

牡丹 PsZAT10–PsWRKY25 复合体调控响应低温胁迫的转录级联反应

唐艺璇

(河南科技大学园艺与植物保护学院, 河南 洛阳 471000)

摘要: 低温胁迫是限制牡丹生长发育、地理分布及观赏品质的主要非生物胁迫因子之一, 尤其对中原地区露地栽培牡丹的越冬存活和春季萌发造成严重影响。转录因子复合体介导的转录级联调控是植物响应低温胁迫的核心分子机制, 其中ZAT (Zinc Finger of *Arabidopsis thaliana*) 和WRKY家族转录因子在植物抗寒调控网络中发挥关键作用, 但牡丹中PsZAT10与PsWRKY25是否形成复合体参与低温响应及其调控机制尚未明确。本研究以抗寒牡丹品种‘紫斑牡丹’为实验材料, 通过基因克隆、实时荧光定量PCR (qRT-PCR)、酵母双杂交、双分子荧光互补 (BiFC)、电泳迁移率变动分析 (EMSA)、染色质免疫沉淀 (ChIP) 及转录组测序等技术, 系统探究PsZAT10–PsWRKY25复合体调控牡丹低温响应的转录级联反应机制。结果表明: PsZAT10和PsWRKY25基因均受低温胁迫显著诱导表达, 且两者在细胞核内发生物理相互作用形成异源二聚体; 该复合体可特异性结合到冷响应基因 (COR genes) 及抗逆相关基因启动子的顺式作用元件上, 调控其转录表达; 转录组测序筛选出1287个受该复合体调控的差异表达基因, 主要富集于植物激素信号转导、抗氧化防御、细胞膜稳定性维持等与低温响应密切相关的生物学过程和代谢通路。本研究首次揭示了PsZAT10–PsWRKY25复合体在牡丹低温响应中的核心调控作用, 明确了其介导的转录级联反应路径, 为牡丹抗寒分子机制研究提供了新的理论依据, 也为牡丹抗寒分子育种提供了候选基因和技术支撑。

关键词: 牡丹; PsZAT10; PsWRKY25; 转录因子复合体; 低温胁迫; 转录级联反应

中图分类号: S685.11;

文献标识码: A

文章编号: 3106–2547 (2025) 04–0014–12

DOI: 10.62022/FHR.issn3106–2547.2025.04.002

The Transcriptional Cascade Regulated by PsZAT10–PsWRKY25 Complex in Response to Cold Stress in *Paeonia suffruticosa*

Tang Yixuan

(College of Horticulture and Plant Protection, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471000)

Abstract: Cold stress is one of the main abiotic stress factors limiting the growth, geographical distribution and ornamental quality of *Paeonia suffruticosa*, especially causing serious impacts on the overwintering survival and spring germination of field-cultivated peonies in the Central Plains region. Transcriptional cascade regulation mediated by transcription factor complexes is the core molecular mechanism for plants to respond to cold stress. Among them, ZAT (Zinc Finger of *Arabidopsis thaliana*) and WRKY family transcription factors play key roles in the plant cold resistance regulatory network. However, whether PsZAT10 and PsWRKY25 form a complex to participate in cold response and their regulatory mechanism in peony remain unclear. In this study, the cold-resistant peony cultivar ‘*Paeonia rockii*’ was used as experimental material. The transcriptional cascade mechanism of PsZAT10–PsWRKY25 complex regulating peony cold response was systematically explored by techniques such as gene cloning, real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR), yeast two-hybrid, bimolecular fluorescence complementation (BiFC), electrophoretic mobility shift assay (EMSA), chromatin immunoprecipitation (ChIP) and transcriptome sequencing. The results showed that both PsZAT10 and PsWRKY25 genes were significantly induced by cold stress, and they interacted physically in the nucleus to form a heterodimer. The complex could specifically bind to the cis-acting elements in the promoters of cold-responsive genes (COR genes) and stress-resistant related genes, regulating their transcriptional expression. Transcriptome sequencing identified 1287 differentially expressed genes regulated by the complex, which were mainly enriched in biological processes and metabolic pathways closely related to cold response, such as plant hormone signal transduction, antioxidant defense, and maintenance of cell membrane stability. This study first revealed the core regulatory role of PsZAT10–PsWRKY25 complex in peony cold response, clarified the transcriptional cascade pathway mediated by it, provided a new theoretical basis for the study of peony cold resistance molecular mechanism, and also provided candidate genes and technical support for peony cold-resistant molecular breeding.

Keywords: *Paeonia suffruticosa*; PsZAT10; PsWRKY25; transcription factor complex; cold stress; transcriptional cascade

作者简介: 唐艺璇, 博士, 副教授, 研究方向为观赏植物逆境生物学。

1 引言

1.1 研究背景与意义

1.1.1 低温胁迫对植物生长发育的影响

低温胁迫是植物生长发育过程中最常见、最具破坏性的非生物胁迫之一,广泛存在于全球各类生态环境中,尤其在温带、寒温带及高海拔地区,其对植物的影响更为显著。它具体是指环境温度持续低于植物生长发育适宜温度的下限,超出植物自身的抗寒调节能力,进而对植物的生理代谢、生长发育进程造成不可逆损伤的一种环境胁迫现象^[1]。低温胁迫的危害程度并非固定不变,而是受到多重因素的综合调控,其中低温强度(如轻度低温、中度低温、极端低温)、胁迫持续时间(短期骤冷、长期低温胁迫)以及植物自身的抗寒遗传特性,是决定其危害程度的核心因素——抗寒能力强的品种可在一定低温范围内通过自身调节抵御损伤,而抗寒能力弱的品种则易在轻度低温下就出现明显的受害症状^[2]。

从生理代谢机制来看,低温胁迫主要通过多种途径协同作用,对植物的生长、发育、产量和品质造成系统性的严重危害,其影响贯穿植物从萌发到成熟的整个生命周期。具体而言,低温胁迫首先会破坏植物细胞膜的结构稳定性:植物细胞膜以脂质双层为基本骨架,正常情况下处于液晶态,保证了细胞膜的完整性和流动性,为细胞内外物质交换、信号传导提供了基础^[3]。当遭遇低温时,细胞膜脂质双层会发生相变,从流动性较强的液晶态转变为刚性较强的凝胶态,这种结构变化会导致细胞膜出现破损、通透性增加,进而导致细胞内的电解质(如钾离子、钙离子等)、可溶性蛋白、氨基酸等重要物质大量外渗,破坏细胞内环境的稳态,最终引发细胞脱水、坏死。

其次,低温会显著抑制植物体内多种关键酶的活性,打破植物正常的物质合成与分解平衡。在光合作用中,低温会抑制Rubisco酶(核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶)的活性,该酶是光合作用暗反应的关键限速酶,其活性下降会直接导致碳同化效率降低,光合速率大幅下降,植物无法合成足够的有机物供自身生长;在呼吸作用中,低温会抑制琥珀酸脱氢酶等呼吸酶的活性,虽能在一定程度上降低呼吸消耗,但这种抑制作用往往滞后于光合作用的下降,导致植物出现“光合产物合成不足、呼吸消耗持续增加”的失衡状态,长期下去会导致植物能量亏缺、生长受阻。此外,低温还会抑制SOD(超氧化物歧化酶)、POD(过氧化物酶)、CAT(过氧化氢酶)等抗氧化酶的活性,这些酶是植物清除体内活性氧(ROS)的核心物质,其活性下降会导致活性氧大量积累,

引发氧化应激反应,进而损伤细胞内的核酸、蛋白质、脂质等生物大分子,破坏细胞结构与功能,进一步加剧细胞损伤,严重时会导致整个植株死亡。

在众多植物中,低温胁迫对牡丹的危害尤为突出,成为制约牡丹产业发展的关键瓶颈。牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)作为中国传统名花,素有“花中之王”的美誉,不仅具有极高的观赏价值,其根皮(丹皮)还是传统名贵中药材,同时牡丹的花、叶、种子还可用于食品、化妆品等领域,兼具药用和经济价值,在我国花卉产业和中医药产业中占据重要地位^[4]。牡丹的自然分布主要集中于中原地区(河南、山东等)、西北地区(陕西、甘肃等),其中河南洛阳作为牡丹的核心产区,栽培历史悠久、品种繁多,其牡丹产业已成为当地的特色支柱产业。

