

13个水稻 WRKY 基因的克隆及其表达谱分析

仇玉萍 * 荆邵娟 * 付坚 * 李璐 余迪求 †

(中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部, 昆明 650223; 中国科学院研究生院, 北京 100039. * 同等贡献. † 联系人, E-mail: ydq@xtbg.ac.cn)

摘要 转录调控因子 WRKY 蛋白拥有高度保守的氨基酸序列 WRKYGQK 和 Cys₂His₂ 或 Cys₂HisCys 锌指型结构. 利用 WRKY 蛋白质的保守结构域, 搜索了整个水稻基因组编码 WRKY 蛋白质的基因, 鉴定了 97 个 WRKY 基因, 并从 4 胁迫的水稻植株 cDNA 文库中获得 13 个 WRKY 基因全长 cDNA 克隆. Northern blotting 分析结果显示, 其中 10 个 WRKY 基因的表达受到 NaCl, PEG, 低温(4 °C)和高温(42 °C)等 4 种非生物逆境因子胁迫的影响, 但其诱导表达模式不论在逆境因子种类还是在诱导时间上均存在着很大的差异, 这种基因诱导表达模式的差异可能体现于它们之间的生物学功能的差异.

关键词 水稻 转录调控因子 WRKY 基因 非生物逆境因子 基因表达谱

转录调控因子 WRKY 基因家族是植物特有的超基因家族, 在其编码蛋白的 N-端含有高度保守的氨基酸序列 WRKYGQK 和 Cys₂His₂ 或 Cys₂HisCys 锌指型结构^[1,2]. WRKY 蛋白特异地结合靶基因启动子区域的特异序列(T)TGACC(A/T)(W 盒)来调节靶基因的表达^[3]. 许多研究工作证实, WRKY 基因调控植物许多重要的生命活动. 首先, WRKY 基因调控植物抗病反应的建立^[4~10]. 比如, 拟南芥 WRKY 基因家族第 3 组 WRKY 基因成员分别参与植物不同保护信号转导途径的抗病反应^[8]. 拟南芥 RRS1-R(WRKY16)蛋白拥有抗病基因产物典型的核苷结合位点(NBS)、富含亮氨酸重复序列(LRR)结构域特征以及 WRKY 基因产物典型的入细胞核信号及 DNA-结合结构域(WRKY)特征. 因此, WRKY16 基因既作为典型的抗病基因参与拟南芥植株抵抗病原菌 *Ralstonia solanacearum* 的侵入, 又作为典型的 WRKY 基因参与拟南芥植株的抗病信号转导^[9], 并将植物保护反应的战场扩展至细胞核^[11]. 拟南芥 WRKY70 蛋白质激活水杨酸介导的植株抗病信号转导途径而抑制茉莉酸介导的植株抗病信号转导途径, 是此二条抗病信号转导途径的调控交叉点^[10]. 其次, WRKY 蛋白质还调控植株非生物抗性反应的建立和部分形态建成^[12~14]. 比如, 拟南芥 WRKY6 蛋白质通过特异地结合到衰老诱导受体样激酶(SIRK)基因启动子区域的 W 盒序列而调节植物衰老和植物抗病性建立^[12], 但拟南芥 WRKY53 参与拟南芥叶片衰老早期发生^[13]. 拟南芥 WRKY44 蛋白质调控叶片表皮毛和种子外表皮的发育^[14]. 另外, 马铃薯 WRKY 基因与马铃薯抗病性数量性状的形成有关, 并受晚疫病病原菌诱导表达^[15,16]; 豆科 WRKY 基因参与豆科植物抗旱性的建

立和种子休眠的形成^[17]; 大麦 *SUSIBA2*(WRKY)基因产物通过特异地结合到异构淀粉酶 1(*iso1: isoamylase1*)基因启动子区域的 SURE (sugar responsive)和 W 盒序列而调控糖代谢信号转导^[18].

水稻是重要的农作物. 有关水稻 WRKY 基因家族的基因功能研究, 目前尚未有详细的文献报道. 随着水稻基因组核苷酸序列测定完成, 通过搜索水稻基因组核苷酸序列, 已鉴定出 77 个 WRKY 基因, 并证实水稻 WRKY71 蛋白是糊粉层细胞内的赤霉素信号转导途径的转录抑制因子^[19]. 在本研究中, 我们重新搜索了整个水稻基因组核苷酸序列, 鉴定了 20 多个额外的 WRKY 基因, 并综合汇总所有水稻 WRKY 基因的信息(表 1). 在此基础上, 通过综合利用 RT-PCR 和 cDNA 文库筛选等分子生物学技术, 从水稻基因组中克隆获得 13 个 WRKY 基因全长 cDNA. 为了阐明 WRKY 基因的分子生物学功能, 我们首先开展所获得的 13 个基因表达谱分析, 其中 10 个 WRKY 基因受不同的非生物逆境因子诱导表达.

1 材料与方法

() 材料. 滇旬 8 号水稻种子由云南农业大学水稻研究所提供. [³²P]dATP(>3000 Ci/mmol)购自北京福瑞生物工程公司. cDNA 合成和文库构建试剂盒购自 Clontech 公司. 其他化学试剂购自上海生工公司和大连 TaKaRa 生物工程公司.

