

APETALA1 突变影响 WRKY 基因的基础表达

张利平^{1,2}, 余迪求^{1*}

(1 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 昆明 650223; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 拟南芥 *APETALA1* (*API*) 既是一个花分生组织特征基因又是一个花器官特征基因, 在花器官发育中控制花萼和花瓣的发育。通过 *GUS* 染色进一步证实 *API* 主要在茎尖、花萼、花瓣和花托的位置表达。启动子分析发现, *API* 启动子区包含了包括 W-box 在内的大量顺式作用元件, 暗示相关转录调控因子参与了对 *API* 的调控。21 个 *WRKY* 基因单突变后并不改变 *API* 在花中的表达, 但是 *API* 突变则增强了检测的 10 个 *WRKY* 基因中 7 个 *WRKY* 基因的表达, 暗示 *API* 参与了对 *WRKY* 基因的基础表达的调控。这个结果也暗示 *API* 可能通过控制花萼和花瓣的发育从而参与了对花的基础抗性。

关键词: *API*; W-box; *WRKY*; 基础表达; 基础抗性

中图分类号: Q 945, Q 75

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2010) 04-355-06

Mutation of *APETALA1* Affects the Basal Expression of *WRKY* Genes

ZHANG Li-Ping^{1,2}, YU Di-Qiu^{1*}

(1 *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;*

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The floral homeotic gene *APETALA1* (*API*) specifies floral meristem identity and sepal and petal identity in *Arabidopsis*. *GUS* staining showed that the expression of *API* mainly focus on shoot apex, sepal and petal, floral meristem, junction of siliques and pedicels. Sequence analysis showed that numerous cis-elements were found in the *API* promoter, including the W-box, which indicated the regulated expression of *API* by certain transcriptional factors. 21 independent *wrky* single mutants did not affect the expression of *API* in inflorescence, however, mutation of *API* enhanced the basal expression of seven *WRKY* genes among the 10 genes checked. This result implied that *API* may participate in the basal resistance of flower through controlling the development of both sepals and petals.

Key words: *API*; W-box; *WRKY*; Basal expression; Basal resistance

花是高等植物生活史中连接孢子体与配子体的纽带, 花的发育是高等植物发育过程中最引人瞩目的事件。植物成花调控的发生是由两个相互联系的阶段组成: 第一阶段是从营养分生组织转换为花序分生组织, 受外部和内部环境信号制约。第二个阶段是从花序分生组织转换为花分生组织, 再由花分生组织产生花器官, 此阶段不受

环境信号影响。

在拟南芥中, 花分生组织特征基因 *APETALA1* (*API*) 是开花转变以及花器官分化所必须的。*API* 基因是编码 MADS 的转录调控因子, 其最早出现在花原基刚刚从花序分生组织侧端发生时, 并在整个花原基中表达, 花器官原基形成后在内两轮的表达降低, 后期只在外两轮

* 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: ydq@xtbg.ac.cn

收稿日期: 2009-12-22, 2010-02-04 接受发表

作者简介: 张利平 (1979-) 女, 博士研究生, 主要从事植物基因功能分析研究。E-mail: zlp@xtbg.org.cn

中表达 (Mandel 等, 1992), 此表达模式是与其控制花分生组织特异性和花器官形态特征的功能相一致。API 突变抑制了花分生组织的形成, 使部分花变成花序状的特征; 并且导致花器官的花萼与花瓣的发育异常 (Bowman 等, 1993)。而过表达 API 基因足以使得花序分生组织转变成花, 尽管它并不是特化花分生组织发育必需的 (Mandel and Yanofsky, 1995)。API 在花分生组织中的表达还依赖于一些开花时间基因如 FT 和 FD, FT 作为一个开花的长距离信号, 其蛋白从叶片移动到茎顶端与 FD 相互作用来激活花分生组织类别基因 API 的表达 (Abe 等, 2005; Wigge 等, 2005)。