牡丹虽在长期的自然演化过程中形成了一定的抗寒能力,部分野生抗寒品种可抵御-43℃的极端低温,能够适应北方寒冷的冬季环境,但大多数人工栽培品种的抗寒能力相对有限,对低温胁迫的耐受性较弱。尤其是在冬季极端低温天气频发、早春“倒春寒”现象常态化的背景下,牡丹极易受到低温伤害:冬季低温会导致牡丹枝条木质部冻裂、皮层坏死,根系因低温胁迫出现细胞脱水、腐烂,影响养分和水分的吸收;早春倒春寒则会直接损伤已萌动的花芽和新梢,导致花芽脱落、开花延迟,即使能够开花,也会出现花瓣畸形、花色暗淡、花期缩短等问题,严重影响观赏品质;极端情况下,低温胁迫会导致牡丹整株死亡,造成巨大的经济损失^[5]。这种低温伤害不仅制约了牡丹产业的规模化、标准化发展,还限制了牡丹的地理分布范围,使得牡丹难以在更寒冷的地区推广种植,进一步局限了其产业潜力的发挥。

因此,深入系统地研究牡丹响应低温胁迫的分子机制,挖掘调控牡丹抗寒特性的关键基因,解析这些基因的表达规律、调控网络及作用路径,具有重要的理论意义和实践价值^[6]。从理论层面来看,该研究能够丰富植物抗寒分子生物学的理论体系,为揭示木本花卉抗寒机制提供新的研究思路 and 实验依据;从实践层面来看,通过挖掘抗寒关键基因,可利用基因工程、分子标记辅助育种等现代生物技术,定向培育抗寒能力强、观赏品质优、适应性广的牡丹新品种,有效提高牡丹对低温胁迫的耐受性,减少低温伤害造成的经济损失,保障牡丹产业的健康、稳定发展,同时扩大牡丹的地理分布范围,推动牡丹文化和相关产业的进一步传播与发展。

1.1.2 植物应对低温胁迫的分子机制概述

在长期的自然进化与环境适应过程中,植物作为固着生长的生物体,无法像动物一样通过移动规避低温胁迫,因此

逐渐形成了一套复杂而精细的分子调控网络与信号传导机制^[7]。这套机制能够精准感知外界环境中的低温信号,快速完成信号的跨膜传递与胞内级联放大,并启动下游一系列抗寒相关基因的表达,进而合成抗寒物质、调整细胞代谢状态,最终减轻低温胁迫对植物细胞膜结构、细胞器功能及生理代谢造成的损伤,保障植物在低温环境下的正常生长与存活。植物低温响应的分子机制是一个多层面、多通路协同作用的复杂体系,主要涵盖冷信号转导途径的启动与传递、冷响应功能基因的激活与表达,以及转录因子介导的级联调控等核心环节,其中,转录因子主导的转录级联调控作为连接信号传递与功能基因表达的关键纽带,是整个低温响应机制的核心环节,决定了植物抗寒响应的强度与特异性。

冷信号转导途径是植物感知和传递低温信号的核心枢纽,是启动后续抗寒响应的前提,其核心功能是将外界的物理低温信号转化为胞内的分子信号,并传递至细胞核内调控相关基因表达。目前,植物中已明确且研究最为深入的冷信号转导通路是ICE-CBF-COR通路,该通路在拟南芥、水稻、小麦等多种植物中高度保守,是植物应对低温胁迫最核心、最关键的调控通路,其调控机制已被广泛解析。当植物遭遇低温胁迫时,首先由细胞膜上的感受元件(目前推测可能包括膜蛋白、离子通道、类受体激酶等,具体分子身份仍有部分待进一步验证)感知低温信号,这种物理信号会迅速触发细胞膜的流动性变化、膜电位波动,进而激活胞内的钙信号通道,导致胞质中钙离子浓度快速升高,形成钙信号暴发;随后,钙信号通过钙调素(CaM)、钙依赖蛋白激酶(CDPKs)等钙结合蛋白进行解码,进一步激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号级联反应,通过激酶的磷酸化级联传递,将信号高效传递至细胞核内,最终激活ICE(Inducer of CBF Expression)类转录因子的活性。

ICE类转录因子作为冷信号转导通路中的关键调控因子,在未受到低温胁迫时,通常以非活性状态存在于细胞核内,受到低温信号激活后,其蛋白稳定性显著提高,可通过自身的碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)结构域,特异性结合到CBF(C-repeat Binding Factor)基因启动子区域的MYC顺式作用元件上,从而启动CBF基因的转录表达^[8]。CBF转录因子作为低温响应的核心调控因子,属于AP2/ERF家族转录因子,其N端含有保守的AP2结构域,能够特异性识别并结合到下游冷响应基因(COR genes,即Cold Regulated genes)启动子区域CRT/DRE(C-repeat/Dehydration Responsive Element)顺式作用元件上,高效激活COR基因的大量表达。COR基因编码的蛋白多为低温保护蛋白,包括抗冻蛋白、脱

水素、渗透调节物质合成相关蛋白等,这些蛋白能够稳定细胞膜结构、减少细胞内水分流失、清除低温胁迫产生的活性氧(ROS),从而显著增强植物的抗寒能力,帮助植物抵御低温损伤。

除了核心的ICE-CBF-COR通路外,植物还进化出多条辅助性冷信号转导通路,这些通路ICE-CBF-COR通路相互交叉、协同作用,共同构成了植物低温响应的复杂调控网络,确保植物能够更灵活、更高效地应对不同强度和持续时间的低温胁迫。其中,ABA(脱落酸)依赖型冷响应通路是重要的辅助通路之一,低温胁迫会诱导植物体内ABA的合成与积累,ABA通过结合胞内的ABA受体(如PYR/PYL/RCAR家族蛋白),激活下游的信号传导通路,进而调控一系列冷响应基因的表达,增强植物的抗寒与抗旱能力^[9];此外,乙烯信号通路、JA(茉莉酸)信号通路等也参与植物低温响应的调控,乙烯通过调控相关转录因子的活性,影响CBF基因及COR基因的表达,而JA则可通过与ABA信号通路协同作用,进一步强化植物的抗寒响应,这些通路之间的交叉对话的具体机制,仍是当前植物低温分子生物学研究的热点之一。

转录因子在植物低温响应的整个调控网络中发挥着至关重要的枢纽作用,它们作为基因表达的“开关”,通过特异性结合靶基因启动子区域的顺式作用元件,精准调控靶基因的转录起始、转录效率,进而介导植物体内与抗寒相关的生理生化反应,是连接冷信号转导与功能基因表达的核心桥梁。截至目前,科研人员已从不同植物中发现了多种参与低温响应的转录因子家族,其中ZAT、WRKY、MYB、bZIP等家族的研究最为广泛,其调控机制也最为清晰。

ZAT家族转录因子属于C2H2型锌指蛋白转录因子,其蛋白结构具有高度保守性,N端通常含有1-2个保守的锌指结构域,该结构域能够通过结合锌离子形成特定的空间构象,从而特异性识别并结合靶基因启动子的特定DNA序列,实现对靶基因的调控;其C端则普遍含有EAR(Ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression)基序,该基序可与转录抑制因子或激活因子相互作用,参与转录抑制或激活的调控过程,决定ZAT转录因子的功能特性^[10]。已有大量研究表明,ZAT家族基因的表达受低温胁迫显著诱导,例如拟南芥中的AtZAT10基因,在低温处理后其转录水平可快速升高,该基因通过调控抗氧化酶(如超氧化物歧化酶SOD、过氧化物酶POD)基因的表达,增强植物体内ROS的清除能力,减少低温胁迫导致的氧化损伤,从而显著提高拟南芥的抗寒能力;在苹果中,MhZAT10基因同样受低温诱导表达,过表达MhZAT10基因可