() 序列分析. 燕麦(*Avena sativa*)的 AsWRKY3 作为外类群, 用 Megalign 5.01 的 Cluster method 的方法形成矩阵^[20]. 同时, 用 PAUP4.0b10 进行系统发生重建分析^[21], 采用邻接法搜索形成系统树, 对分支的可靠性评价采用了靴带分析(Bootstrap). 通过上述系统的分析研究, 我们获得水稻 WRKY 蛋白质家族 97

个成员的系统发生树。

() 实验材料的处理. 分别采用低温(4)、高温(42)、高盐(250 mmol/L NaCl)、25% PEG 8000 等 4 种非生物逆境因子胁迫土壤培养 5 周的滇旬 8 号水稻幼苗, 并分别于胁迫 0, 1, 2, 4, 8 和 12 h 后收集材料, 用液氮速冻后储存于-80 超低温冰箱备用。

() 核酸的提取、cDNA 文库构建和 WRKY cDNA 的克隆. 水稻幼苗总 RNA 的提取采用 Logemann 等人^[22]的修改方法. 根据 cDNA 合成和文库构建试剂盒的程序(BD Clontech), 构建低温(4)诱导 2 h 的 cDNA 文库. 根据 WRKY 蛋白质的保守结构域 WRKYGQK 设计简并引物(5'-AGAATTCTGGAGR-AAATACGGMCAR-3', R 示 A 或 G; M 示 G 或 C)与 Poly(dT)引物配对, 进行 RT-PCR 扩增. 随后, 将 RT-PCR 扩增产物克隆到 pMD18-T 载体上, 并测序和预测氨基酸序列. 最后, 将获得的 WRKY 基因部分 DNA 序列作为探针, 筛选水稻 cDNA 文库, 获得 13 个 WRKY 全长 cDNA。

() Northern blotting 分析. Northern blotting 杂交分析按照标准实验方法进行^[23]. 酶切获得相应 WRKY 基因的特异 DNA 片段, 随机引物标记制备探针, 68 杂交过夜. 按照标准方法洗膜(2×SSC, 0.5% SDS 10 min 1 次; 0.5×SSC, 0.1% SDS, 20 min 2 次; 0.1×SSC, 0.1% SDS, 20 min 1 次), 压膜, 放射自显影。

2 实验结果

2.1 编码 WRKY 蛋白基因的鉴定和系统分类

在此之前, 通过搜索水稻基因组核苷酸序列, Zhang 等人^[19]已初步鉴定了 77 个编码 WRKY 蛋白质(OsWRKY1-OsWRKY77)的基因. 在此基础上, 利用 WRKY 蛋白质特有的保守氨基酸序列 WRKYGQK, 我们重新搜索了整个水稻基因组编码 WRKY 蛋白质的基因, 并鉴定了 24 个额外的 WRKY 基因(表 1). 序列分析揭示, 在 Zhang 等人^[19]所鉴定的 77 个 WRKY 蛋白质中, OsWRKY25 和 OsWRKY44, OsWRKY26 和 OsWRKY59, OsWRKY33 和 OsWRKY38 以及 OsWRKY41 和 OsWRKY63 等 4 对 WRKY 蛋白质是由相同的基因编码. 因此, 这新鉴定的 24 个 WRKY 基因分别命名为 OsWRKY38, OsWRKY44, OsWRKY59, OsWRKY63 和 OsWRKY78 到 OsWRKY97 (表 1)。

根据氨基酸序列比较分析, 与拟南芥 WRKY 蛋白质家族一样^[1,2], 可以将水稻 WRKY 蛋白家族划分为 3 大类型. 第 1 大类型, 拥有 2 个典型的 WRKY 结构域(即 WRKYGQK 保守序列)和 Cys2-His2 锌指型结构. 第 2 大类型, 拥有 1 个典型的 WRKY 结构域和 Cys2-His2 锌指型结构. 第 3 大类型, 拥有 1 个典型的 WRKY 结构域和 Cys2-His/Cys 锌指型结构. 根据此划分原则, 我们归纳了所有 97 个水稻 WRKY 基因的命名、分类、BAC 文库位点、cDNA 或 EST 克隆等信息(表 1). 利用计算机程序, 将 97 个水稻 WRKY 蛋白质序列矩阵分析, 并形成系统发生树(图 1). 通过靴带(Bootstrap)分析评估, 有 20 组 WRKY 基因的亲源关系得到 95% 以上的强烈支持(图 1). 根据氨基酸序列的相似性, 97 个 WRKY 蛋白质被划分为 13 族, 其中第 1 大类型的 WRKY 蛋白质独立聚集成 1 族, 第 3 大类型的 WRKY 蛋白质分别聚集成 a 和 b 等 2 族, 而第 2 大类型的 WRKY 蛋白质被划分为 a~j 等 10 族(图 1)。

在整个水稻 WRKY 基因家族中, 除了大部分 WRKY 蛋白质具有典型的 WRKY 结构域外, 尚有 12 个蛋白质的 WRKY 结构域的氨基酸序列有别于其典型的结构域序列, 即分别为 WRKYGKK 和 WRKYGEK. 而拥有 WRKYGKK 和 WRKYGEK 序列的蛋白质分别属于不同的基因家族类型, 即第 2 大类型和第 2 大类型(表 1, 图 1). 有意义的是, WRKY 结构域为 WRKYGEK 序列的 WRKY 蛋白质在拟南芥和其他植物基因组中尚未被鉴定. 因此, 此类拥有 WRKYGEK 结构域的水稻 WRKY 基因可能从其他 WRKY 基因进化而来, 并可能具有新的生物学功能。

