the treatment group was significantly higher than that in the control group after storage, suggesting that this transcription factor plays a positive role in the regulation of oxalic acid in the ripening and senescence process of litchi fruit. Overexpression of *LcWRKY47* gene showed that the expression level of *LcWRKY47* in transgenic fruits was significantly higher than that in control fruits, and the senescence process and browning of transgenic litchi was significantly better than that in treatment group. In conclusion, *LcWRKY47* transcription factor may play a regulatory role in the senescence and browning process of litchi.

Keywords: litchi; WRKY transcription factor; gene cloning; subcellular localization; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.10.003

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 是无患子科荔枝属的亚热带常绿果树, 是非呼吸跃变型水果, 原产于中国南方^[1], 主要产区为广东、广西、福建、海南等地区, 果肉多汁, 口感极佳, 营养丰富, 深受大众喜爱, 经济价值高, 有“岭南佳果”的美称^[2], 是我国亚热带地区重要的果树品种之一, 也是我国特色经济果树^[3]。但由于荔枝在夏季高温高湿的特殊时期成熟, 果实含水量高, 新陈代谢旺盛, 采收后营养物质会被迅速消耗^[4], 生理变化剧烈, 同时果皮上的病原菌迅速生长, 容易引起荔枝褐变和变质, 导致荔枝商品经济价值下降^[5], 荔枝自身的衰老褐变严重影响到荔枝的采后贮藏品质。草酸 (oxalic acid, OA) 是一种普遍存在的有机酸, 在各种代谢过程中起着重要作用^[6]。据报道, OA 可以通过提高果实抗病能力和抗氧化活性, 延缓呼吸速率和果实成熟衰老, 有效地保持园艺产品的品质^[7]。

WRKY 转录因子家族是植物中最大的转录因子家族之一^[8]。第 1 个 WRKY 基因 *SPE1* 于 1994 年从甘薯中分离得到^[9], 随着其他植物的基因组测序, 越来越多的 WRKY 基因在不同植物物种中得到鉴定和克隆, 已在拟南芥、番茄、小麦、大豆、水稻和玉米等许多物种中得到鉴定^[10]。转录因子通常包含 4 个功能区, 即转录调控域 (激活区和抑制区)、DNA 结合域、寡聚化位点和核定位信号, 使转录因子在不同情况发挥不同功能^[11]。之所以将其命名为 WRKY 转录因子, 是因为 WRKY 蛋白质序列包含 60 个氨基酸残基组成的 DNA 结合域, 并且该结构域的 N 端具有 WRKYGOK 序列组成的 WRKY 高度保守结构域^[12]。然而, 在少数 WRKY 蛋白中, WRKYGQK 的氨基酸序列存在不同的突变类型, 有 WRKYGEK、WRKYGMK、WRKYGKK、WSKYEQK 或 WIKYGEN 等。一般而言 N 端至少存在 1 个 WRKY 保守结构域, C 端则包含 1 个锌指结构基序 $C_2H_2(C-X_{4-5}-C-X_{22-23}-$

$H-X-H)$ 或 $C_2HC(C-X_7-C-X_{23}-H-X-C)^{[13]}$ 。根据 WRKY 结构域的数量和锌指基序的类型, WRKY 转录因子可分为 3 个主要亚家族, I 类亚家族有 2 个含有 C_2H_2 型锌指基序的 WRKY 结构域, II 类亚家族有 1 个含有 C_2H_2 型锌指基序的 WRKY 结构域, III 类亚家族具有 1 个含有 C_2H_2 型锌指基序的 WRKY 结构域^[14]。

大量研究证明, WRKY 转录因子在植物的生长发育中起着重要作用, 参与调节植物多种生理过程, 拟南芥 *AtWRKY23* 调控根毛发育^[15], 小麦 *TaWRKY71* 调控种子萌发等过程^[16], 玉米 *ZmWRKY11* 调控种皮发育^[17], 棉花 *GhWRKY15* 调控茎生长^[18]、参与碳水化合物合成、次生代谢产物合成, 拟南芥 *AtWRKY75* 通过影响水杨酸 (salicylic acid, SA) 积累和 H_2O_2 清除参与调控叶片衰老过程^[19], 芸苔型油菜 *BnWRKY47* 能够促进氮从老叶到幼叶或种子的再动员, 使幼叶优先生长, 抑制整株植株的衰老死亡^[20]。

迄今为止, 越来越多 WRKY 转录因子在植物生长发育以及生物与非生物胁迫中的功能得到研究。但目前关于荔枝的 WRKY 转录因子的研究较少, 对荔枝 *LcWRKY47* 基因的研究未见报道。因此, 本研究以采后妃子笑荔枝为试验材料, 克隆 *LcWRKY47* 基因, 进行生物信息学分析和亚细胞定位分析, 同时通过 RT-qPCR (quantitative real-time, PCR) 分析 *LcWRKY47* 基因在果皮和果肉中的表达水平, 进一步利用过表达体系分析 *LcWRKY47* 转录因子调控采后荔枝成熟衰老的功能, 为深入分析 WRKY 转录因子在采后荔枝果实中的生物学功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用妃子笑荔枝鲜果为试验材料, 挑选无病虫害、无机械损伤、形状、大小、外观颜色一致