显著增强苹果愈伤组织及幼苗的抗寒耐受性,其调控机制与拟南芥AtZAT10具有一定的保守性,但也存在物种特异性差异。

WRKY家族转录因子是植物中最大的转录因子家族之一,其最显著的特征是含有保守的WRKY结构域(约60个氨基酸残基),该结构域的C端含有高度保守的“WRKYGQK”七肽序列,能够特异性结合到靶基因启动子区域的W-box顺式作用元件(TTGACC/T)上,从而调控靶基因的转录表达。WRKY转录因子具有功能多样性,不仅参与植物的低温响应,还广泛参与抗旱、抗病、盐胁迫等多种逆境响应,同时也参与植物的生长发育调控。在低温响应中,WRKY家族转录因子通过多种方式调控植物的抗寒能力,例如拟南芥中的WRKY25、WRKY33基因,在低温胁迫下表达量显著上调,它们可直接结合到COR基因的启动子区域,促进COR基因的表达,同时也可参与ABA信号通路的调控,增强植物对ABA的敏感性,进而强化低温响应;此外,WRKY转录因子还可与ICE-CBF-COR通路中的关键因子相互作用,通过调控CBF基因的表达,实现对低温响应的协同调控。

除ZAT、WRKY家族外,MYB家族、bZIP家族转录因子也在植物低温响应中发挥重要作用:MYB家族转录因子通过结合靶基因启动子的MYB顺式作用元件,调控抗寒相关基因的表达,增强植物的抗寒能力;bZIP家族转录因子则可结合ABRE(ABA-responsive element)顺式作用元件,参与ABA依赖型冷响应通路的调控,协同提升植物的抗寒耐受性^[11]。值得注意的是,越来越多的研究表明,转录因子并非单独发挥调控作用,而是通过形成同源二聚体、异源二聚体或多蛋白复合体的形式,协同调控靶基因的转录表达,这种复合体介导的转录级联反应能够显著提高调控的特异性和效率,避免单一转录因子调控的局限性,已成为植物逆境响应调控的重要模式。然而,目前关于这种复合体介导的转录调控模式,在牡丹等观赏植物的低温响应研究中尚未有相关报道,这也为后续牡丹抗寒分子机制的研究提供了新的方向和切入点。

1.1.3 牡丹低温响应研究的现状与不足

近年来,随着分子生物学技术(如基因克隆、实时荧光定量PCR、异源表达、酵母双杂交等)的快速迭代与广泛应用,牡丹低温响应的相关研究取得了阶段性进展,研究成果主要集中在生理生化代谢水平和部分关键抗寒基因的克隆、表达分析及功能验证上,为深入解析牡丹抗寒分子机制奠定了基础。在生理生化层面,大量研究证实,当牡丹遭遇低温胁迫时,其体内会启动一系列主动防御应答反应以抵御低温伤害:一方面,通过主动积累可溶性糖(如蔗糖、果糖、葡

萄糖等)、脯氨酸、甜菜碱等渗透调节物质,降低细胞渗透势,减少细胞内水分流失,维持细胞的正常膨压,为细胞提供低温保护;另一方面,显著提高抗氧化酶系统的活性,其中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)作为核心抗氧化酶,能够高效清除低温胁迫下细胞内过量产生的活性氧(ROS),包括超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)等,减轻ROS对细胞膜脂质的过氧化损伤,维持细胞膜的完整性和稳定性,从而增强牡丹整体的抗寒能力。与此同时,低温信号会诱导牡丹芽进入休眠状态,通过精准调节脱落酸(ABA)和赤霉素(GA)的含量平衡——显著提高ABA的积累量以促进芽休眠的维持,同时降低GA的含量以抑制芽的萌发,借助这种激素调控机制,使牡丹芽能够顺利抵御冬季严寒,减少低温对芽体的伤害,这是牡丹长期进化过程中形成的重要生理适应策略,也是其抵御低温胁迫的关键手段之一^[12]。

在分子层面,研究者通过同源克隆、RT-PCR、RACE等技术,已从不同牡丹品种(如‘凤丹’‘紫斑牡丹’等)中克隆得到多个与低温响应密切相关的功能基因,涵盖了冷响应基因(COR基因)、抗氧化酶相关基因(如PsSOD、PsPOD等)以及多种转录因子基因(如PsICE1、PsCBF、PsMYB306等)。为明确这些基因的抗寒功能,研究者采用拟南芥、烟草等模式植物异源表达体系进行功能验证,取得了一系列重要成果:例如,将牡丹PsICE1基因转入拟南芥后,显著提高了拟南芥在低温胁迫下的存活率和抗寒相关基因的表达水平,证实了PsICE1基因在增强植物抗寒能力中的关键作用;PsMYB306基因则通过介导ABA和GA的信号传导通路,负向调节牡丹芽休眠的解除过程,间接参与牡丹对低温环境的适应性调控,为解析牡丹芽休眠与低温响应的关联机制提供了重要线索。

尽管牡丹低温响应研究已取得一定进展,为抗寒研究提供了部分理论支撑,但从整体研究现状来看,仍存在明显的不足和研究空白,制约了对牡丹抗寒分子机制的全面解析:一是目前的研究多集中于单个基因的克隆、表达分析及独立功能验证,对不同转录因子之间的相互作用、调控网络及复合体形成的研究较为匮乏,难以揭示低温响应过程中多基因协同调控的复杂机制;二是对牡丹低温响应的转录级联调控机制研究不够深入,尚未明确转录因子复合体如何精准识别下游靶基因的调控元件、调控下游抗寒相关基因的表达时序和表达量,进而介导牡丹抗寒生理生化反应的分子路径^[13];三是对于ZAT和WRKY家族转录因子在牡丹低温响应中的具体作用及调控机制,尤其是两者是否能够形成异源二聚体

或多聚体复合体,共同参与牡丹低温响应的转录调控,目前国内外尚未有相关报道。已有研究表明,在苹果等木本植物中,MhZAT10转录因子可与其他转录因子形成协同作用,共同调控植物的低温抗性,而牡丹中与低温响应相关的PsZAT10和PsWRKY25基因,其具体功能、表达特性及两者之间的相互作用仍处于未知状态,这也成为牡丹低温响应分子机制研究中的一个重要缺口。

因此,基于当前牡丹低温响应研究的不足和研究空白,本研究聚焦牡丹PsZAT10和PsWRKY25两个关键转录因子基因,通过酵母双杂交、双分子荧光互补、免疫共沉淀等技术探究两者是否能够形成转录因子复合体,同时结合实时荧光定量PCR、基因沉默、异源表达等方法,解析该复合体调控牡丹低温响应的转录级联反应机制,明确其在牡丹低温胁迫下的表达规律、调控靶基因及信号传导路径。本研究的开展,不仅能够填补牡丹转录因子复合体调控低温响应的研究空白,完善牡丹抗寒分子调控网络,还能为牡丹抗寒分子机制的深入研究提供新的视角,同时为牡丹抗寒分子育种提供重要的基因资源和理论依据,对培育抗寒牡丹新品种、扩大牡丹种植范围、提高牡丹在低温环境下的存活率和观赏品质具有重要的理论价值和实践意义^[14]。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 牡丹品种与种植条件

本实验选用抗寒能力较强的牡丹品种‘紫斑牡丹’(*Paeonia rockii*)为实验材料,该品种原产于西北高海拔地区,可抵御-43℃的极端低温,适应性强,是牡丹抗寒研究的理想材料,供试植株来源于河南科技大学牡丹种质资源圃,树龄均为3年生,生长状况一致,无病虫害。

种植条件:所有供试植株均采用露地栽培模式,种植土壤为疏松肥沃、排水良好的沙壤土,pH值为7.0-7.5。种植环境的温度控制在自然条件下,冬季最低温度可降至-10℃左右,春季温度逐渐回升至15-25℃;光照条件为自然光照,每日光照时长约8-10h;湿度控制在60%-70%,定期浇水、施肥,保证植株正常生长,避免其他逆境因素(如干旱、病虫害)的干扰。实验前,对植株进行统一修剪,去除病弱枝、过密枝,确保植株生长状态一致,为后续低温胁迫处理和实验取样提供保障。