通过氨基酸一致性的比较分析, 在水稻 97 个 WRKY 基因中, 有 3 对 WRKY 基因所编码蛋白质具有高度的氨基酸一致性. 位于 11 号染色体上的 WRKY93, 40 和 50 号分别与位于 12 号染色体上的 WRKY95, 64 和 65 号的氨基酸序列之间的一致性达到 99%, 91% 和 81%. WRKY93, 40 和 50 号基因串联分布于 11 号染色体 BAC 克隆 AC123514 的 73999~59764 bp(约 14.2 kb)区域内, 而 WRKY95, 64 和 65 号基因则串联分布于 12 号染色体 BAC 克隆 BX000500 的 51739~30169 bp(约 21.5 kb)区域内. 在这 2 条染色体局部区域内, 其核苷酸序列的一致性高

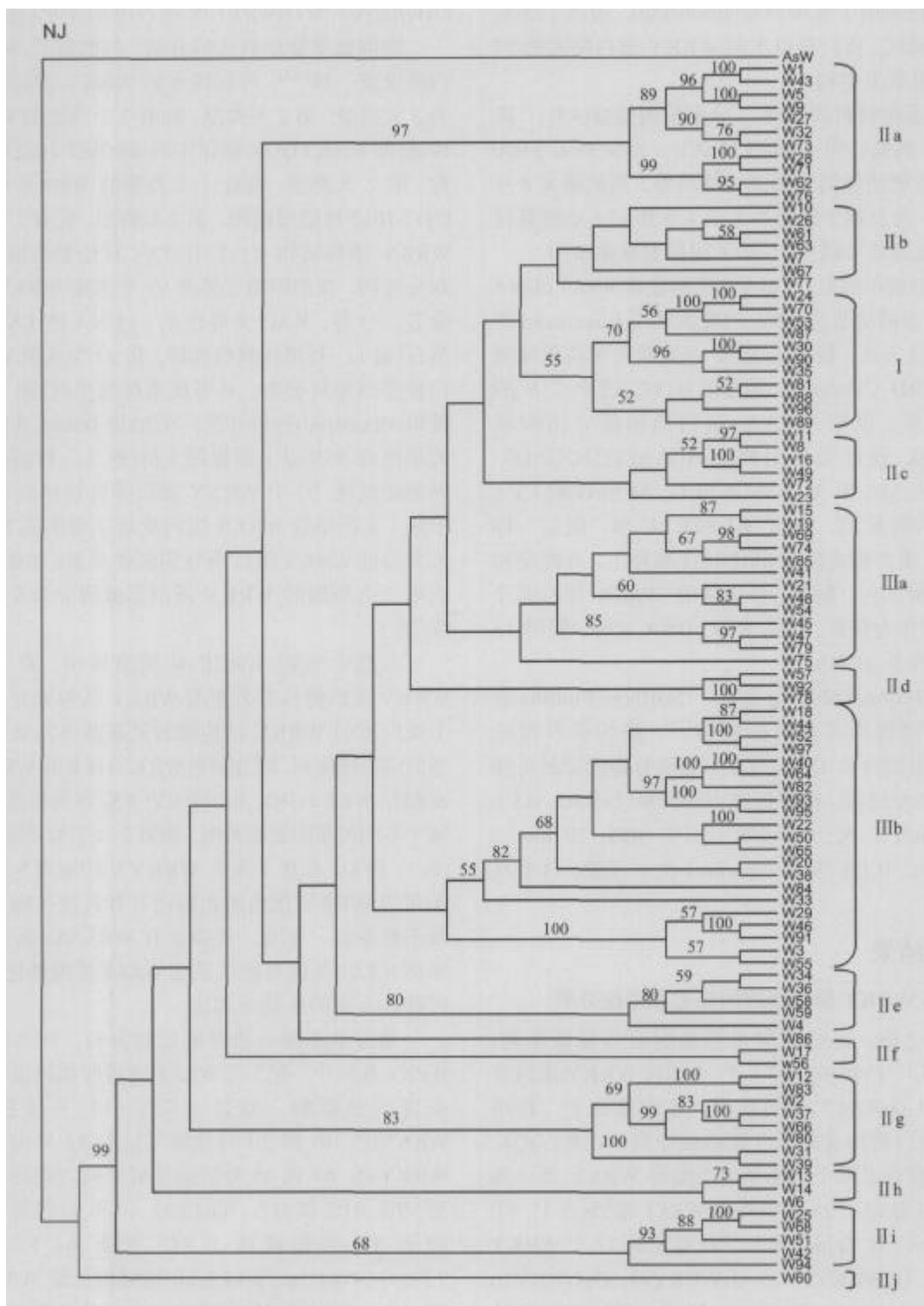


图 1 水稻 WRKY 蛋白系统发生树

表 1 水稻转录调控因子 WRKY 基因家族成员鉴定

WRKY	类型	染色体	cDNA/EST	基因	BAC/ORF	GenBank 登录号
1	2	1	AK105509	BK005004	P0034C11.1	AP002865
			C26525	NM_188767	OSJNBa0004G10.20	AP003074
					OSJNBa0049B20.9	AC007789
2	2	10	AK108346	BK005005	OSJNBa0056G17.18	AC018727
3	3	3	AK069091	BK005006	OSJNBa0040E01.4	AC079887
			AY341859			
4	1	3	AY341852	BK005007	OSJNBa0040E01.10	AC079887
			AY341848		OSJNBb0048A17.12	AC084282
5	2	5		BK005008	OJ1127_B08_85530~94442 bp	AC093490
6	2	3		BK005009	OSJNBa0052F07.29	AC104321
				NM_185053	OSJNBa0094F01.2	AC093713
7	2	5		BK005010	OJ1741_B01_120642~121661bp	AC097112
8	2	5	AK109568	BK005011	OSJNBb0035N21.13	AC134929
			AY341857		OJ1651_G11_109415~111400bp	AC098573
9	2	1		BK005012	AP002480_113596~121836bp	AP002480
				NM_183590		
10	2	1	AK109578	BK005013	AP002486_106376~107035	AP002486
			AY341854	NM_189615		
11	2	1	AK108745	BK005014	P0688A04.2	AP002839
			AY341856	NM_192891	P0006C01.17	AP002744
12	2	1	AK111416	BK005015	P0006C01.4	AP002744
				NM_192878		
13	2	1	AK067329	BK005016	P0481E12.40	AP003076
			AK099515	NM_191228		
			AK060018			
14	2	1	AK109770	BK005017	P0435H01.23	AP003142
			D24303	NM_191885		
			C26098			
15	3	1		BK005018	P0694A04.6	AP003294
				NM_192434		AP003212
16	2	1	AU164995	BK005019	P0003E08.17	AP003222
			AY341855	NM_191908		
			AY341844			
17	2	1	AK110625	BK005020	P0698H10.6	AP003298
			AY341842	NM_189473	P0518C01.28	AP003277
18	3	10		BK005021	OSJNBa0073L20.17	AC099774
						AE017076
19	3	5	AK108389	BK005022	AC104284_149826~159453	AC104284
20	3	1		BK005023	P0485B12.3	AP003348
				NM_190349	P0703B11.11	AP003302
21	3	1	AK108657	BK005024	P0703B11.23	AP003302