的荔枝果实。以 2 mmol/L OA 溶液浸泡 10 min 的荔枝果实为处理组,以清水浸泡 10 min 为对照组,处理后随机选取 30 个荔枝为 1 组,每组 3 个重复,分别装入保鲜袋中,贮藏在 8 ℃、相对湿度为 85%~90% 的培养箱中,每 2 d 取 1 次样,用液氮将所取样品速冻后保存在 -80 ℃ 超低温冰箱中,用于后续试验。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取与 *LcWRKY47* 基因全长克隆 以荔枝果皮为材料,使用改良的 CTAB 法从果皮、果肉中提取 RNA^[21],随后分别逆转录成 cDNA。使用 NOVA 逆转录试剂盒(All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix with dsDNase)进行 cDNA 的合成。利用 Primer 6 软件设计 *LcWRKY47* 的全长扩增特异性引物,序列分别为 *LcWRKY47*-F: 5'-ATGTCAAGTTCTAAATGTC-3', *LcWRKY47*-R: 5'-CTAGTTGGTAGAGAAAGTGG-3'。用 2×Phanta[®] Max Master Mix (Dye plus)高保真酶进行 PCR 扩增,PCR 反应程序如下:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 15 s,55 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 30 s,35 个循环;最后 72 ℃ 反应 5 min,得到 *LcWRKY47* 的开放阅读框(open reading frame, ORF)序列,PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳检测,随后用 Omega 胶回收试剂盒(E.Z.N.A. Gel Extraction Kit)回收目的基因条带。纯化产物连接 pCE2 TA/Blunt-Zero 载体(Vazyme TA/Blunt-Zero Cloning Kit),然后将连接产物转化至大肠杆菌感受态(维地生物, *E. coli* DH5 α),挑取阳性菌落于 LB 培养基中培养,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.2 *LcWRKY47* 蛋白的生物信息学分析 利用 ExPASy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>)分析蛋白的分子量、等电点、不稳定系数等理化性质,利用 ExPASy-ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale>)分析蛋白的亲疏水性,利用 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)和 SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0>)分析蛋白质的跨膜结构及信号肽预测。利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=np sa%20_sopma.html)分析 *LcWRKY47* 蛋白的二级结构,并使用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>)分析预测 *LcWRKY47* 蛋白的三维结构;利用在线网站 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>)进行多序列比对;利用在线网站 MEME 5.5.0 ([\[suite.org/meme\]\(https://meme-suite.org/meme\)\)分析 motif 结构,将 motif 数设置为 8;使用 MEGA 5 软件构建系统进化树,并使用邻接法构建。](https://meme-</p></div><div data-bbox=)

1.2.3 亚细胞定位 利用 Novopro Bioscience (<https://www.novoprolabs.com/tools/nls-signal-prediction>)预测蛋白的核定位序列(nuclear localization sequence, NLS)。使用洋葱内表皮作为侵染材料,通过洋葱内表皮转化法进行亚细胞定位分析^[22]。设计双酶切正向引物 F:TCTAGAATGTCAAGTTCTAAAATGTCAGCCC,反向引物 R:GGTACCGTTGGTAGAGAAAGTGGTGCAAGA。通过双酶切法将 *LcWRKY47* 基因构建到 pCambia1300-GFP 载体上,生成 35S::LcWRKY47-GFP 融合表达载体,将重组质粒转化至 GV3101 农杆菌,制备 OD₆₀₀ 为 0.8~1.0 的悬浮液,再将洋葱内表皮(1.5 cm×1.5 cm)浸泡在悬浮液中减压 10 min,用滤纸吸去洋葱内表皮上多余的菌液,再将其转移到铺有滤纸的 MS 固体培养基上,放置在 25 ℃ 培养箱中避光培养 2 d 后,制成玻片,在荧光生物摄像显微镜下观察荧光信号。

1.2.4 *LcWRKY47* 基因的表达量分析 利用 Primer 5 软件设计 *LcWRKY47* 基因定量引物,分别为正向引物 F:5'-CACGGCAATGGCTAACACAACC-3',反向引物 R:5'-AATGGTGCAGAAGCGGAGAGG-3';内参基因引物 *Actin*-F:5'-ACCGTATGAGCAAGGAAATCACTG-3',*Actin*-R:5'-TCGTCGTACTCACCCCTTTGAAATC-3'。使用试剂盒(TOLOBIO 2×Q3 SYBR qPCR Master Mix)进行 RT-qPCR 扩增,采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算基因的相对表达量,每次测定均有 3 个重复。

1.2.5 瞬时过表达体系验证 *LcWRKY47* 的功能 设计双酶切正向引物 F:5'-GGATCCATGTCAAGTTCTAAATGTC-3',反向引物 R:5'-GAATTCCTAGTTGGTAGAGAAAGTGG-3'。酶切位点为:上游 *Bam*H I (GGATCC),下游 *Eco*R I (GAATTC)。通过双酶切法将扩增的 *LcWRKY47* 编码序列构建到 pGreenII 62-SK 载体上,并将 SK-*LcWRKY47* 和空 SK 载体转化至农杆菌 GV3101,其中空载体组作为对照。参考 GONG 等^[23]的方法,并进行一些修改,在果实茎部附近注射 1 mL 侵染液,然后将注射过的荔枝果实在侵染液中减压浸泡 20 min,对荔枝果实进行侵染,随后将侵染过的荔枝果实置于(25±1)℃、相对湿度为 85%~