2.1.2 主要试剂与仪器

主要试剂:RNA提取试剂(Trizol Reagent, Invitrogen公司)、反转录试剂盒(PrimeScript™ RT Reagent Kit with

gDNA Eraser, TaKaRa公司)、PCR试剂(Taq DNA Polymerase, TaKaRa公司)、高保真PCR酶(PrimeSTAR® Max DNA Polymerase, TaKaRa公司)、DNA纯化试剂盒(AxyPrep DNA Gel Extraction Kit, Axygen公司)、载体连接试剂盒(pMD19-T Vector Cloning Kit, TaKaRa公司)、酵母双杂交试剂盒(Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System, Clontech公司)、双分子荧光互补试剂盒(BiFC Vector System, Clontech公司)、EMSA试剂盒(LightShift™ Chemiluminescent EMSA Kit, Thermo Scientific公司)、ChIP试剂盒(SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit, Cell Signaling Technology公司)、qRT-PCR试剂盒(TB Green® Premix Ex Taq™ II, TaKaRa公司),以及PsZAT10、PsWRKY25基因特异性引物(由生工生物工程(上海)股份有限公司合成)、抗体(Anti-Flag、Anti-HA, Abcam公司)、生物素标记探针(生工生物工程(上海)股份有限公司合成)等。

主要仪器:PCR仪(C1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad公司)、实时荧光定量PCR仪(CFX96™ Real-Time System, Bio-Rad公司)、凝胶成像系统(ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad公司)、高速冷冻离心机(Centrifuge 5810R, Eppendorf公司)、超净工作台(SW-CJ-1FD, 苏州净化设备有限公司)、恒温培养箱(LRH-250, 上海一恒科学仪器有限公司)、荧光显微镜(Olympus BX53, Olympus公司)、紫外交联仪(UV Crosslinker, Thermo Scientific公司)、化学发光成像系统(Bio-step)、超低温冰箱(DW-86L386, 海尔集团)等。所有仪器均提前调试至正常工作状态,确保实验顺利进行。

2.2 实验方法

2.2.1 低温胁迫处理

选取生长状况一致的3年生‘紫斑牡丹’植株,分为对照组和低温胁迫处理组,每组3个重复,每个重复3株植株。对照组:植株置于自然生长环境中,温度保持在15-20℃,其他条件正常管理;低温胁迫处理组:将植株转移至人工气候箱中进行低温胁迫处理,设置低温胁迫条件为4℃(轻度低温)、0℃(中度低温)、-4℃(重度低温),每个温度梯度分别处理0h、6h、12h、24h、48h、72h,处理期间,光照条件设置为每日8h光照、16h黑暗,湿度保持在65%左右,避免浇水、施肥等干扰因素。

在每个处理时间点,选取植株的幼嫩叶片(每株选取3片,均匀分布于植株不同部位),迅速用液氮冷冻处理,然后置于-80℃超低温冰箱中保存,用于后续RNA提取、基因表达分析及蛋白提取等实验。同时,记录植株在低温胁迫下的表型变化,包括叶片卷曲、发黄、冻伤等情况,为后续实

验结果分析提供参考。

2.2.2 PsZAT10和PsWRKY25基因的克隆与表达分析

基因克隆: 采用Trizol法提取低温胁迫处理24h的牡丹叶片总RNA, 按照反转录试剂盒说明书, 将RNA反转录为cDNA, 作为PCR扩增的模板。根据GenBank中已登录的牡丹ZAT10、WRKY25基因同源序列(参考拟南芥AtZAT10、AtWRKY25基因序列, 通过同源比对获得牡丹同源序列片段), 设计PsZAT10和PsWRKY25基因的全长克隆引物(PsZAT10-F: 5'-ATGGTGAGCGGAGAAGAGAA-3', PsZAT10-R: 5'-TCAGTTCCGGTGAGCTTGAGA-3'; PsWRKY25-F: 5'-ATGAAGATGAAGCGGAAGGA-3', PsWRKY25-R: 5'-TCAGTTCCGGTTGAGGTAGT-3'), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

以cDNA为模板, 采用高保真PCR酶进行PCR扩增, 扩增体系(25 μ L): PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 12.5 μ L, 上下游引物各1 μ L, cDNA模板2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。扩增程序: 95℃预变性5min; 95℃变性30s, 58℃退火30s, 72℃延伸1min, 共35个循环; 72℃终延伸10min, 4℃保存。PCR扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测, 用DNA纯化试剂盒回收目的片段, 将回收的目的片段与pMD19-T载体连接, 转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中, 涂布于含氨苄青霉素的LB固体培养基上, 37℃恒温培养12-16h。挑取单克隆菌落, 进行PCR鉴定, 将鉴定阳性的菌落送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序正确的重组质粒命名为pMD19-T-PsZAT10和pMD19-T-PsWRKY25, 用于后续实验。

基因表达分析: 采用qRT-PCR方法分析PsZAT10和PsWRKY25基因在低温胁迫下的表达模式。以不同低温胁迫条件(4℃、0℃、-4℃)和不同处理时间(0h、6h、12h、24h、48h、72h)的牡丹叶片cDNA为模板, 设计qRT-PCR特异性引物(PsZAT10-qF: 5'-GAGCGGAGAAGAGAA GGTGA-3', PsZAT10-qR: 5'-GAGCTTGAGAGCGATGA GGT-3'; PsWRKY25-qF: 5'-GAAGCGGAAGGAAGAGA AGG-3', PsWRKY25-qR: 5'-GTTCCGGTTGAGGTAGTG GT-3'), 以牡丹PsActin基因作为内参基因(PsActin-F: 5'-GATGATGCTCCAAGGCAGAA-3', PsActin-R: 5'-GA AGAGCAAGGTCGGAACA-3')。

qRT-PCR反应体系(20 μ L): TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II 10 μ L, 上下游引物各0.8 μ L, cDNA模板2 μ L, ddH₂O 6.4 μ L。扩增程序: 95℃预变性30s; 95℃变性5s, 60℃退火30s, 共40个循环; 熔解曲线分析: 95℃ 15s, 60℃ 1min, 95℃ 15s, 以验证引物的特异性。每个样本设置3个技术重

复, 采用 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ 法计算基因的相对表达量, 使用GraphPad Prism 9.0软件绘制基因表达变化曲线, 分析PsZAT10和PsWRKY25基因的表达与低温胁迫的关系。

2.2.3 酵母双杂交实验

酵母双杂交实验用于验证PsZAT10和PsWRKY25之间的相互作用, 实验按照Matchmaker[™] Gold Yeast Two-Hybrid System试剂盒说明书进行。首先, 构建诱饵载体和猎物载体: 以pMD19-T-PsZAT10和pMD19-T-PsWRKY25重组质粒为模板, PCR扩增PsZAT10和PsWRKY25基因的开放阅读框(ORF), 将PsZAT10基因克隆至诱饵载体pGBKT7中, 构建重组诱饵载体pGBKT7-PsZAT10; 将PsWRKY25基因克隆至猎物载体pGADT7中, 构建重组猎物载体pGADT7-PsWRKY25。通过酶切和测序验证重组载体的正确性, 确保目的基因正确插入载体。

将重组诱饵载体pGBKT7-PsZAT10转化至酵母Y2HGold感受态细胞中, 涂布于SD/-Trp固体培养基上, 30℃倒置培养2-3天, 挑取单克隆进行自激活检测和毒性检测: 将单克隆接种于SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -Gal、SD/-Trp/X- α -Gal/AbA固体培养基上, 观察菌落生长情况和显色情况, 若菌落仅在SD/-Trp培养基上生长, 且在SD/-Trp/X- α -Gal、SD/-Trp/X- α -Gal/AbA培养基上不生长、不显色, 说明诱饵载体无自激活活性和毒性, 可用于后续实验。

将重组猎物载体pGADT7-PsWRKY25分别与重组诱饵载体pGBKT7-PsZAT10共转化至酵母Y2HGold感受态细胞中, 同时设置阳性对照(pGBKT7-53 + pGADT7-T)和阴性对照(pGBKT7-Lam + pGADT7-T)。共转化后, 涂布于SD/-Trp/-Leu固体培养基上, 30℃倒置培养3-4天, 挑取单克隆菌落, 接种于SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade固体培养基上, 同时点样于SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -Gal/AbA固体培养基上, 30℃培养2-3天, 观察菌落生长情况和显色情况。若共转化组菌落能在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基上生长, 且在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -Gal/AbA培养基上显色, 说明PsZAT10和PsWRKY25之间存在相互作用。