转录调控因子 WRKY 基因家族是植物特有的超级基因家族, 其编码的蛋白质含有高度保守的氨基酸序列 WRKYGQK 和 Cys₂ His₂ 或 Cys₂ HisCys 锌指型结构 (Dong 等, 2003; Eulgem 等, 2000)。WRKY 蛋白质通过特异性地结合靶基因启动子区域的特异序列 (T) TGACC (AT) 而调控相应基因的表达, 发挥其分子生物学功能 (Eulgem 等, 1999; Yu 等, 2001)。大量的研究证实 WRKY 转录调控因子在植物生长发育、物质代谢、耐逆等诸多方面发挥生物学功能 (Yu 等, 2006)。

本文以拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为材料, 利用 GUS 报告基因分析了 API 的表达模式, 分析了 API 的启动子上的顺式作用元件, 并结合 RT-PCR 和 Northern 杂交发现 22 个 WRKY 基因单突变不影响 API 的表达, 但 API 的突变影响了部分 WRKY 基因的表达。

1 材料和方法

1.1 实验材料

选用拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的生态型 Columbia (Col) 和 Landsberg erecta (Ler) 为实验材料。种子表面消毒后均匀散布在 1/2 MS 培养基上 (含 0.9% agar), 4℃ 春化 3 d, 转移到 22℃ 培养箱培养 5~7 d 后移栽到土中。收集 WT (Columbia) 和遗传背景为 Columbia 的各 wrky 突变体花序; WT (Columbia) 和遗传背景为 Columbia 的 ap1 突变体的花序 (ap1-12 和 ap1-13, 弱突变; ap1-11, 中突变), 同时收集了 WT (Landsberg erecta) 和以 Landsberg erecta 为遗传背景的 ap1-1 强突变体花序; 液氮冷冻并保存于 -80℃ 备用。

1.2 质粒构建与农杆菌转化

根据 NCBI 公布的 AT1G69120 序列设计用于 API 启动子克隆的引物, 并通过 PCR 方法从野生型 (Col) 拟南芥基因组 DNA 中扩增获得长约 1.7 kb 的 API 启动子序列; 然后将 API 启动子插入到载体 pJS131B 的 GUS 表达框之前, 经测序证实后进一步克隆到表达载体 pOCA28 上, 标记为 pAPI::GUS。

农杆菌转化按照 Clough and Bent (1998) 的花序浸染法操作。

1.3 GUS 染色

GUS 染色方法参考文献报道 (Molier 等, 1995)。用预冷的 90% 丙酮于冰上固定材料 20 min, 用 GUS Staining solution (without X-Gluc) 漂洗固定后的材料 3 次 (在冰上进行), 然后放入 GUS Staining solution (with X-Gluc) 中, 并于冰上避光抽真空 10 min, 最后于 37℃ 下放置 12 h。用 70% 酒精脱色后拍照。

1.4 Northern 杂交

RNA 提取采用 Trizol reagent (Invitrogen) 法。使用 1.5% 甲醛-MOPS 琼脂糖凝胶分离 RNA 后, 转移到尼龙膜上。杂交温度为 68℃; 杂交液选用 PerfectHyb™ Plus buffer (Sigma-Aldrich)。探针通过 klenow fragment (Takara) 进行 ³²P-dATP 标记。洗膜: 2×SSC 和 0.5% SDS, 1 次; 每次 10 min; 0.5×SSC 和 0.1% SDS, 2 次, 每次 20 min; 0.1×SSC 和 0.1% SDS, 1 次, 每次 20 min, 最后压片放射自显影。