90%条件下进行培养。在注射后的第 1 天和第 3 天进行取样,通过 RT-qPCR 测定对应基因的表达量,每次测定均有 3 个重复。

1.3 数据处理

使用 Office 2021 软件进行数据统计与计算,使用 SPSS 22.0 软件分析数据差异显著性 (IBM Corp, 美国),采用 Duncan 法分析比较差异数据显著性 ($P < 0.05$),使用 GraphPad Prism 8 软件对 *LcWRKY47* 基因相对表达量进行作图。

2 结果与分析

2.1 *LcWRKY47* 基因的克隆及其蛋白的理化性质分析

使用 *LcWRKY47* 的全长引物克隆出 ORF 长度为 1077 bp 的扩增片段 (图 1A)。*LcWRKY47* 基因编码 358 个氨基酸,对 *LcWRKY47* 蛋白理化性质进行预测,结果显示 *LcWRKY47* 蛋白分子式为 $C_{1651}H_{2622}N_{490}O_{525}S_{21}$, 相对分子质量为 38 409.21 kDa,总原子数为 5309,理论等电点为 8.84;氨基酸组成中带负电残基数量 (Asp+Glu) 为 26 个,带正电残基数量 (Arg+Lys) 为 31 个,蛋白质中脂肪族侧链氨基酸指数为 58.94,总平均亲水性值是 -0.535,表现为亲水性 (图 1B),不稳定性指数是 54.03,为不稳定蛋白。综上,该蛋白为碱性不稳定亲水蛋白。

2.2 *LcWRKY47* 蛋白结构分析

预测结果显示 *LcWRKY47* 蛋白中不存在信号肽 (图 2A),也并未发现跨膜区域 (图 2B),不是跨膜蛋白。*LcWRKY47* 蛋白的磷酸化可能发

生在丝氨酸 (Ser) 和苏氨酸 (Thr) 位点上,主要为丝氨酸位点,说明此蛋白发挥调控功能可能是以丝氨酸位点的磷酸化修饰为主 (图 2C)。*LcWRKY47* 蛋白的二级结构以无规则卷曲为主,占比为 65.64%,其余为 α -螺旋,占 21.79%、延伸链占 9.50%、 β -折叠占 3.07% (图 3A)。运用 SWISS-MODEL 在线程序对荔枝 *LcWRKY47* 蛋白的三维结构进行建模分析,发现 *LcWRKY47* 蛋白质的主要结构为无规则卷曲和 α -螺旋 (图 3B),其结果与二级结构的预测结果相一致。

2.3 *LcWRKY47* 蛋白 motif 分析及同源序列比对

选取 9 个与 *LcWRKY47* 同源性较高的 WRKY 转录因子进行 motif 分析,结果显示 motif 结构相似,在所有蛋白中均含有相同的 6 种 motif;与荔枝 *LcWRKY47* 所含 motif 数目和种类一致的有 2 个物种,分别为甜橙和陆地棉 (图 4A);氨基酸同源序列比对结果显示其氨基酸序列均包含 1 个 WRKY 结构域和 1 个 C_2H_2 型锌指基序。上述结果表明 *LcWRKY47* 蛋白属于第 II 类 WRKY 转录因子 (图 4B)。

2.4 *LcWRKY47* 蛋白的系统进化分析

选取无患子科植物、漆树科植物、芸香科植物以及大戟科植物等不同物种 WRKY 基因构建进化树,结果显示,荔枝 *LcWRKY47* 与同为无患子科的龙眼 *DIWRKY47* 聚在一起,亲缘关系最近,其次是芒果、阿月浑子和甜橙,而橡胶树、木薯、葡萄以及河岸葡萄则与荔枝 *LcWRKY47* 亲缘关系较远 (图 5)。

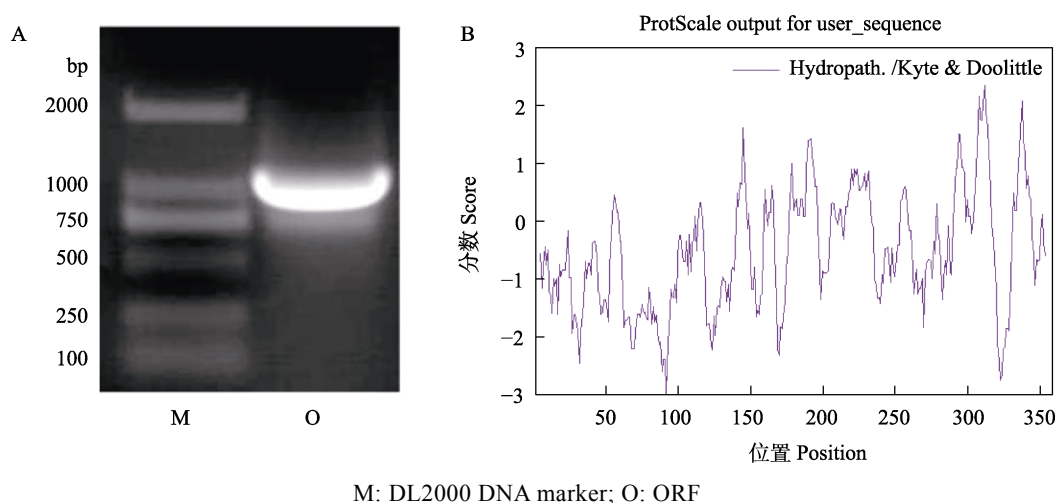


图 1 *LcWRKY47* 基因克隆 (A) 和蛋白亲疏水性分析 (B)