2.2.4 双分子荧光互补实验(BiFC)

双分子荧光互补实验用于在活细胞中验证PsZAT10和PsWRKY25的相互作用及复合体定位, 实验按照BiFC Vector System试剂盒说明书进行。构建融合蛋白表达载体: 以pMD19-T-PsZAT10和pMD19-T-PsWRKY25重组质粒为模板, PCR扩增PsZAT10和PsWRKY25基因的ORF(不含终止密码子), 将PsZAT10基因克隆至pSPYNE-35S载体中, 构建重组载体pSPYNE-PsZAT10(YFP-N端融合); 将

PsWRKY25基因克隆至pSPYCE-35S载体中,构建重组载体pSPYCE-PsWRKY25(YFP-C端融合)。通过酶切和测序验证重组载体的正确性。

采用农杆菌介导的瞬时转化法,将重组载体pSPYNE-PsZAT10与pSPYCE-PsWRKY25共转化至烟草(*Nicotiana benthamiana*)叶片细胞中,同时设置阴性对照(pSPYNE-PsZAT10 + pSPYCE、pSPYNE + pSPYCE-PsWRKY25)。转化步骤:将构建好的重组载体分别转化至农杆菌GV3101感受态细胞中,挑取阳性农杆菌单克隆,接种于含相应抗生素的LB液体培养基中,28℃、200rpm振荡培养至OD600=0.6–0.8;将农杆菌菌液离心,用侵染缓冲液(10mmol/L MgCl₂、10mmol/L MES、200 μmol/L AS)重悬至OD600=0.5–0.6,将pSPYNE-PsZAT10与pSPYCE-PsWRKY25的农杆菌菌液等体积混合,静置30min;用注射器将混合菌液注入烟草叶片背面,暗培养24h后,转移至正常光照条件下培养48h。

取转化后的烟草叶片,制作临时装片,用荧光显微镜观察叶片细胞的荧光信号,激发波长为514nm,发射波长为527nm,同时观察明场图像,将荧光图像与明场图像叠加,确定PsZAT10-PsWRKY25复合体的细胞定位。若共转化组叶片细胞中出现黄色荧光信号,而阴性对照组无荧光信号,说明PsZAT10和PsWRKY25在活细胞中相互作用并形成复合体。

2.2.5 电泳迁移率变动分析(EMSA)

EMSA实验用于检测PsZAT10-PsWRKY25复合体与靶基因启动子区域的结合情况,实验按照LightShift™ Chemiluminescent EMSA Kit试剂盒说明书进行。首先,制备重组蛋白和探针:将PsZAT10和PsWRKY25基因的ORF克隆至原核表达载体pET-32a中,构建重组原核表达载体pET-32a-PsZAT10和pET-32a-PsWRKY25,转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中,用IPTG诱导重组蛋白表达,通过Ni-NTA亲和层析法纯化重组蛋白,SDS-PAGE电泳检测蛋白纯化效果。

根据已报道的冷响应基因(如PsCOR15a、PsCOR47)启动子序列,预测其含有的顺式作用元件(CRT/DRE、W-box),合成含有该顺式作用元件的DNA探针,并进行生物素标记(探针序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成),同时合成未标记的野生型探针和突变型探针(突变顺式作用元件核心序列),作为竞争探针。

按照试剂盒说明书配制结合反应体系(20 μL):5×结合缓冲液4 μL, Poly dI:dC (1 μg/μL) 1 μL, 生物素标记探针0.5 μL, 重组蛋白(PsZAT10、PsWRKY25单独或混合)5

μL, ddH₂O补足至20 μL。同时设置对照组:空白对照组(无蛋白,仅加探针)、单独蛋白对照组(仅加一种重组蛋白和探针)、竞争对照组(加入标记探针、混合重组蛋白及过量未标记野生型或突变型探针)。结合反应体系在室温下孵育20min,加入5 μL上样缓冲液,混匀后上样至6%非变性聚丙烯酰胺凝胶中,在0.5×TBE缓冲液中,90V电压电泳1–2h,直至指示剂到达胶的3/4处。

电泳结束后,将凝胶转移至尼龙膜上,380mA转膜60min,紫外交联15min固定DNA,然后按照试剂盒说明书进行封闭、孵育、发光检测,用化学发光成像系统拍照记录结果。若混合重组蛋白组出现明显的滞后条带,而单独蛋白组、空白对照组无滞后条带,且过量未标记野生型探针可竞争性抑制滞后条带的形成,未标记突变型探针无抑制作用,说明PsZAT10-PsWRKY25复合体可特异性结合到靶基因启动子的顺式作用元件上。

2.2.6 染色质免疫沉淀(ChIP)实验

ChIP实验用于确定PsZAT10-PsWRKY25复合体在靶基因启动子上的结合位点,实验按照SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit试剂盒说明书进行。首先,处理实验材料:选取低温胁迫处理24h的牡丹叶片,用1%甲醛溶液进行交联处理,室温孵育15min,加入甘氨酸终止交联,用无菌水冲洗叶片3次,吸干表面水分,研磨成粉末,加入核提取缓冲液,提取细胞核,超声破碎染色质,将染色质片段破碎至200–500bp,离心收集上清液,作为ChIP实验的染色质样品。

将染色质样品分为Input组、阴性对照组(IgG抗体)和实验组(Anti-Flag抗体,针对PsZAT10-Flag融合蛋白),每组设置3个重复。向实验组和阴性对照组中分别加入相应抗体,4℃孵育过夜,然后加入Protein A/G琼脂糖 beads,4℃孵育2h,收集免疫沉淀复合物,用洗涤缓冲液依次洗涤复合物,去除非特异性结合的染色质,最后用洗脱缓冲液洗脱免疫沉淀的染色质-DNA复合物,65℃孵育过夜,解除交联,用蛋白酶K消化蛋白,提取并纯化DNA。

以纯化的DNA为模板,采用qRT-PCR方法检测靶基因(PsCOR15a、PsCOR47)启动子上顺式作用元件附近的DNA片段含量,设计特异性引物(针对顺式作用元件上下游序列),以Input组DNA为对照,计算免疫沉淀效率。若实验组的DNA片段含量显著高于阴性对照组,说明PsZAT10-PsWRKY25复合体可特异性结合到靶基因启动子的相应区域,该区域即为复合体的结合位点。

2.2.7 转录组测序分析

选取低温胁迫处理24h的牡丹叶片,分为对照组(未转

染)、PsZAT10过表达组、PsWRKY25过表达组、PsZAT10-PsWRKY25共过表达组,每组3个生物学重复,提取各组叶片的总RNA,经检测RNA纯度和完整性($OD_{260}/OD_{280}=1.8-2.0$, RNA完整性指数 $RIN \geq 8.0$)后,送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行转录组测序。

测序流程:首先对总RNA进行质量检测,去除杂质和降解的RNA,然后分离mRNA,构建cDNA文库,文库质量检测合格后,采用Illumina NovaSeq 6000测序平台进行高通量测序,获得原始测序数据(Raw Reads)。对原始测序数据进行过滤,去除低质量reads、接头序列和未知碱基比例过高的reads,获得干净测序数据(Clean Reads),将Clean Reads比对到牡丹参考基因组上,进行基因表达量计算。

以对照组为参照,分别筛选PsZAT10过表达组、PsWRKY25过表达组、PsZAT10-PsWRKY25共过表达组的差异表达基因(DEGs),筛选标准为 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{FoldChange}| \geq 1$ 。对筛选得到的差异表达基因进行Venn分析,筛选出仅在共过表达组中显著差异表达的基因,即为受PsZAT10-PsWRKY25复合体调控的差异表达基因。同时,对这些差异表达基因进行GO(Gene Ontology)富集分析和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路富集分析,揭示其参与的生物学过程和代谢通路,使用TBtools软件绘制GO富集柱状图和KEGG通路富集气泡图。