1.5 RT-PCR

提取拟南芥野生型和各 wrky 突变体材料的 RNA, 并用 DNase I 处理, 用来进行 RT-PCR 实验。反转录总体积为 20 μl, 包含 1 μg 总 RNA, 每个反转录产物用水稀释 20 倍, 然后取 2 μl 用作 PCR 模板, 其它反转录产物 -80℃ 保存。ACTIN2 作为内标基因; PCR 循环数基于预实验, 选择适宜的次数; 每组 RT-PCR 重复 3 次以上。用于 RT-PCR 的引物为: API; 5'-GCACATCCG-CACTAGAAAAA-3' and 5'-CTTCTTGATACAGAC-CACCCA-3'; ACTIN2; 5'-TGTGCCAATCTACGA GGG-TTT-3' and 5'-TTTCCCCTCTGCTGTTGT-3'。

2 结果与分析

2.1 API 基因的表达模式

通过基因克隆和遗传操作技术获得了 pAPI::GUS 嵌合型基因表达载体。通过农杆菌介导法并经筛选获得了转基因植株。为了分析其表达谱, 我们首先获得 T₂ 代转基因植株, 并以此来进行后续的表达分析工作。GUS 染色分析显示 (图 1), API 启动子驱动的 GUS 主要在茎尖、花

萼、花瓣和花托的位置表达,这与已有的研究结果一致 (Mandel 等, 1992)。

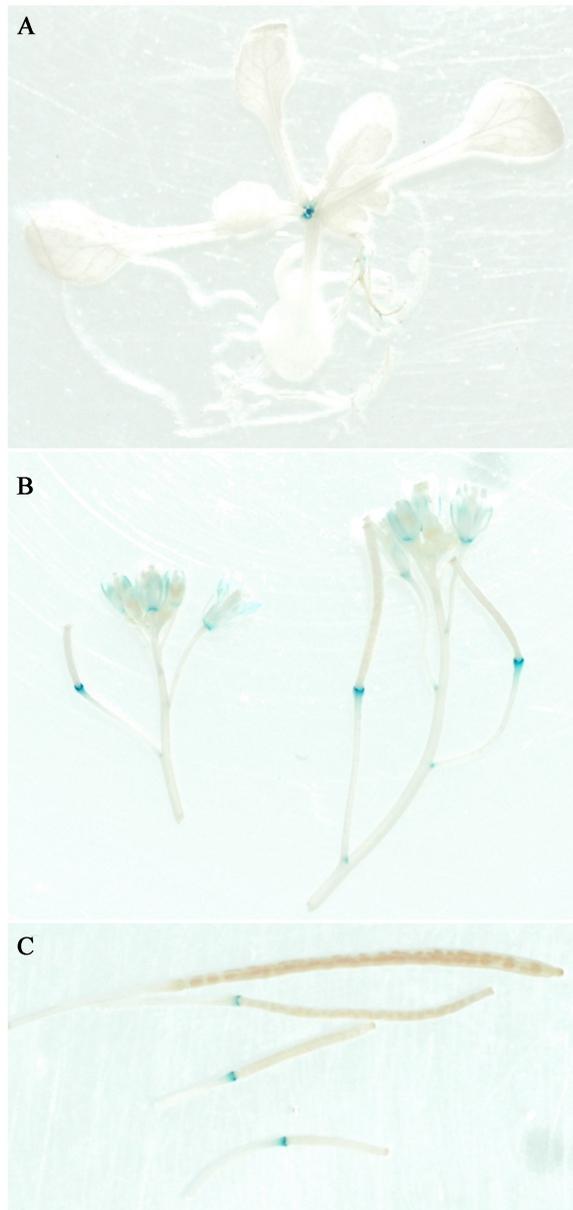


图1 *pAPI::GUS* 转基因植株的 GUS 染色

A. 15 天大的幼苗; B. 花序; C. 荚果

Fig. 1 GUS staining of *pAPI::GUS* transgenic plants

A. 15 d-old seedling; B. inflorescences; C. siliques

2.2 *API* 启动子分析

根据 *API* 的表达模式,我们发现 *API* 和一些 *WRKY* 基因的表达模式存在重叠现象 (GUS 染色, microarray analysis),同时通过查询 NCBI 数据库,我们也发现有大量的 *WRKY* 基因在