				NM_190360	P0485B12.15	AP003348
22	3	1		BK005025	P0703B11.5	AP003302
				NM_190343		
23	2	1	AK108909	BK005026	B1060H01.7	AP003560
			AY341845	NM_191553	OSJNBb0036G09.13	AP003309
24	1	1	AK107199	BK005027	P0439E11.17	AP003315

续表

WRKY	类型	染色体	cDNA/EST	基因	BAC.ORF	GenBank 登录号
			AY341849	NM_190410		
25	2	8		BK005028	OJ1449_H02.26	AP004648
				BK005047		
26	2	1	AK108555	BK005029	B1131B07.13	AP003408
				BK005062		
				NM_191743		
27	2	1		BK005030	P0700A11.6	AP003300
				NM_192540	P0712E02.25	AP003492
28	2	6	AK106282	BK005031	AP003517_105914~110036bp	AP003517
			AK119644			
29	3	7	AY341858	BK005032	OJ1123_C12.16	AP003746
				NM_186188		
30	1	8	AK065518	BK005033	OJ1118_A06.2	AP 003873
			AK062027			
31	2	6		BK005034	AP003951_62471~61311bp	AP003951
32	2	2		BK005035	OJ1079_F11.32	AP004080
					OJ1353_F08.1	AP004058
33	3	9		BK005036	AC090056_108227~115569bp	AC090056
				BK005041	AP006758_46362~53710bp	AP006758
34	2	2	AK072906	BK005037	C90ERIPDM	AJ307662
					AP002485_101481~104757bp	AP002485
					AP004175_92970~96132bp	AP004175
35	1	4	AY341843	BK005038	OSJNBa0089K21.12	AL606441
			AY341851			
36	2	4	AK073695	BK005039	OSJNBb0038F03.13	AL606728
37	2	4	AK110912	BK005040	OSJNBa0093F12.9	AL607004
38	3	1		NM_190356	P0703B11.18	AP003302
					P0485B12.10	AP003348
39	2	2	AK107047	BK005042	AP004683_92372~91070bp	AP004683
			AK066775			
			AK119593			
40	3	11		BK005043	AC123514_61109~66356 bp	AC123514
41	3	11	AK121102	BK005044	AC135644_29371~43575 bp	AC135644
			AK066053	BK005066	AC135644_36528~43186 bp	AC135644
42	2	2	AK110587	BK005045	OSJNBa0035A24	AP005514
43	2	5		BK005046	AC120986_98432~100880 bp	AC120986
44	3	1		NM_190346	P0703B11.8	AP003302
45	3	5	AK066255	BK005048	AC136227_84441~86584 bp	AC136227
			AK103959			
			AK105939			
			AK063697			
46	3	12	AK073243	BK005049	BX000500_55289~66775 bp	BX000500
47	3	7	AK110900	BK005050	OSJNBa0008J01.9	AP005099
48	3	5		BK005051	AC144737_70702~72279 bp	AC144737
49	2	5		BK005052	AC120986_11783~17456 bp	AC120986
					AC121360_97245~10298 bp	AC121360
50	3	11		BK005054	AC123514_67325~73999 bp	AC123514