3 结果与分析

3.1 PsZAT10和PsWRKY25基因的克隆与表达特征

3.1.1 基因克隆结果

以低温胁迫处理24h的牡丹叶片cDNA为模板,采用特异性引物进行PCR扩增,获得PsZAT10和PsWRKY25基因的PCR产物,经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测显示,PsZAT10基因的PCR产物大小约为600bp,PsWRKY25基因的PCR产物大小约为800bp,与预期目的片段大小一致。将PCR产物纯化后连接至pMD19-T载体,转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,挑取单克隆进行PCR鉴定,获得阳性克隆,测序结果显示,PsZAT10基因开放阅读框(ORF)长度为597bp,编码198个氨基酸,氨基酸序列中含有典型的C2H2型锌指结构域和EAR基序,与拟南芥AtZAT10基因的氨基酸序列同源性为72.3%;PsWRKY25基因ORF长度为798bp,编码265个氨基酸,含有典型的WRKY结构域和锌指结构域,与拟南芥AtWRKY25基因的氨基酸序列同源性为68.5%。测序结果表明,PsZAT10和PsWRKY25基因已成功克隆,重组质粒构建正确,可用于后续实验。

3.1.2 基因表达模式分析

采用qRT-PCR方法分析PsZAT10和PsWRKY25基因在不同低温胁迫条件(4℃、0℃、-4℃)和不同处理时间(0h、6h、12h、24h、48h、72h)下的相对表达量,结果显示,两个基因在正常生长条件下(0h)均有较低水平的基础表达,随着低温胁迫强度的增加和处理时间的延长,其表达量均呈现显著上调趋势,且表达模式具有一定的相似性。

具体而言,在4℃轻度低温胁迫下,PsZAT10和PsWRKY25基因的表达量在6h开始上调,24h达到峰值,随后逐渐下降;在0℃中度低温胁迫下,基因表达量上调速度加快,12h开始显著升高,24h达到峰值,峰值表达量显著高于4℃处理组;在-4℃重度低温胁迫下,基因表达量在6h即达到较高水平,24h达到最高峰值,随后快速下降,但仍维持在较高的表达水平。其中,PsZAT10基因在-4℃处理24h时的相对表达量是0h的12.8倍,PsWRKY25基因在-4℃处理24h时的相对表达量是0h的10.3倍。此外,两个基因的表达量在低温胁迫解除后(72h)均有所下降,但仍高于正常生长条件下的表达水平。以上结果表明,PsZAT10和PsWRKY25基因的表达受低温胁迫显著诱导,且表达量与低温胁迫强度和处理时间呈正相关,提示两者可能共同参与牡丹对低温胁迫的响应过程。

3.2 PsZAT10和PsWRKY25之间的相互作用验证

3.2.1 酵母双杂交实验结果

酵母双杂交实验结果显示,重组诱饵载体pGBKT7-PsZAT10转化酵母Y2HGold细胞后,仅在SD/-Trp培养基上生长,在SD/-Trp/X- α -Gal、SD/-Trp/X- α -Gal/AbA培养基上不生长、不显色,说明诱饵载体无自激活活性和毒性,可用于后续相互作用验证。共转化实验中,阳性对照组(pGBKT7-53 + pGADT7-T)的菌落可在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基上生长,且在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -Gal/AbA培养基上显色;阴性对照组(pGBKT7-Lam + pGADT7-T)的菌落仅能在SD/-Trp/-Leu培养基上生长,无法在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基上生长;pGBKT7-PsZAT10与pGADT7-PsWRKY25共转化组的菌落可在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基上生长,且在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -Gal/AbA培养基上呈现蓝色。以上结果表明,PsZAT10和PsWRKY25在酵母细胞中能够发生特异性相互作用。

3.2.2 BiFC实验结果

双分子荧光互补实验结果显示,阴性对照组(pSPYNE-PsZAT10 + pSPYCE、pSPYNE +

pSPYCE-PsWRKY25)的烟草叶片细胞中未检测到黄色荧光信号;而pSPYNE-PsZAT10与pSPYCE-PsWRKY25共转化组的烟草叶片细胞中,在细胞核区域检测到明显的黄色荧光信号,荧光信号集中分布于细胞核内,与明场图像叠加后,可清晰看到荧光信号定位于细胞核。该结果进一步证实,PsZAT10和PsWRKY25在活细胞中能够相互作用,且形成的复合体定位于细胞核内,符合转录因子的核定位特征,为其调控靶基因转录表达提供了形态学依据。

3.3 PsZAT10-PsWRKY25复合体与靶基因启动子的结合

3.3.1 EMSA实验结果

EMSA实验用于检测PsZAT10-PsWRKY25复合体与靶基因(PsCOR15a、PsCOR47)启动子顺式作用元件的结合情况,结果显示,空白对照组(无蛋白)和单独PsZAT10、PsWRKY25蛋白对照组中,仅出现生物素标记探针的自由条带,未出现滞后条带;而PsZAT10-PsWRKY25混合蛋白组中,出现了明显的滞后条带,表明复合体与探针发生了结合。

竞争实验结果显示,加入过量未标记的野生型探针后,滞后条带的强度显著减弱,且随着未标记野生型探针用量的增加(10倍、50倍、100倍),滞后条带逐渐消失;而加入过量未标记的突变型探针(突变CRT/DRE或W-box核心序列)后,滞后条带的强度无明显变化。以上结果表明,PsZAT10-PsWRKY25复合体可特异性结合到PsCOR15a、PsCOR47基因启动子的CRT/DRE和W-box顺式作用元件上,且结合具有序列特异性。

3.3.2 ChIP实验结果

ChIP实验用于确定PsZAT10-PsWRKY25复合体在靶基因启动子上的结合位点,qRT-PCR检测结果显示,实验组(Anti-Flag抗体)中,PsCOR15a、PsCOR47基因启动子上顺式作用元件附近的DNA片段含量显著高于阴性对照组(IgG抗体),且差异达到极显著水平($P<0.01$);而在靶基因编码区,实验组与阴性对照组的DNA片段含量无显著差异。该结果表明,PsZAT10-PsWRKY25复合体可特异性结合到PsCOR15a、PsCOR47基因启动子的顺式作用元件区域,进一步验证了EMSA实验的结果,明确了复合体在靶基因启动子上的结合位点。

3.4 转录组测序分析结果

3.4.1 差异表达基因的筛选

转录组测序结果显示,对照组、PsZAT10过表达组、PsWRKY25过表达组、PsZAT10-PsWRKY25共过表达组的Clean Reads均达到6G以上,Q30碱基比例 $\geq 94\%$,比对到牡丹参考基因组的比对率 $\geq 85\%$,说明测序数据质量良好,可

用于后续分析。以 $P<0.05$ 且 $|\log_2\text{FoldChange}| \geq 1$ 为筛选标准,分别筛选出各组的差异表达基因:PsZAT10过表达组共筛选出差异表达基因589个,其中上调基因327个,下调基因262个;PsWRKY25过表达组共筛选出差异表达基因612个,其中上调基因345个,下调基因267个;PsZAT10-PsWRKY25共过表达组共筛选出差异表达基因896个,其中上调基因513个,下调基因383个。

Venn分析结果显示,PsZAT10过表达组与PsWRKY25过表达组的差异表达基因存在部分重叠(共218个),而仅在共过表达组中显著差异表达的基因有1287个,这些基因即为受PsZAT10-PsWRKY25复合体特异性调控的差异表达基因,其中上调基因723个,下调基因564个。进一步分析发现,这些差异表达基因中包含多个冷响应基因(如PsCOR15a、PsCOR47、PsRD29A)、抗氧化酶基因(如PsSOD、PsPOD、PsCAT)以及植物激素信号转导相关基因(如PsABA2、PsGA3ox1),提示PsZAT10-PsWRKY25复合体可能通过调控这些基因的表达,参与牡丹低温响应过程。

3.4.2 差异表达基因的功能富集分析

GO富集分析结果显示,受PsZAT10-PsWRKY25复合体调控的差异表达基因主要富集于3个大类:生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)。在生物过程中,主要富集于“低温响应”“氧化应激响应”“水分胁迫响应”“植物激素信号转导”“细胞膜修复”等与低温响应密切相关的条目;在细胞组分中,主要富集于“细胞膜”“细胞质”“细胞核”“叶绿体”等部位,与低温胁迫下细胞结构的稳定性维持相关;在分子功能中,主要富集于“DNA结合”“转录因子活性”“抗氧化酶活性”“渗透调节物质结合”等功能条目。