Fig. 1 Cloning of *LcWRKY47* gene (A) and hydrophilicity analysis of the protein (B)

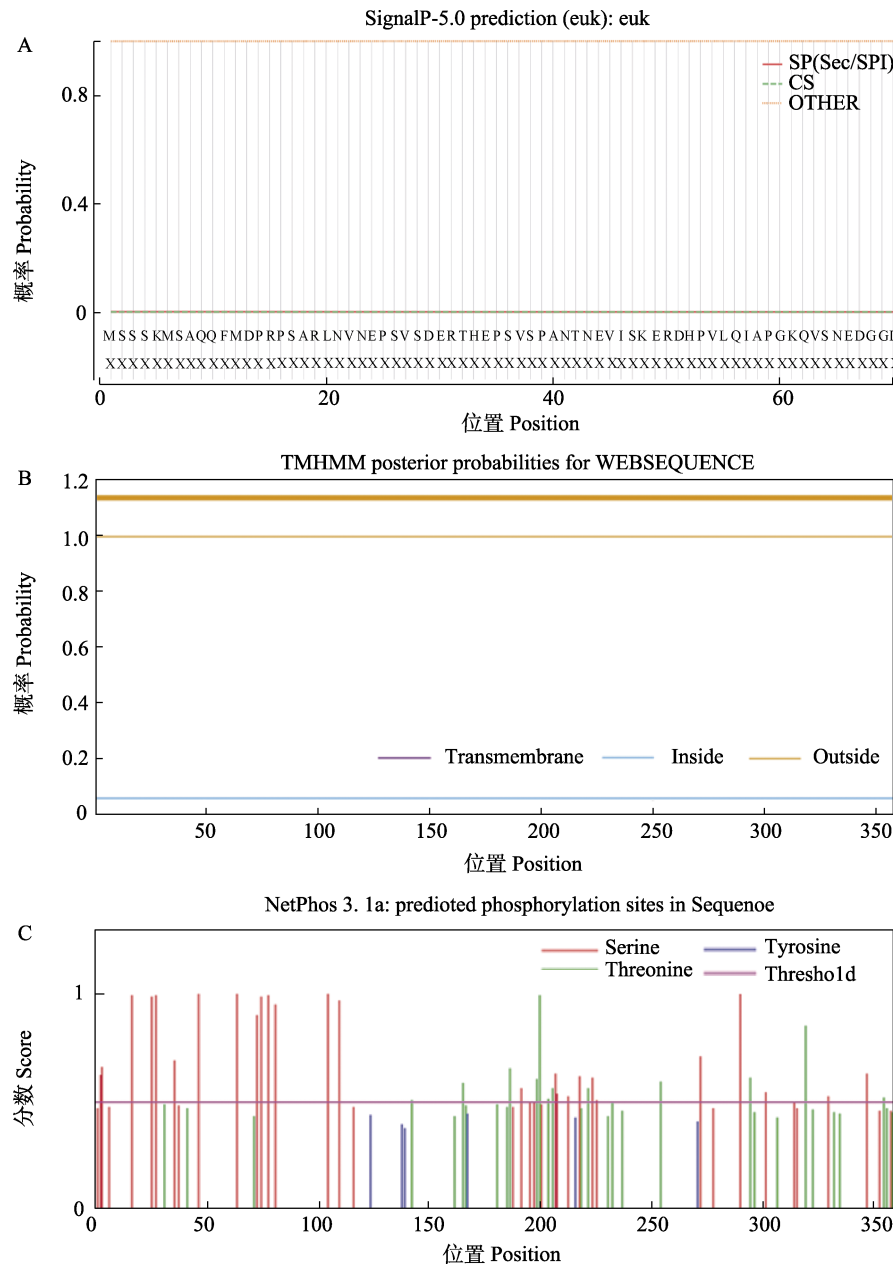


图 2 *LcWRKY47* 基因编码蛋白的信号肽 (A)、跨膜结构 (B) 及磷酸化位点分析 (C)
Fig. 2 Signal peptide (A), transmembrane structure (B) and phosphorylation site analysis (C) of the protein encoded by *LcWRKY47* gene

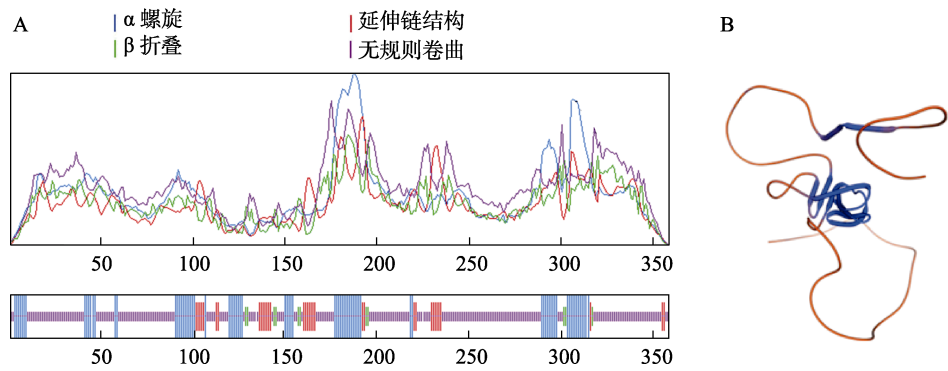


图 3 *LcWRKY47* 蛋白的二级结构 (A) 和三级结构 (B)
Fig. 3 Secondary structure (A) and tertiary structure (B) of *LcWRKY47* protein