花序中有表达,这些结果暗示 *API* 和 *WRKY* 基因之间存在某种表达调控关系。真核生物的转录调控大多是通过顺式作用元件和反式作用因子复杂的相互作用而实现的,因此可以通过分析靶基因启动子上顺式作用元件来预测相关基因对靶基因的调控。因此我们首先通过 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 分析了 *API* 启动子上的顺式作用元件来寻找 *WRKY* 蛋白是否参与调控 *API* 基因的线索。如表 1 所示在 *API* 长约 1.7 kb 的启动子上存在若干顺式作用元件,如 G-box, C-box, LFY-bs, W-box 等。顺式作用元件的存在暗示了相关基因对 *API* 的调控。这里我们将重心放在了 W-box,通过序列分析发现,在 1.7 kb 的启动子上包含了 8 个完整的 TGAC 核心序列,其中 7 个为完整的 TTGAC 序列 (W 盒)。从理论上讲,靶基因启动子区域内的单个 W 盒序列就能有效满足 *WRKY* 蛋白质的调控所需 (Eulgem 等, 1999),而 *API* 启动子区域内存在如此多的 W 盒序列,其表达应该受到 *WRKY* 基因的调控。

2.3 *WRKY* 基因单突变不影响 *API* 基因的表达

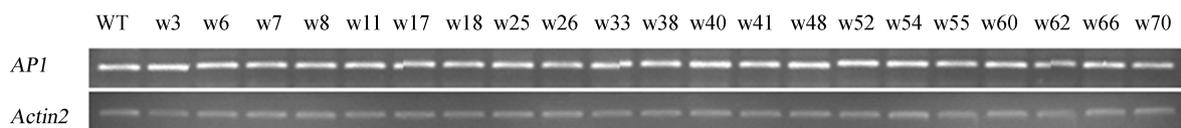
API 启动子区大量 W-box 的存在暗示在植物体内 *WRKY* 蛋白可能参与了对 *API* 基因的表达调控。因此为了确定某个特异 *WRKY* 蛋白是否参与了对 *API* 基因的表达调控,我们通过 RT-PCR 检测了 *API* 基因在 21 个 *WRKY* 基因单突变体的花序中的表达情况。如图 2 所示,与 WT 相比,在所有检测的 *WRKY* 基因单突变背景下花序中 *API* 的表达没有多大区别,这与我们观察到的所有 *WRKY* 基因单突变花序和野生型没有多大区别的结果是一致的。对于这种结果,我们认为主要与在 *WRKY* 基因中存在的功能上的冗余性有关,在 Zhang (2003) 的研究中也指出了由于 *WRKY* 基因之间存在冗余性,单个 *WRKY* 基因的突变很少会显示出表型上的改变。

2.4 *API* 突变影响了 *WRKY* 基因的基础表达

以上结果证实单个 *WRKY* 基因的突变不影响 *API* 的表达,这可能是由于 *WRKY* 蛋白之间功能上的冗余性造成的,并不能排除 *WRKY* 基因对 *API* 的调控,因此我们也检测了若干 *WRKY* 基因在 *ap1* 突变体背景下的表达。分别提取了野生型拟南芥花 (Col 生态型和 Ler 生态型),