续表

WRKY	类型	染色体	cDNA/EST	基因	BAC/ORF	GenBank 登录号
51	2	4	AK100954 AK121494	BK005053	AL731615_115602~116669 bp	AL731615
52	3	11		BK005055	AC123514_26311~31095 bp	AC123514
53	1	5	AK121190	BK005056	AC135424_100279~102647 bp	AC135424
54	3	5		BK005057	AC144737_88078~93505 bp	AC144737
55	3	3	AK101653	BK005058	AC118674_13108~14365 bp	AC118674
56	2	1		BK005059 NM_190559	P0406G08.15	AP003240
57	2	12	AY341860	BK005060	BX000503_99939~102956 bp	BX000503
58	2	5		BK005061	AC108499_75782~74924 bp	AC108499
59	2	1	AK108755 AY341853	NM_189575	P0666G04.23	AP003047
60	2	3	AU162739	BK005063	OSJNBa0075A22.16	AC133859
61	1	11		BK005064	AC135644_81326~82302 bp	AC135644
62	2	9	AK067834	BK005065	AP005784_63011~61549 bp AP005417_14088~15800 bp	AP005784 AP005417
63	2	1	AU071032 AU091465 AU065466 AU082723	NM_189614	AP002486_100109~101310	AP002486
64	3	12		BK005067	BX000500_43384~44622 bp	BX000500
65	3	12		BK005068	BX000500_30169~32408 bp	BX000500
66	2	2	AK073100	BK005069	P0459B01.19	AP004778
67	2	5	AK066252	BK005070	AC135431_35305~36416 bp	AC135431
68	2	4	AK061266 AK072938	BK005071	OSJNBb0015N08.8	AL662996
69	3	8	AK111606	BK005072	P0434E03.6	AP004689
70	1	5	AK119867	BK005073	AC135924_97551~99972 bp	AC135924
71	2	2	AY541677	BK005074	OJ1297_C09_69154~74807	AP004087
72	2	11	AK108860	BK005075	AC136787_74368~77493 bp	AC136787
73	2	6		BK005076	AP003767_4086~8191 bp	AP003767
74	3	9	AK065265	BK005077	AP005128_86725~88348 bp	AP005128
75	3	5		BK005078	AC136224_148851~156476 bp	AC136224
76	2	9	AK068337 AK059966 AY323479 AF467736	BK005079	AP005784_44950~46052 bp	AP005784
77	2	1	AK108522 AY341846	BK005080 NM_192521	AP003341_104809~105753bp AP003492_45486~46430 bp OSJNBb0024F06.15	AP003341 AP003492
78	2	1		NM_188117	AP001072_110726~118434	AP001072
79	3	3	AK105244		AC125496_26812~28598bp	AC125496
80	2	3	AK109795		AC128647_133246~137444bp OSJNBb0006O08.24	AC128647 AC120506
81	1	3	AF193802 AY302436		AC105743_72913~83236 bp	AC105743
82	3	5			AC135420_76117~86167 bp	AC135420

续表

WRKY	类型	染色体	cDNA/EST	基因	BAC/ORF	GenBank 登录号
83	2	5			OSJNBb0035N21.7	AC134929
84	3	5			OSJNBa0018K15.11	AC144737
85	3	6		NM_185588	P0702F05.11	AP005828
86	2	6		NM_185324	AP001129_68622~70535 bp	AP001129
87	1	7	AK070537		OJ1127_E01.114	AP003747
			AY341850			
88	1	7	AY341847		P0453E05.117	AP004275
						AP004265
89	1	8	AK073491		OJ1118_F05.13	AP004158
90	2	9	AK065078		AP005392_105750~108428bp	AP005392
			AK103745			
91	3	11	AK073243		AC123514_37188~40536 bp	AC123514
92	2	11			BX000496_51548~54565 bp	BX000496
93	3	11			AC123514_59764~60804 bp	AC123514
94	2	12	AK070648		AL731743_63844~65872 bp	AL731743
			AK104890			
95	3	12	AK102093		BX000500_50962~51739 bp	BX000500
96	1	12			AL731759_46690~51097 bp	AL731759
97	3	12			BX000500_78237~79317 bp	BX000500

达 93%，因此，这个现象可能预示着 11 号染色体与 12 号染色体之间存在着 DNA 重组、交换等事件。

2.2 编码 WRKY 蛋白质 cDNA 的克隆

通过筛选低温(4)诱导 cDNA 文库，获得 13 个 WRKY 基因全长 cDNA。在所获得的 13 个 WRKY 基因中，有 9 个 WRKY 基因(*OsWRKY3*, 8, 12, 14, 17, 23 和 45)在低温(4)诱导的水稻 cDNA 文库中高拷贝(约 10~30 个阳性克隆/10⁸cDNA 克隆)存在，而另外 4 个 WRKY 基因(*OsW9*, 21, 24 和 30)则以低拷贝(约 5~10 个阳性克隆/10¹⁰cDNA 克隆)存在。这预示着其中 9 个 WRKY 基因可能受非生物逆境因子诱导表达，在水稻抗逆境诱导反应中起着调控作用。通过 Blastn 搜索 GenBank 库，所克隆的 13 个水稻 WRKY 基因已有相应的 cDNA 序列公布(表 1)。根据相应 WRKY cDNA 或 EST 的组织来源(表 1)，上述 13 个 WRKY 基因可能分别在水稻花序、愈伤组织、黄化苗、成熟苗和幼根等部位表达。

2.3 高盐诱导 WRKY 基因表达分析

为了阐明所获得的水稻 WRKY 基因的分子生物学功能，分析 WRKY 基因在逆境反应中的基因表达谱。利用 Northern blotting 技术，分析高盐(250 mmol/L NaCl)逆境因子胁迫水稻 WRKY 基因的表达(图 2)。在所分析的 13 个水稻 WRKY 基因中，有 9 个 WRKY 基因的表达受高盐(250 mmol/L NaCl)胁迫的影响，而