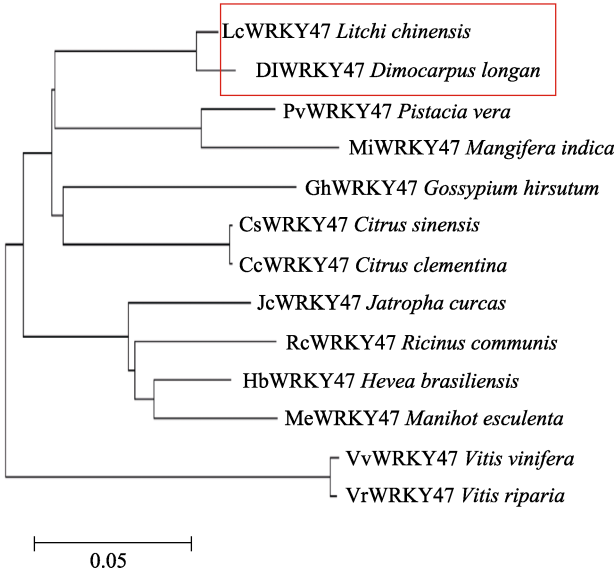


图 5 *LcWRKY47* 系统进化树分析
Fig. 5 *LcWRKY47* phylogenetic tree analysis

2.5 亚细胞定位结果分析

Novopro Bioscience 工具预测分析 *LcWRKY47* 蛋白的核定位序列为 PFRKARVSVRA，位于蛋白序列中 98~108 位置。在荧光生物摄像显微镜下观察到，35S::GFP 对照洋葱内表皮细胞中的

细胞核和细胞壁均检测到绿色荧光信号，而 35S::LcWRKY47-GFP 融合蛋白的绿色荧光信号仅出现在细胞核中，这表明荔枝 *LcWRKY47* 蛋白在洋葱内表皮细胞中定位于细胞核，符合转录因子所具有的核定位特征（图 6）。

2.6 *LcWRKY47* 基因的表达量分析

外源 OA 处理后，*LcWRKY47* 基因在荔枝果皮和果肉中的表达水平如图 7 所示。在荔枝果皮中 *LcWRKY47* 基因的表达量呈现先上调后下调的趋势（图 7A），CK 在 8 d 达到最大值，然后逐渐下降，而 OA 处理组在 10 d 达到最大值，之后呈现下降的趋势，且 OA 处理组只有在 2 d 时低于 CK，8 d 后显著高于 CK；在荔枝果肉中 *LcWRKY47* 基因的表达量呈现先上调后下调的趋势（图 7B），CK 在 6 d 达到最大值，OA 处理组在 8 d 达到最大值，之后均呈现下降的趋势，相较于 CK，8 d 后处理组 *LcWRKY47* 基因的表达水平整体高于 CK。*LcWRKY47* 在荔枝果皮与果肉中的表达模式相同，在贮藏后期表达量均上调，且显著高于 CK，表明 *LcWRKY47* 转录因子可能在 OA 调控果实成熟衰老过程中起正调控

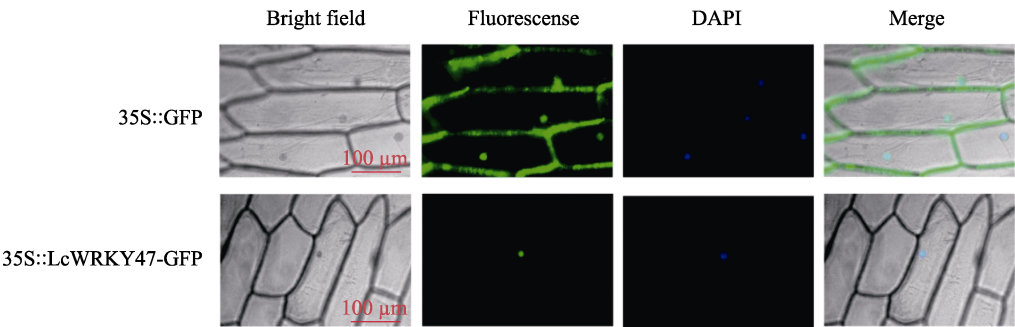
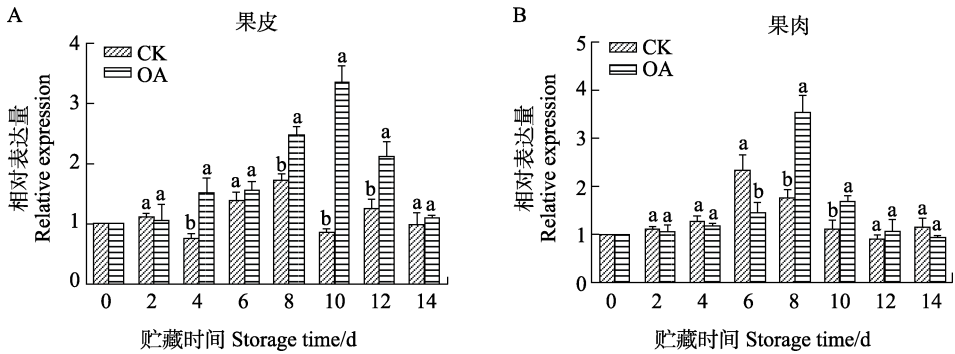


图 6 *LcWRKY47* 蛋白质亚细胞定位
Fig. 6 Subcellular localization of *LcWRKY47* protein



CK：空白对照；OA：草酸处理；不同小写字母表示处理间差异显著（ $P<0.05$ ）。
CK: Blank control; OA: Oxalic acid treatment; Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$).