表1 拟南芥 *API* 基因启动子的顺式作用元件Table 1 Cis-acting elements of the *API* gene promoter

调控序列名称 Name of regulatory sequences	核心序列 Core sequence	作用 Function
TATA-box	TATA	Core promoter
CAATBOX	CAAT	Tissue-specific response
-300ELEMENT	TGHAAARK	Enhancer and tissue-specific response
-10PEHVPSBD	TATTCT	Light response
G-box	CACGTG	Light response
GT1CONSENSUS	GRWAAW	Light response
SORLREP3AT	TGTATATAT	Light response
IBOXCORE	GATAA	Light response
INRNTPSADB	YTCANTYY	Light response
GATABOX	GATA	Light and tissue-specific response
EVENINGAT	AAAATATCT	Evening element
REALPHALGLHCB21	AACCAA	Phytochrome regulation
circadian	CAANNNNATC	Circadian control
CACTFTPPCA1	YACT	Carbon metabolism
DOFCOREZM	AAAG	Carbon metabolism
GTGA motif	GTGA	Pollen development
POLLEN1LELAT52	AGAAA	Pollen development
CURECORECR	GTAC	Copper response
SURECOREATSULTR11	GAGAC	Sulfur-responsive
CCAATBOX1	CCAAT	Heat response
CBFHV	RYCGAC	Cold response
LTRECOREATCOR15	CCGAC	Cold and ABA response
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	ABA response
EBOXBNNAPA	CANNTG	ABA response
PYRIMIDINEBOXHVEPB1	TTTTTTCC	GA and ABA response
GADOWNAT	ACGTGTC	GA response
GARE2OSREP1	TAACGTA	GA response
GAREAT	TAACAAR	GA response
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	CCTTTT	GA response
ERELEE4	AWTTCAAAA	ET response
T/GBOXATPIN2	AACGTG	JA response
NTBBF1ARROLB	ACTTTA	Auxin and tissue-specific response
ARR1AT	NGATT	Cytokinin response
MYB1AT	WAACCA	Dehydration response
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	Dehydration response
GT1GMSCAM4	GAAAAA	Pathogen and salt response
BIHD1OS	TGTCA	Defence response
ASF1MOTIFCAMV	TGACG	Biotic/abiotic response
W-box	TTGAC	Biotic/abiotic response, development

图2 *API* 基因在 *wrky* 突变体中的表达分析Fig. 2 Expression analysis of *API* in single *wrky* mutants

API was detected using RT-PCR after RNA was digested with DNase I.

This experiment was repeated for three times with similar results

ap1-1 (Ler), *ap1-11*, *ap1-12* 和 *ap1-13* (Col) 4 种 *ap1* 突变体花的总 RNA, 并通过 Northern 杂交检测了这 10 个 *WRKY* 基因在突变体花中的表达相对于野生型是否发生变化。如图 3 所示, 在这 10 个 *WRKY* 基因中有 7 个 *WRKY* 基因 (*WRKY 7. 11. 15. 17. 32. 51. 70*) 在各 *ap1* 突变体花中的表达相对于野生型中有较大幅度的提高, 同时越是强突变相应 *WRKY* 基因的表达就越强, 这在 Ler 生态型中表现得更加明显 (图 2)。因此 *AP1* 基因的突变确实影响了相关 *WRKY* 基因的表达, 暗示着 *AP1* 基因可能参与了 *WRKY* 基因的表达调控。

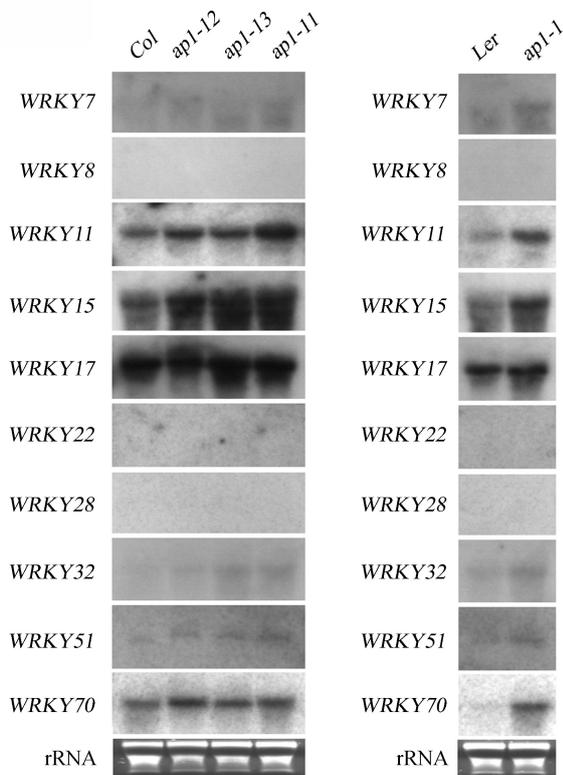


图 3 *WRKY* 基因在 *ap1* 突变体中的表达
(在检测的 10 个 *WRKY* 基因中, *WRKY7*, *WRKY11*, *WRKY15*, *WRKY17*, *WRKY32*, *WRKY51* 和 *WRKY70* 7 个 *WRKY* 基因在突变体中相对于野生型有较强表达)