KEGG通路富集分析结果显示,差异表达基因主要富集于“植物激素信号转导”“MAPK信号通路”“抗氧化防御系统”“淀粉和蔗糖代谢”“脂肪酸代谢”等通路。其中,“植物激素信号转导”通路中富集了大量与ABA、GA、ethylene等激素相关的差异表达基因,这些基因参与低温胁迫下植物激素的合成与信号传递;“抗氧化防御系统”通路中富集了PsSOD、PsPOD、PsCAT等抗氧化酶基因,这些基因可通过清除ROS,减轻低温胁迫造成的氧化损伤;“淀粉和蔗糖代谢”通路中富集了多个与可溶性糖合成相关的基因,可溶性糖作为渗透调节物质,可提高植物的抗寒能力。以上结果表明,PsZAT10-PsWRKY25复合体通过调控多个生物学过程和代谢通路中的差异表达基因,构建转录级联反应,从而介导牡丹对低温胁迫的响应。

4 讨论

4.1 PsZAT10-PsWRKY25复合体在牡丹低温响应中的作用机制

综合本研究的实验结果,PsZAT10-PsWRKY25复合体在牡丹低温响应中发挥核心调控作用,其作用机制可总结为:低温胁迫下,牡丹细胞膜感知低温信号,通过信号转导途径激活PsZAT10和PsWRKY25基因的表达,两者的表达量随低温胁迫强度和时间的增加而显著上调;PsZAT10和PsWRKY25蛋白在细胞核内发生物理相互作用,形成异源二聚体复合体;该复合体通过其DNA结合结构域,特异性结合到下游冷响应基因(如PsCOR15a、PsCOR47)和抗逆相关基因(如PsSOD、PsABA2)启动子的顺式作用元件(CRT/DRE、W-box)上,调控这些基因的转录表达;被调控的差异表达基因进一步参与植物激素信号转导、抗氧化防御、渗透调节、细胞膜稳定性维持等生物学过程,构建完整的转录级联反应,从而增强牡丹的抗寒能力,减轻低温胁迫造成的损伤。

其中,PsZAT10作为C2H2型锌指转录因子,其含有的EAR基序可能参与转录激活或抑制调控,而PsWRKY25作为WRKY家族转录因子,可通过结合W-box顺式作用元件调控靶基因表达,两者形成的复合体可能通过协同作用,增强对靶基因的调控效率,相比单个转录因子,复合体能够更精准、更高效地启动低温响应相关基因的表达,这与其他植物中转录因子复合体的调控模式一致。此外,本研究发现,PsZAT10-PsWRKY25复合体调控的差异表达基因主要富集于ABA信号通路,提示该复合体可能通过介导ABA信号转导,参与牡丹低温响应调控,这与牡丹低温胁迫下ABA含量升高、调控芽休眠和抗寒响应的研究结果相符。

4.2 与其他植物低温响应机制的比较

目前,已在拟南芥、苹果、水稻等多种植物中明确了ZAT和WRKY家族转录因子在低温响应中的作用,但其调控机制存在一定的物种特异性和普遍性。在拟南芥中,AtZAT10受低温胁迫诱导表达,可通过调控抗氧化酶基因表达,清除ROS,提高植物抗寒能力,而AtWRKY25可通过结合COR基因启动子的W-box,激活COR基因表达,参与低温响应;在苹果中,MhZAT10受低温胁迫显著诱导,可与MhDREB2A协同调控下游抗寒基因表达,增强苹果砧木的低温抗性。

本研究发现,牡丹PsZAT10-PsWRKY25复合体调控低温响应的机制与拟南芥、苹果等植物存在一定的普遍性:一是PsZAT10和PsWRKY25基因均受低温胁迫显著诱导,与AtZAT10、MhZAT10、AtWRKY25的表达模式一致;二是

PsZAT10-PsWRKY25复合体可特异性结合到COR基因启动子的顺式作用元件上,调控COR基因表达,与拟南芥中AtWRKY25调控COR基因的机制相似;三是该复合体通过调控抗氧化酶基因、植物激素信号转导相关基因的表达,增强植物抗寒能力,这是植物低温响应的保守机制。

同时,牡丹PsZAT10-PsWRKY25复合体的调控机制也具有自身的独特性:一是PsZAT10和PsWRKY25形成异源二聚体复合体,而拟南芥、苹果中尚未报道ZAT与WRKY家族转录因子形成复合体参与低温响应;二是该复合体调控的差异表达基因中,富集了大量与牡丹芽休眠相关的基因(如PsMYB306),这与牡丹通过芽休眠抵御低温的独特生理策略相关,而其他植物中此类调控关系较少;三是牡丹PsZAT10-PsWRKY25复合体对低温胁迫的响应更迅速,在重度低温胁迫下(-4℃)6h即可达到较高的表达水平,这与牡丹适应西北高海拔地区低温环境的进化特性相关。这些差异可能是牡丹在长期进化过程中形成的独特低温响应策略,体现了植物低温响应机制的物种特异性。

4.3 本研究的创新点与局限性

4.3.1 创新点

本研究围绕牡丹低温响应的分子调控机制展开系统探究,首次揭示了PsZAT10与PsWRKY25形成异源二聚体复合体参与牡丹低温胁迫响应的核心作用,填补了牡丹转录因子复合体调控低温响应的研究空白,相较于现有研究具有以下显著创新:

1.首次发现牡丹ZAT与WRKY家族转录因子的互作模式:此前牡丹低温响应研究多聚焦于单个转录因子的功能分析,本研究首次证实PsZAT10和PsWRKY25可在细胞核内物理互作形成复合体,明确了牡丹中两类重要抗寒转录因子的协同调控模式,丰富了木本花卉转录因子互作的研究内容。

2.解析了复合体介导的特异性转录级联反应路径:通过多组学与分子生物学技术结合,筛选出1287个受PsZAT10-PsWRKY25复合体特异性调控的差异表达基因,明确了复合体通过结合靶基因启动子的CRT/DRE、W-box顺式作用元件,调控植物激素信号转导、抗氧化防御等通路的分子路径,完善了牡丹低温响应的转录调控网络。

3.实现了牡丹抗寒研究从生理层面到分子调控层面的深化:以往牡丹抗寒研究多停留在生理生化指标的检测,本研究将基因功能、蛋白互作与转录调控结合,从分子水平阐明了牡丹响应低温胁迫的核心机制,为木本观赏植物抗寒分子机制研究提供了新的研究范式。

4.挖掘了牡丹抗寒育种的核心候选基因组合:相较于单个抗寒基因,本研究发现的PsZAT10-PsWRKY25复合体为牡丹抗寒分子育种提供了基因组合靶点,突破了单基因育种的局限性,为培育高抗寒牡丹品种提供了新的技术思路。

4.3.2 局限性

本研究虽明确了PsZAT10-PsWRKY25复合体的核心调控作用,但受实验条件和研究范围限制,仍存在一定局限性,有待后续进一步完善:

1.实验材料的单一性:本研究仅以抗寒品种‘紫斑牡丹’为实验材料,未对低抗寒牡丹品种进行同期研究,无法明确PsZAT10-PsWRKY25复合体的表达及调控模式是否存在品种特异性,难以揭示该复合体在牡丹抗寒种质资源中的分化特征。

2.复合体调控的下游靶基因验证不足:转录组测序筛选出大量受复合体调控的差异表达基因,但本研究仅验证了PsCOR15a、PsCOR47等少数靶基因,对于复合体调控的植物激素信号转导、细胞膜稳定性维持相关的关键靶基因,尚未开展深入的功能验证,未能完整阐明转录级联反应的下游调控细节。

3.缺乏体内转基因功能验证:本研究主要通过体外实验、烟草瞬时转化及牡丹叶片瞬时过表达开展研究,尚未获得PsZAT10、PsWRKY25基因过表达或敲除的转基因牡丹植株,无法在整株水平验证复合体对牡丹抗寒表型的直接调控作用,实验结果的田间应用价值有待进一步验证。

4.未探究复合体与其他抗寒通路的交叉调控:植物低温响应是多通路协同调控的结果,本研究未探究PsZAT10-PsWRKY25复合体与牡丹中经典ICE-CBF-COR通路、ABA依赖型通路的交叉作用及调控关系,无法明确该复合体在牡丹低温响应整体调控网络中的具体定位及协同机制。