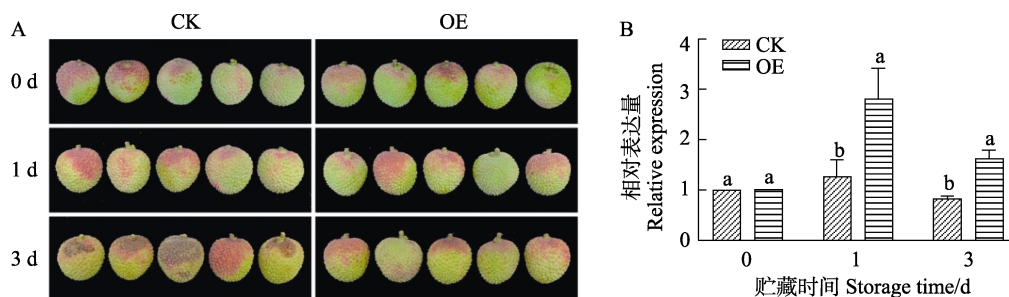
图 7 *LcWRKY47* 基因在草酸处理下果皮和果肉中的表达特征分析
Fig. 7 Expression characteristics of *LcWRKY47* gene in peel and pulp treated with oxalic acid

作用。

2.7 瞬时过表达验证 *LcWRKY47* 的基因表达量

为了验证 *LcWRKY47* 能否调控荔枝衰老褐变, 将 *LcWRKY47* 基因转入完整的荔枝果实。从图 8A 中可以看出, 在 3 d 时, CK 的整果外观失色

与褐变情况比转基因荔枝严重, 而此时转基因荔枝并未出现褐变等明显衰老现象。从图 8B 中可以看出, 在转基因果实中 *LcWRKY47* 的表达量高于 CK。综上, *LcWRKY47* 转录因子可能通过延缓荔枝的衰老与褐变来维持果实采后品质。



CK: 空白对照; OE: *LcWRKY47* 过表达; 不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)

CK: Blank control; OE: overexpression of *LcWRKY47*;

Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

图 8 过表达 *LcWRKY47* 基因的荔枝外观 (A) 和过表达后 *LcWRKY47* 基因的表达量 (B)

Fig. 8 Appearance of litchi overexpressing *LcWRKY47* gene (A) and expression level of *LcWRKY47* gene after overexpression (B)

3 讨论

在植物生长发育的过程中, WRKY 转录因子起着不可忽视的作用^[24]。WRKY 蛋白能够作为激活因子或阻遏因子参与细胞质和细胞核过程, 包括从细胞器或细胞质到细胞核的信号传递事件, 调控植物对生物和非生物刺激的反应过程, 参与协调发育过程中的内部信号。WRKY 可与靶基因启动子中的 W-box[TGACC(A/T)]结合, 激活或抑制下游基因的表达, 调控其应激反应^[25]。最新的研究发现 WRKY 在蔬菜叶片成熟、衰老等代谢过程中的重要作用, FAN 等^[26]从中国白菜叶片中克隆出 *BrWRKY65*, 发现 *BrWRKY65* 的表达随着采后叶片叶绿素降解和变黄而上调, 并且可以调控与叶绿素降解相关的 *BrNYC1*、*BrSGR1* 和 *BrDIN1* 等 3 个衰老相关基因, 从而影响采后叶片的衰老。有研究报道 WRKY 在果实成熟、衰老等多种生理过程中的重要作用, JI 等^[27]发现桃果实中 *PpSDH* 和 *PpCOX15* 等能量代谢基因能与 *PpWRKY46* 互作并被 *PpWRKY46* 上调表达, 调节桃子的能量代谢, 维持桃果实的品质与抗病性, 延缓桃果实的成熟衰老。综上, 推测 WRKY 在荔枝果实中可能存在类似的生物学功能, 但目前荔枝中的 WRKY 转录因子研究却鲜有报道。本研究中的荔枝 *LcWRKY47* 基因属于 WRKY II 类亚家族, 蛋白具有亲水性, 蛋白不稳定, 不包

含信号肽, 无跨膜结构; 二级结构和三级结构预测中包括 α -螺旋、 β -折叠、延伸链和无规则卷曲, 以无规则卷曲为主, 同时具有 WRKY 保守结构域和 1 个 C_2H_2 型锌指基序, 系统进化树分析表明 *LcWRKY47* 与同为无患子科的 *DIWRKY47* 亲缘关系最近。