Fig. 3 Expression of *WRKY* genes in *ap1* mutants
Mutation of *AP1* enhanced the basal expression of seven *WRKY* genes (*WRKY7*, *WRKY11*, *WRKY15*, *WRKY17*, *WRKY32*, *WRKY51* and *WRKY70*) among the 10 genes checked. Ethidium bromide staining of rRNA for the blot is displayed to demonstrate equal loading of RNA in each lane

3 讨论

AP1 作为重要的花调控发育基因, 研究其在转录水平上的作用具有重要的意义。通过报告基因 GUS 染色我们进一步证实了 *AP1* 的表达模式, 和前期的工作一致, *AP1* 主要在茎尖、花萼、花瓣和花托等部位表达, 这与 *AP1* 的功能是相符的。

虽然前期已有大量的工作证实 *AP1* 受到众多基因的调控, 但是经过启动子分析, 我们发现 *AP1* 很可能受到包括比如 *WRKY* 基因在内的众多其他转录调控因子的调控。前期的研究认为 *WRKY* 转录调控因子蛋白通过结合靶基因启动子上的核心或完整的 W 盒 (TTGAC or TTGACC/T) 而起到调控作用的, 并且认为核心序列是 TGAC 的序列就具备一定的 W 盒功能 (Ciolkowsk 等, 2008)。启动子序列分析发现, 在 *AP1* 基因 1.7 kb 的启动子区域内, 包含了 8 个含有核心或完整的 W 盒。因此, 我们认为 *WRKY* 蛋白很可能参与了对 *AP1* 的调控。同时通过对比 *AP1* 和部分 *WRKY* 基因的表达谱, 我们发现两者的表达模式存在重叠现象 (GUS 染色, microarray analysis), 这进一步暗示了 *WRKY* 蛋白对 *AP1* 的调控。

通过报告基因 *GUS* 接不同 W 盒突变的 *AP1* 启动子后的 *GUS* 活性分析发现, 单个 W 盒的突变对于 *AP1* 启动子的活性的改变不是很大, 而当 *AP1* 启动子上的 W 盒全突变以后, 发现 *AP1* 启动子的活性发生了很大改变 (待发表资料)。虽然已经证实单个 W 盒的存在对 *WRKY* 蛋白的结合调控就足够了, 但是根据我们的结果, 我们认为 W 盒之间很可能存在冗余性, 单个 W 盒的突变可以通过启动子其它位点 W 盒的互补而得到补充。同时通常突变体的分析对于理解调控网络具有重要的意义, 因此我们也尝试了 *AP1* 在不同 *WRKY* 基因突变体中的表达。我们共检测了 21 个 *WRKY* 基因突变体, 发现 *AP1* 在这些突变体中的表达没有多大改变, 这与在表型上单个 *WRKY* 突变体没有多少改变是一致的。对于这种结果, 我们认为这是由于 *WRKY* 基因间存在的功能上的冗余性造成的。在 Zhang (2003) 的研究中也指出由于 *WRKY* 之间存在冗余性, 单个 *WRKY* 基因的突变很少会显示出表型上的

改变。因此结合上述的结果,我们认为 *WRKY* 基因和 W-box 一样,都存在冗余性,这在一定程度上增加了我们鉴定 *WRKY* 基因功能的难度。这个问题可能在未来通过构建 *WRKY* 基因多突变上得到一些线索。