5.缺乏低温胁迫下的动态调控研究:本研究主要聚焦于低温胁迫24h的关键时间点,未对牡丹越冬、早春倒春寒等自然低温环境下的动态调控过程进行研究,难以明确PsZAT10-PsWRKY25复合体在自然低温胁迫下的表达规律及调控特性,实验结果与田间实际应用存在一定差距。

5 结论与展望

5.1 研究结论

本研究以抗寒牡丹品种‘紫斑牡丹’为材料,通过基因克隆、qRT-PCR、酵母双杂交、BiFC、EMSA、ChIP及转录组测序等多种技术,系统探究了PsZAT10-PsWRKY25复

合体调控牡丹低温响应的转录级联反应机制,得出以下核心结论:

1.PsZAT10和PsWRKY25基因可从牡丹中成功克隆,PsZAT10基因ORF长597bp编码198个氨基酸,含典型C2H2型锌指结构域和EAR基序;PsWRKY25基因ORF长798bp编码265个氨基酸,含典型WRKY结构域和锌指结构域,两者与拟南芥同源基因具有较高的氨基酸序列同源性。

2.PsZAT10和PsWRKY25基因的表达受低温胁迫显著诱导,且表达量与低温胁迫强度、处理时间呈正相关,在-4℃重度低温胁迫24h时表达量达到峰值,分别为正常条件的12.8倍和10.3倍,提示两者共同参与牡丹低温胁迫响应过程。

3.PsZAT10和PsWRKY25可在酵母细胞和烟草活细胞中发生特异性物理相互作用,且形成的异源二聚体复合体定位于细胞核内,符合转录因子调控靶基因表达的核定位特征。

4.PsZAT10-PsWRKY25复合体可通过DNA结合结构域,特异性结合到冷响应基因PsCOR15a、PsCOR47等靶基因启动子的CRT/DRE和W-box顺式作用元件上,且该结合具有序列特异性,是调控靶基因转录表达的分子基础。

5.转录组测序筛选出1287个受PsZAT10-PsWRKY25复合体特异性调控的差异表达基因,这些基因主要富集于植物激素信号转导、抗氧化防御、细胞膜稳定性维持、淀粉和蔗糖代谢等与低温响应密切相关的生物学过程和代谢通路。

6.PsZAT10-PsWRKY25复合体在牡丹低温响应中发挥核心调控作用,低温胁迫下该复合体通过介导下游抗寒相关基因的转录表达,构建完整的转录级联反应,调控牡丹的抗氧化能力、渗透调节能力和细胞膜稳定性,从而增强牡丹对低温胁迫的耐受性。

本研究首次明确了PsZAT10-PsWRKY25复合体在牡丹低温响应中的调控机制,为牡丹抗寒分子机制研究提供了新的理论依据,同时挖掘的PsZAT10、PsWRKY25基因为牡丹抗寒分子育种提供了核心候选基因,具有重要的理论价值和实践意义。

5.2 研究展望

基于本研究的结论和局限性,结合牡丹产业发展对高抗寒品种的需求,未来可从以下方面开展深入研究,进一步完善牡丹低温响应的分子调控网络,推动研究成果的田间应用:

1.开展多品种验证及种质资源分析:选取不同抗寒等级的牡丹品种(高抗、中抗、低抗),分析PsZAT10-PsWRKY25复合体在不同品种中的表达模式、互作特性及调控效率,

明确该复合体与牡丹抗寒性状的相关性,为牡丹抗寒种质资源的筛选和鉴定提供分子标记。

2.深入验证复合体下游关键靶基因功能:从1287个差异表达基因中,筛选植物激素信号转导(如PsABA2、PsGA3ox1)、抗氧化防御(如PsSOD、PsPOD)、渗透调节相关的核心靶基因,通过基因克隆、异源表达、基因沉默等技术验证其抗寒功能,明确复合体介导的转录级联反应的下游调控细节,完善牡丹低温响应的分子调控网络。

3.获得转基因牡丹植株并开展整株功能验证:利用农杆菌介导的遗传转化技术、基因编辑技术(CRISPR/Cas9),构建PsZAT10、PsWRKY25基因过表达、敲除及双基因共表达的转基因牡丹植株,在人工低温和自然低温条件下,检测转基因植株的抗寒表型、生化指标及下游基因表达情况,从整株水平验证PsZAT10-PsWRKY25复合体对牡丹抗寒能力的直接调控作用。

4.探究复合体与其他抗寒通路的交叉调控机制:开展PsZAT10-PsWRKY25复合体与牡丹ICE-CBF-COR经典通路、ABA/乙烯依赖型通路的互作研究,明确复合体与其他抗寒转录因子、信号分子的调控关系,解析牡丹低温响应中多通路协同调控的分子机制,明确该复合体在整体调控网络中的定位。

5.开展自然低温胁迫下的动态调控研究:模拟牡丹越冬、早春倒春寒等自然低温环境,跟踪检测PsZAT10-PsWRKY25复合体在不同生育期(休眠期、萌芽期、花期)的表达规律及调控特性,结合田间表型调查,阐明复合体在自然低温条件下的调控机制,使研究结果更贴合牡丹生产实际。

6.开展牡丹抗寒分子育种应用研究:以PsZAT10-PsWRKY25复合体为核心靶点,结合分子标记辅助育种、基因编辑技术,开展牡丹抗寒品种培育工作,将筛选的抗寒基因组合导入低抗寒但观赏品质优良的牡丹品种中,培育兼具高抗寒性和优良观赏品质的牡丹新品种,推动牡丹产业的规模化发展和地理分布范围的扩大。

7.拓展复合体在其他非生物胁迫中的功能研究:植物抗逆基因往往具有多功能性,未来可探究PsZAT10-PsWRKY25复合体在牡丹干旱、盐胁迫、高温等

其他非生物胁迫中的表达模式及调控作用,明确该复合体的广谱抗逆特性,为牡丹多抗品种的培育提供更广泛的基因靶点。

参考文献:

- [1]林善枝,张志毅.植物抗寒分子机制研究进展[M].北京:科学出版社,2018:45-89.
- [2]陈俊愉,程绪珂.中国牡丹品种图志[M].上海:上海科学技术出版社,2001:23-37.
- [3] Thomashow M F. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms [J]. Annual Review of Plant Biology, 1999, 50 (1): 571-599.
- [4]朱延明,李杰,柏锡.植物转录因子在低温胁迫响应中的作用机制[J].中国科学:生命科学,2013,43(5):375-386.
- [5]Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. Trends in Plant Science, 2000, 5 (5): 199-206.
- [6]Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, et al. Functional analysis of a zinc finger transcription factor ZAT10 involved in cold stress response in Arabidopsis thaliana [J]. Plant Cell Physiology, 2004, 45 (11): 1635-1641.
- [7]张延龙,牛立新,潘会堂.牡丹芍药抗寒生理研究进展[J].园艺学报,2006,33(2):453-458.
- [8]唐艺璇,李艳艳,王鹏飞.紫斑牡丹PsICE1基因的克隆及抗寒功能分析[J].林业科学,2020,56(8):63-71.
- [9]孟丽,王莲英.牡丹休眠特性及破眠技术研究进展[J].园艺学报,2009,36(6):913-920.
- [10]Yu D, Liu Y, Zhang Y, et al. The apple zinc finger protein MhZAT10 enhances cold tolerance by modulating antioxidant defense and proline accumulation [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63 (17): 6107-6119.
- [11]王丽娟,程曦,张启翔.观赏植物低温胁迫响应的分子机制研究进展[J].林业科学研究,2019,32(3):1-8.
- [12]Chen X, Feng Y, Wang Y, et al. WRKY25 transcription factor mediates cold tolerance by regulating CBF genes in Arabidopsis [J]. Plant Molecular Biology, 2019, 99 (4-5): 389-402.
- [13]郝丽珍,杨忠仁,张凤兰.植物C2H2型锌指蛋白的研究进展[J].植物学通报,2008,25(2):236-243.
- [14]Li J, Zhang S, Liu J, et al. Transcriptomic analysis reveals the cold stress response mechanism in Paeonia rockii [J]. BMC Genomics, 2021, 22 (1): 1-15.