妃子笑荔枝主要产于海南、广东, 皮薄肉厚核小, 香味浓郁, 多汁爽口, 是中早熟优质品种之一, 具有很高的经济价值和研究价值^[28]。然而荔枝采后难贮存、易变质、果皮易褐变等情况一直是荔枝保鲜目前存在的现实问题^[29]。OA 与植物的抗微生物、生物和非生物抗性有关^[30], 是极好的抗氧化剂, 可以增强超氧阴离子的清除能力, 阻止活性氧的形成^[31], 活性氧的产物之一是丙二醛, 是植物细胞膜脂质过氧化的产物, 造成细胞衰老和死亡^[32]。OA 处理可通过延缓呼吸速率和成熟, 降低丙二醛浓度, 延迟衰老, 增强抗病能力, 有效保持园艺产品的新鲜度和品质^[33]。近年来, OA 处理采后果实的保鲜效果受到广泛关注, 已有研究报道 OA 能够延迟香蕉的成熟, 抑制柑果的腐烂, 并防止荔枝果实产生褐变^[34-35]。OA 作为一种果实保鲜剂, 可能通过影响植物转录因子的表达来延缓果实的衰老与褐变, 从而起到保鲜的效果。因此本研究将采后妃子笑荔枝作为试验材料, 使用 OA 进行处理, 研究 *LcWRKY47* 基因的

表达模式。本研究鉴定的 *LcWRKY47* 基因定量结果表明, *LcWRKY47* 在荔枝果皮和果肉中的表达趋势一致, 在储藏后期 *LcWRKY47* 基因表达量与 CK 相比差异显著, 均显著高于 CK, 处于较高表达水平。将 *LcWRKY47* 连接到过表达 SK 载体, 对荔枝果实进行侵染实验, 使 *LcWRKY47* 基因得到过表达, 结果表明从外观上看, 过表达后的荔枝果实比 CK 衰老及褐变程度更低, 同时 *LcWRKY47* 基因的表达量显著高于 CK。综合以上结果推测, *LcWRKY47* 转录因子可能在荔枝衰老与褐变过程中起着一定的调节作用, 延缓了果实的衰老与褐变, 保持采后妃子笑荔枝的贮藏品质。关于 *LcWRKY47* 基因后续的功能验证还有待更深入的研究。

参考文献

- [1] WANG S F, CHENG Z M, LI Y, WANG Y, ZHEN L. Effect of postharvest treatments on physiology and quality of litchi and their economics[J]. *Acta Horticulturae*, 1996, 429: 503-508.
- [2] 卢美英, 郭蔚, 潘介春, 覃如日. 世界荔枝龙眼生产贸易分析及应对措施[J]. *世界农业*, 2004(8): 23-26.
LU M Y, GUO W, PAN J C, QIN R R. Analysis of litchi and longan production and trade in the world and corresponding measures[J]. *World Agriculture*, 2004(8): 23-26. (in Chinese)
- [3] ZHANG Z, HUBER D J, QU H X, YUN Z, WANG H, HUANG Z H, HAUNG H, JIANG Y M. Enzymatic browning and antioxidant activities in harvested litchi fruit as influenced by apple polyphenols[J]. *Food Chemistry*, 2015, 171(15): 191-199.
- [4] BRYANT P H. A model of postharvest moisture loss under air currents to reduce pericarp browning of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.)[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2012, 73: 8-13.
- [5] PANDEY N, JOSHI S K, SINGH C P, KUMAR S, RAJPUT S, KHANDAL R K. Enhancing shelf life of litchi (*Litchi chinensis*) fruit through integrated approach of surface coating and gamma irradiation[J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2013, 85: 197-203.
- [6] ZHENG X, TIAN S. Effect of oxalic acid on control of postharvest browning of litchi fruit[J]. *Food Chemistry*, 2006, 96(4): 519-523.
- [7] SHEN W, LI W, SHAO Y Z, ZENG J K. Proanthocyanidin delays litchi peel browning by inhibiting ethylene biosynthesis, respiratory metabolism, and phenol oxidase activities[J]. *Scientia Horticulturae*, 2023, 309(5): 111677.
- [8] LI W X, PANG S Y, LU Z G, JIN B. Function and mechanism of WRKY transcription factors in abiotic stress responses of plants[J]. *Plants (Basel)*, 2020, 9(11): 1515.
- [9] 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 & General Genetics: MGG*, 1994, 244(6): 563-571.
- [10] ZOU X H, DONG C, LIU H T, GAO Q H. Genome-wide characterization and expression analysis of WRKY family genes during development and resistance to *Colletotrichum fructicola* in cultivated strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch.)[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022, 21(6): 1658-1672.
- [11] JING Z, LIU Z. Genome-wide identification of WRKY transcription factors in kiwifruit (*Actinidia* spp.) and analysis of WRKY expression in responses to biotic and abiotic stresses[J]. *Genes & Genomics*, 2018, 40(4): 429-446.
- [12] PANDEY S P, SOMSSICH I E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity[J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(4): 1648-1655.
- [13] WANG Y H, ZHAO F X, ZHANG G, JIA S Z, YAN Z M. *FaWRKY11* transcription factor positively regulates resistance to *Botrytis cinerea* in strawberry fruit[J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 279: 109893.
- [14] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, SOMSSICH I E. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(5): 199-206.
- [15] GRUNEWALD W, DE SMET I T, LEWIS D R, LOFKE C, JANSEN L, GOEMINNE G, BOSSCHE R V, KARIMI M, RYBEL B D. Transcription factor *WRKY23* assists auxin distribution patterns during *Arabidopsis* root development through local control on flavonol biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(5): 1554-1559.
- [16] QIN Z, LV H, ZHU X, MENG C, QUAN T Y, WANG M C, XIA G M. Ectopic expression of a wheat WRKY transcription factor gene *TaWRKY71-1* results in hyponastic leaves in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63033.
- [17] WEI K F, CHEN J, CHEN Y F, WU L J, XIE D X. Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in maize[J]. *DNA Research: an International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 2012, 19(2): 153-164.
- [18] YU F F, HUAXIA Y F, LU W J, WU C G, CAO X C, GUO X Q. *GhWRKY15*, a member of the WRKY transcription factor family identified from cotton (*Gossypium hirsutum* L.),