目前 *WRKY* 基因的功能研究主要在抗逆性特别是在生物逆境方面 (Yu 等, 2006), 而目前关于花生物逆境方面的研究甚少。花器官的缺失可能会影响植物花对生物逆境或非生物逆境的抗性, 所以我们认为 *API* 也可能在抗逆性方面起作用。在检测的 10 个 *WRKY* 基因中有 7 个 *WRKY* 基因在 *API* 各突变体花中的表达相对于野生型中有较大幅度的提高, 同时越是强突变相应 *WRKY* 基因的表达就越强, 这在 *Ler* 生态型中表现得更加明显 (图 3)。这些结果暗示着 *API* 基因可能参与对某些 *WRKY* 基因的表达调控。在这 7 个 *WRKY* 基因中, 已经证实 *WRKY7*, *WRKY11*, *WRKY17* 和 *WRKY70* 在生物逆境中起作用 (Kim 等, 2006; Li 等, 2004; Journot-Catalino 等, 2006), 因此这些 *WRKY* 基因表达的改变, 暗示 *API* 可能通过控制花萼和花瓣的发育从而在花抗性方面起到调控作用。

致谢 Zhixiang Chen 教授 (Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA) 赠送了 T-DNA 插入的 *wrky* 突变体。

〔参 考 文 献〕

- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto *et al.*, 2005. FD, a B-zip protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex [J]. *Science*, **309**: 1052—1056
- Bowman JL, Alvarez J, Weigel D *et al.*, 1993. Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes [J]. *Development*, **119**: 721—743
- Clough SJ, Bent AF, 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, **16**: 735—743
- Ciolkowski I, Wanke D, Birkenbihl RP *et al.*, 2008. Studies on DNA-binding selectivity of *WRKY* transcription factors lend structural clues into *WRKY*-domain function [J]. *Plant Molecular Biology*, **68**: 81—92
- Dong JX, Chen CH, Chen ZX, 2003. Expression profiles of the *Arabidopsis WRKY* gene superfamily during plant defense response [J]. *Plant Molecular Biology*, **51**: 21—37
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S *et al.*, 2000. The *WRKY* superfamily of plant transcription factors [J]. *Trends in Plant Science*, **5**: 199—206
- Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E *et al.*, 1999. Early nuclear events in plant defence signaling: rapid gene activation by *WRKY* transcription factors [J]. *The EMBO Journal*, **18**: 4689—4699
- Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D *et al.*, 2006. The transcription factors *WRKY11* and *WRKY17* act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Cell*, **18**: 3289—3302
- Kim KC, Fan B, Chen Z, 2006. Pathogen-induced *Arabidopsis WRKY7* is a Transcriptional repressor and enhances plant susceptibility to *Pseudomonas syringae* [J]. *Plant Physiology*, **142**: 1180—1192
- Li J, Brader G, Palva ET, 2004. The *WRKY70* transcription factor: A node of convergence for Jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense [J]. *The Plant Cell*, **16**: 319—331
- Mandel MA, Gustafson-Brown C, Savidge B *et al.*, 1992. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1* [J]. *Nature*, **360**: 273—277
- Mandel MA, Yanofsky MF, 1995. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, **377**: 522—524
- Molier P, Montoro P, Delarue M *et al.*, 1995. Promoterless *gusA* expression in a large number of *Arabidopsis thaliana* transformants obtained by the in planta infiltration method [J]. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Sciences de la vie*, **318**: 465—474
- Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE *et al.*, 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis* [J]. *Science*, **309**: 1056—1059
- Yu DQ, Chen CH, Chen ZX, 2001. Evidence for an important role of *WRKY* DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression [J]. *The Plant Cell*, **13**: 1527—1539
- Yu DQ (余迪求), Chen LG (陈利钢), Zhang LP (张利平), 2006. Transcription Factor *WRKY* Superfamily: Origin, Structure and Function [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **28**: 69—77
- Zhang JZ, 2003. Over-expression analysis of plant transcription factors [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**: 430—440