另外 4 个 WRKY 基因(*OsW9*, 21, 24 和 30)的表达不受

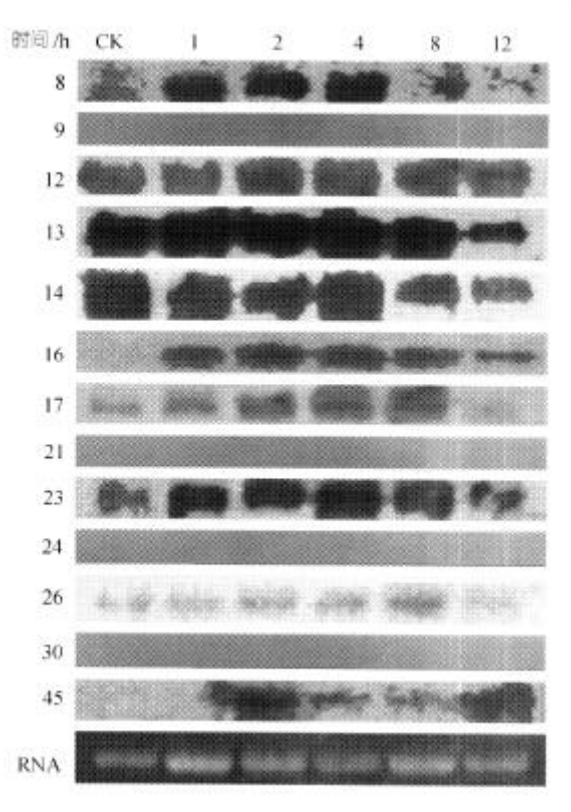


图 2 NaCl 诱导 13 个水稻 WRKY 基因表达分析

诱导. 随着 NaCl 胁迫时间的延长, 6 个 *WRKY* 基因 (*OsW8*, 12, 13, 16, 17, 23, 26 和 45) 的表达不断增强, 与对照比较, 其表达强度增强 2~4 倍, 但胁迫 8 或 12 h 后, 其表达随之减弱, 特别是 *OsW8*, 14 和 17 等基因的表达. 特别有意义的, *OsW45* 基因的表达在 2 和 12 h 时间段出现 2 个表达高峰(图 2). 相反, *OsW14* 基因的表达是随着 NaCl 胁迫时间的延长而减弱(图 2).

2.4 PEG 诱导 *WRKY* 基因表达分析

我们分析了 25% PEG 模拟干旱逆境环境诱导水稻 *WRKY* 基因表达的规律(图 3). 同样, 在所分析的 13 个水稻 *WRKY* 基因中, 有 10 个 *WRKY* 基因的表达受 PEG 胁迫的影响, 而另外 3 个 *WRKY* 基因(*OsW9*, 21 和 24)的表达不受 PEG 胁迫诱导. 在受 PEG 胁迫影响的 10 个 *WRKY* 基因中, *OsW8*, 13, 16, 23, 30 和 45 等 6 个 *WRKY* 基因的表达受 PEG 胁迫而瞬间分别增加约 2~4 倍. 随着胁迫时间的延长, *OsW13* 和 *OsW23* 基因的表达一直维持高水平; *OsW8*, 30 和 45 基因的表达水平随之减弱, 并恢复到对照水平; 而 *OsW16* 基因的表达持续增强(图 3). 相反, 与对照比较, *OsW12*, 14, 17 和 26 等 4 个 *WRKY* 基因表达受 PEG

胁迫而减弱, 说明 25% PEG 可能抑制此 4 个 *WRKY* 基因的表达, 特别是 *OsW14* 基因在 PEG 胁迫 12 h 后, 其表达几乎完全被抑制(图 3).

2.5 高温和低温诱导 *WRKY* 基因表达分析

高温(42℃)和低温(4℃)诱导 10 个 *WRKY* 基因表达谱分析结果见图 4 和 5. 在所分析的 13 个 *WRKY* 基因中, 有 9 个 *WRKY* 基因(*OsWRKY8*, 12, 13, 14, 17, 23 和 45)的表达受高温(42℃)和低温(4℃)逆境环境胁迫诱导的影响, 而另外 4 个 *WRKY* 基因(*OsW9*, 21, 24 和 30)不受上述逆境环境因子的胁迫(图 4 和 5). 如上所述, 在低温(4℃)诱导 2 h 的水稻叶片 cDNA 文库中, 9 个受逆境因子胁迫表达的 *WRKY* 基因克隆的拷贝数是另外 4 个的 200~300 倍, 这与 10 个 *WRKY* 基因表达谱结果相一致(图 5). 在高温(42℃)胁迫过程中, *OsW13*, 16, 17 和 23 等 4 个 *WRKY* 基因的表达受到激活, 并随着胁迫时间的延长而增强, 而 *OsW17* 基因的表达水平则恢复到对照水平(图 4). 而 *OsW8*, 12 和 14 等 3 个 *WRKY* 基因的表达受高温(42℃)逆境胁迫的影响很小, 与对照比较, 其表达水平维持不变(图 4). 在低温(4℃)胁迫过程中, 除 *OsW14*, 23 和 45 等 3 个 *WRKY* 基因的表达受到一定的激活, 大多数 *WRKY* 基