- is involved in disease resistance and plant development[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1): 144.
- [19] GUO P R, LI Z H, HUANG P X, LI B S, FANG S, CHU J F, GUO H W. A tripartite amplification loop involving the transcription factor *WRKY75*, salicylic acid, and reactive oxygen species accelerates leaf senescence[J]. *The Plant Cell*, 2017, 29(11): 2854-2870.
- [20] CUI R, FENG Y N, YAO J L, SHI L, WANG S L, XU F S. The transcription factor *BnaA9.WRKY47* coordinates leaf senescence and nitrogen remobilization in *Brassica napus*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(18): 5606-5619.
- [21] ZENG J K, LI X, XU Q, CHEN J Y, YIN X R, FERGUSON I B, CHEN K S. *EjAP2-1*, an *AP2/ERF* gene, is a novel regulator of fruit lignification induced by chilling injury, via interaction with *EjMYB* transcription factors[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(9): 1325-1334.
- [22] SUN W, CAO Z Y, LI Y, ZHAO Y X, ZHANG H. A simple and effective method for protein subcellular localization using *Agrobacterium*-mediated transformation of onion epidermal cells[J]. *Biologia*, 2007, 62: 529-532.
- [23] GONG J, TIAN Z, QU X, MENG Q, WANG P. Illuminating the cells: transient transformation of citrus to study gene functions and organelle activities related to fruit quality[J]. *Horticulture research*, 2021, 8(1): 175-183.
- [24] 张凡, 尹俊龙, 郭瑛琪, 岳艳灵. *WRKY* 转录因子的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(1): 40-48.
- ZHANG F, YIN J L, GUO Y Q, YUE Y L. Research advances on *WRKY* transcription factors[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(1): 40-48. (in Chinese)
- [25] RUSHTON P J, SOMSSICH I E, RINGLER P, SHEN Q X. *WRKY* transcription factors[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(5): 247-258.
- [26] FAN Z Q, TAN X L, SHAN W, KUANG J F, LU W J, CHEN J Y. *BrWRKY65*, a *WRKY* transcription factor, is involved in regulating three leaf senescence-associated genes in Chinese flowering cabbage[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(6): 1228.
- [27] JI N N, LI Y F, WANG J, ZUO X X, LI M L, JIN P, ZHENG Y H. Interaction of *PpWRKY46* and *PpWRKY53* regulates energy metabolism in MeJA primed disease resistance of peach fruit[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 171: 157-168.
- [28] MARAK K A, MIR H, SINGH P, SIDDIQUI M W, RANJAN T, SINGH D R, SIDDIQUI M H, IRFAN M. Exogenous melatonin delays oxidative browning and improves postharvest quality of litchi fruits[J]. *Scientia Horticulturae*, 2023, 322: 112408.
- [29] ZHANG Z K, HU M J, YUN Z, WANG J B, FENG G, GAO Z Y, SHI X Q, JIANG Y M. Effect of tea seed oil treatment on browning of litchi fruit in relation to energy status and metabolism[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2017, 132: 97-104.
- [30] ZHU Y Y, YU J, BRECHT J K, JIANG T J, ZHENG X L. Pre-harvest application of oxalic acid increases quality and resistance to *Penicillium expansum* in kiwifruit during post-harvest storage[J]. *Food Chemistry*, 2016, 190: 537-543.
- [31] TIAN S, QIN G, LI B. Reactive oxygen species involved in regulating fruit senescence and fungal pathogenicity[J]. *Plant Molecular Biology*, 2013, 82(6): 593-602.
- [32] HE M Y, WU Y F, HONG M, YUN Z, LI T T, JIANG Y M. α -lipoic acid treatment alleviates postharvest pericarp browning of litchi fruit by regulating antioxidant ability and energy metabolism[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2021, 180: 111629.
- [33] CHEN J, LI F F, LI Y X, WANG Y S, WANG C Z, YUAN D B, JIANG Y M. Exogenous procyanidin treatment delays senescence of harvested banana fruit by enhancing antioxidant responses and in vivo procyanidin content[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, 158: 110999.
- [34] HUANG H, JING G X, GUO L F, ZHANG D D, YANG B, DUAN X W, ASHRAF M, JIANG Y M. Effect of oxalic acid on ripening attributes of banana fruit during storage[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2013, 84: 22-27.
- [35] ZHENG L C, LI C C, HUANG W G, HUANG X, ZHANG D, GUAN G H, XIAO Y N, WANG D J. Synthesis of high-impact biodegradable multiblock copolymers comprising of poly (butylene succinate) and poly (1,2-propylene succinate) with hexamethylene diisocyanate as chain extender[J]. *Polymers for Advanced Technologies*, 2011, 22(2): 279-285.