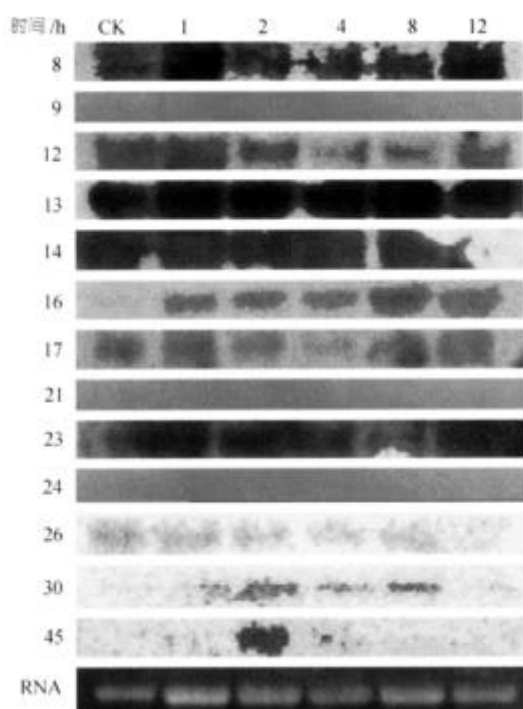


图 3 PEG 诱导 13 个水稻 *WRKY* 基因表达分析

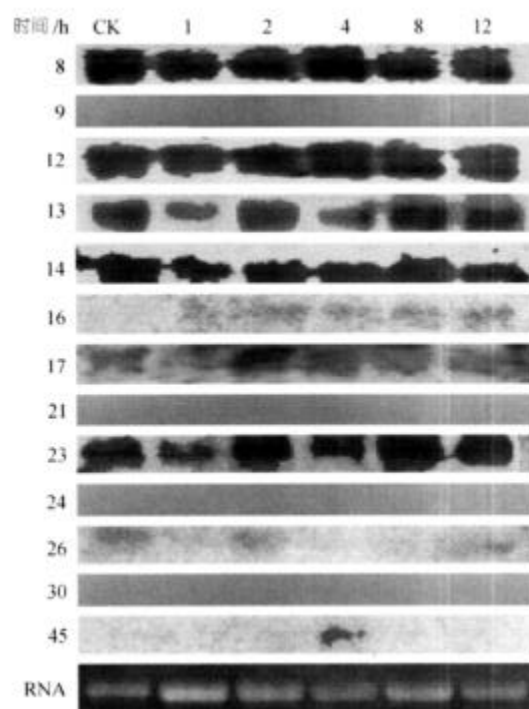


图 4 高温(42℃)诱导 13 个水稻 *WRKY* 基因表达分析

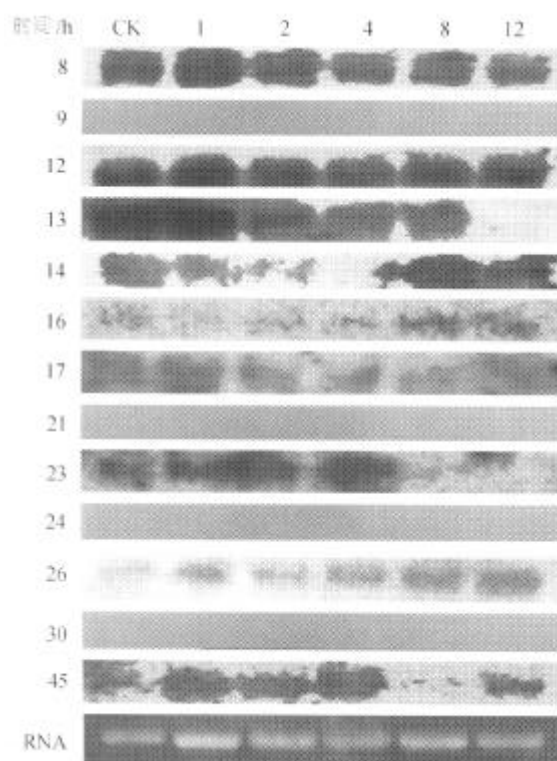


图5 低温(4℃)诱导13个水稻WRKY基因表达分析

因的表达受到抑制(图5)。在低温(4℃)胁迫的初期, *OsW14* 基因的表达受到抑制, 但随着胁迫时间的延长, 其表达水平显著增加(图5)。

3 讨论

在 Zhang 等人^[19]研究工作基础上, 利用 WRKY 蛋白质特有的保守氨基酸序列 WRKYGQK, 通过全面搜索水稻基因组, 鉴定了 24 个额外的 WRKY 基因, 并归纳了所有 97 个水稻 WRKY 基因的命名、分类、BAC 文库位点、cDNA 或 EST 克隆等信息(表 1, 图 1)。拟南芥 WRKY 家族拥有 73 个基因成员^[2], 而水稻 WRKY 家族则拥有 97 个成员基因(表 1, 图 1), 比拟南芥 WRKY 基因家族多约 24 个成员基因。有意义的是, 拟南芥 WRKY 基因家族绝大多数成员具有典型的 WRKYGQK 保守结构域, 只有 3 个成员基因(*AtW50*, *51* 和 *59* 基因)的 WRKY 保守结构域为 WRKYGKK。而在水稻 WRKY 基因家族中, 其成员基因除了拥有上述 2 种 WRKY 结构域外, 还出现 1 种新的 WRKY 结构域, 即保守序列为 WRKYGEK 的结构域。有趣的是, 拥有 WRKYGEK 结构域的 7 个成员蛋白质的锌指型结构均为 Cys₂HisCys 型, 而不是典型的 Cys₂His₂ 型。与拟南芥和其他植物的 WRKY 基因家族相比, 这种 WRKY 基因成员在数量和蛋白质保守域的变化可能

意味着水稻 WRKY 基因的分子生物学功能更加广泛和丰富。

转录调控因子 WRKY 基因家族是植物特有的超级基因家族, 通过特异地结合靶基因启动子区域的特异序列 TGACC(A/T)(W 盒)而调节靶基因的表达^[3]。目前的研究证实, WRKY 基因的主要生物学功能是通过参与植物不同保护信号转导途径的抗病反应, 从而调控植物抗病性状的建立^[4,5,7~10]。水稻是重要的农作物, 但有关水稻 WRKY 基因家族的基因功能分析的报道很少^[19]。从低温(4℃)诱导的水稻叶片 cDNA 文库中, 我们克隆获得 13 个转录调控因子 WRKY 基因, 并开展主要非生物逆境因子胁迫其基因表达的分析(图 2~5)。其中 10 个 WRKY 基因的表达受到 NaCl, PEG, 低温(4℃)和高温(42℃)等 4 种非生物逆境因子胁迫的影响(图 2~5)。虽然如此, 但 10 个 WRKY 基因的诱导表达模式不论在逆境因子种类还是在诱导时间上均存在着很大的差异(图 2~5), 如 *OsW13*, *16*, *17*, *23*, *26* 和 *30* 等 WRKY 基因受上述 2~3 种逆境因子的胁迫被激活, 而受 1~2 种因子的胁迫被抑制(图 2~5)。这种基因诱导表达模式的差异将体现于它们之间的生物学功能差异, 可能在水稻抵抗不同的非生物逆境因子胁迫或不同的抗逆境信号转导途径中发挥不同的生物学功能, 如拟南芥 WRKY 基因家族第 3 组 WRKY 基因成员(*AtW30*, *38*, *41*, *46*, *52*, *53*, *54*, *55*, *62*, *63*, *64*, *66*, *67* 和 *70*)受不同的病原菌诱导表达模式的差异, 反映了它们参与不同保护信号转导途径的抗病反应^[8]。另外, 这种基因诱导表达模式的差异还反映于 WRKY 蛋白质通过激活某一逆境因子介导的信号转导途径, 同时抑制另一逆境因子介导的信号转导途径而处于二条抗性信号转导途径的调控交叉点。比如拟南芥 WRKY70 蛋白质就是通过参与二条抗性信号转导途径的调控交叉点, 即通过激活水杨酸介导的抗病信号转导途径, 同时抑制茉莉酸介导的抗病信号转导途径, 从而调控拟南芥抗病反应的建立^[10]。

特别值得注意的是, 在受逆境因子胁迫影响的 10 个 WRKY 基因中, 只有 *OsW30* 基因的表达仅仅受 25% PEG 胁迫而诱导表达(图 2~5)。经 Blastp 程序搜索, *OsW30* 蛋白质与豆科植物 WRK(WRKY)蛋白质(GenBank 登录号: AF439274)之间的一致性和相似性分别为 38% 和 48%, 而豆科植物 WRK 基因在参与豆科植物抗旱性的建立方面具有重要的生物学功能^[17]。因此, *OsW30* 基因可能在水稻抵抗干旱逆境因子的信号转导途径建立和抗旱性状形成等方面发挥重要调控作用。另外, 虽然 *OsW16* 基因的表达均受 4 种非生

物逆境因子胁迫而诱导表达,但从表达水平上看,250 mmol/L NaCl 和 25% PEG 等 2 种逆境因子诱导作用非常显著,与对照相比,其表达水平增强 3~4 倍;而低温(4)和高温(42)诱导其表达水平仅仅增强 1~1.5 倍(图 2~5). 因此,我们认为, *OsW16* 基因的分子生物学功能可能主要体现在调控水稻抵抗盐害和干旱逆境因子胁迫等方面的生物学性状形成和相应的信号转导途径建立.

致谢 感谢云南农业大学林良斌教授提供水稻种子滇甸 8 号. 本工作为中国科学院“万种植物园”(批准号: WK2000-7)、国家自然科学基金(批准号: 30240032 和 30370803)、中国科学院“西部之光”计划、云南省自然科学基金(批准号: 2003C0342M)和中国科学院“百人计划”资助项目.

参 考 文 献

- Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 199~206
- Dong J, Chen C, Chen Z. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol*, 2002, 51: 21~37
- Yu D, Chen C, Chen Z. Evidence for an important role of WRKY DNA binding protein in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell*, 2001, 13: 1527~1540
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, et al. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 2002, 415: 977~983
- Chen C, Chen Z. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol*, 2002, 129: 706~716
- Hara K, Yagi M, Kusano T, et al. Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding. *Mol Gen Genet*, 2000, 263: 30~37
- Yoda H, Ogawa M, Yamaguchi Y, et al. Identification of early-responsive genes associated with the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a WRKY-type transcription factor in tobacco plants. *Mol Genet Genomics*, 2002, 267(2): 154~161
- Kalde M, Barth M, Somssich I E, et al. Members of the *Arabidopsis* WRKY Group transcriptional factors are part of different plant defense signaling pathways. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2003, 16(4): 295~305
- Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, et al. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2404~2409
- Li J, Brader G, Palva T. The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for Jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell*, 2004, 16: 319~331
- Lahaye T. The *Arabidopsis* RRS1-R disease resistance gene- uncovering the plant's nucleus as the new battlefield of plant defense? *Trends Plant Sci*, 2002, 7(10): 425~427
- Robatzek S, Somssich I. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Gene Dev*, 2002, 16: 1139~1149
- Hinderhofer K, Zentgraf U. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta*, 2001, 213(3): 469~473
- Johnson C S, Kolevski B, Smyth D R. TRANSPARENT TESTA GLABRA 2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell*, 2002, 14: 1359~1375
- Trognitz F, Manosalva P, Gysin R, et al. Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* $\times$ *dihaploid S. tuberosum* hybrids. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002, 15: 587~597
- Dellagi A, Helibronn J, Avrova A, et al. A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, 13(10): 1092~1101
- Pnueli L, Hallak-Herr E, Rozenberg M, et al. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant J*, 2002, 31: 319~330
- Sun C, Palmqvist S, Olsson H, et al. A Novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter. *Plant Cell*, 2003, 15: 2076~2092
- Zhang Z L, Xie Z, Zou X, et al. A Rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1500~1513
- Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTER W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res*, 1994, 22: 4673~4680
- Swofford D L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. 2002, Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem*, 1987, 163: 16~20
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold New York: Spring Harbor Laboratory Press, 1989

(2004-08-17 收稿, 2004-09-03 收修改稿)