

拟南芥 VQ 基因家族响应抗性相关激素表达谱分析*

林渊源^{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: 近年来与 WRKY 转录因子相互作用的 VQ-motif 蛋白逐渐引起广泛关注。它是一类植物特异性蛋白, 目前在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中已鉴定到 34 个成员, 据其所编码氨基酸的序列相似性构建系统进化树, 这 34 个成员聚集成两大簇。实时定量荧光 PCR 分析表明在 SA (水杨酸), MeJA (茉莉酸甲酯), ACC (乙烯前体), ABA (脱落酸) 处理下 *AtVQ* 基因家族中有多个成员分别受 SA, JA, ET 高倍诱导, 部分成员受 SA, JA, ET 中两种激素诱导, 其中 *AtVQ3*, *AtVQ18*, *AtVQ23* 和 *AtVQ24* 同时受 SA, JA, ET 诱导, 仅 *AtVQ27* 受 ABA 诱导, 推测拟南芥 VQ 家族成员在抗病方面起作用。

关键词: 拟南芥; VQ 基因家族; 水杨酸; 茉莉酸甲酯; 乙烯; 脱落酸

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

文章编号: 2095-0845(2012)05-509-10

Expression Profiles of *Arabidopsis thaliana* VQ Gene Family in Defense-Related Hormones TreatmentsLIN Yuan-Yuan^{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: Several VQ proteins are recently identified as WRKY factors-interacting partners in *Arabidopsis* and involved in regulating physiological processes. Searching of genomic databases found that VQ gene family is specific to land plants and these VQ genes encode proteins characteristic of a conserved VQ-motif. It consists of 34 representatives in *Arabidopsis* and can be divided into two groups based on the similarity of the amino acid sequences. To understand the functions of *Arabidopsis* VQ proteins, we examined the expression profiles of *AtVQ* genes in various defense-related hormones treatments. qRT-PCR analysis revealed that a majority of them were differently regulated in response to salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA), or 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC). And some members are induced by two of these three hormones. Moreover, four members (*AtVQ3*, *AtVQ18*, *AtVQ23* and *AtVQ24*) are induced by SA, MeJA and ACC simultaneity. However, there is only one *AtVQ* gene (*AtVQ27*) is up-regulated after spraying of abscisic acid (ABA). These results suggest that *Arabidopsis* VQ genes may be involved in plant defense responses.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; VQ gene family; ABA; SA; JA; ET

VQ 蛋白是一类植物特异性蛋白, 其名称源于它们都有一个保守的 VQ-motif: FXh VQ ChTG (pfam05678), X 为任一氨基酸, h 为疏水性氨基酸 (Morikawa 等, 2002; Andreasson 等, 2005)。

在拟南芥、水稻 (*Oryza sativa* L.)、高粱 (*Sorghum vulgare*)、玉米 (*Zea mays* L.)、杨树 (*Populus* L.)、蓖麻 (*Ricinus communis* L.)、棉花 (*Gossypium* L.) 和葡萄 (*Vitis* L.) 等物种里

* 基金项目: 中国国家自然科学基金 (90817003)

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

收稿日期: 2012-03-13, 2012-05-21 接受发表

作者简介: 林渊源 (1987-) 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 植物分子生物学。E-mail: lafylin@163.com

都发现了 VQ 蛋白家族成员 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=pfam05678>)。目前在拟南芥中已经鉴定到 34 个 VQ 蛋白成员 (<http://www.arabidopsis.org>)，但仅有 5 个成员 (AT2G35230, AT2G41010, AT3G18690, AT3G56710, AT2G41180) 的功能有所研究。

VQ 蛋白成员参与调控植物的生长发育过程，如 IKU1 (AT2G35230)。IKU1 在中央细胞及胚乳中强烈表达，参与调控胚乳的发育进而影响种子的大小 (Garcia 等, 2003)。进一步研究证实 IKU1 能与 WRKY 转录因子 WRKY10 (MINI3) 相互作用，从而通过 IKU2-MINI3 途径来调节胚乳的早期发育 (Luo 等, 2005; Wang 等, 2010)。另外，VQ 蛋白成员参与调控非生物胁迫逆境，如 AtCaMBP25 (AT2G41010) 在拟南芥种子萌发和生长发育早期能够负调控渗透压胁迫。AtCaMBP25 作为钙调素结合蛋白，在脱水、低温、高盐等逆境条件下被强烈诱导表达，可能通过与钙调素的结合参与 Ca^{2+} 信号介导的抗逆途径 (Perruc 等, 2004)。此外，VQ 蛋白成员参与调控生物胁迫逆境，如 MKS1 (AT3G18690)，SIB1 (AT3G56710) 和 SIB2 (AT2G41180)。MKS1 蛋白能与磷酸化激酶 MPK4 及转录因子 WRKY25/WRKY33 相互作用形成三聚复合物；当植物受到病原菌刺激时，MKS1 被磷酸化激酶 MPK4 多磷酸化，使 WRKY33/WRKY25 从复合物中游离出来，进而结合到下游基因 *PAD3* 的启动子序列，调控其表达，最终调控植物病原菌抗性 (Andreasson 等, 2005; Qiu 等, 2008)。VQ 蛋白 SIB1 (AT3G56710) 和 SIB2 (AT2G41180) 也参与植物防卫反应，高表达 SIB1 能导致植物相应的抗性增强。SIB1 和 SIB2 能识别 WRKY 域激活 WRKY33 的表达进而调控植物病原菌抗性，同时又与 SIG1 (质体基因转录组的 RNA 聚合酶的重要组成部分) 相互作用，使防卫反应与质体功能相联系，但二者具体的相互关系及功能仍需进一步研究，同时 SIB1 还介导 SA 和 JA 抗病信号途径的交叉作用 (Morikawa 等, 2002; Xie 等, 2010; Lai 等, 2011)。有研究表明 VQ 蛋白参与植物的生长发育以及对抗各种胁迫过程，且 VQ 蛋白经常与 WRKY 转录因子相互作用来发挥功能。而 WRKY 转录因子广泛参与了植物生长发育过程以及抗逆反应过程，如

WRKY2 通过 ABA 信号途径参与种子的萌发和幼苗发育过程 (Jiang, 2009)；WRKY8 与拟南芥的基础抗性有关，介导了 SA/JA 抗病信号途径的交互作用 (Chen 和 Zhang, 2010)。这为我们探究 VQ 家族成员功能提供了一定的线索。

植物激素在植物的生长发育以及应对各种胁迫过程当中发挥重要作用，现代农业中，经常外施各种激素来提高植物抗不利环境的能力，提高产量、催熟等。除了传统的五大植物激素 (生长素，赤霉素，细胞分裂素，脱落酸，乙烯) 外，近年来发现了不少新兴植物激素如水杨酸，茉莉酸等，它们在参与植物生长发育和抗逆过程中作用重大，其信号网络已有研究，尤其是水杨酸、茉莉酸、乙烯和脱落酸已被认为是重要的抗性相关激素。SA 是一种内源信号分子，是诱发系统获得抗性 (systemic acquired resistance, SAR) (Ross 等, 1961) 产生的关键信号分子之一 (Genoud 等, 2001)。JA 作为内源信号分子，可启动植物体内抗病防御基因的表达，从而调控植物的防御反应 (Penninckx 等, 1996)。ET 是植物体内的一种气态激素，ET 与植物抗病及抗逆性的关系近年来也得到了广泛的关注 (Xu 等, 1994)。JA 和 ET 还是诱发系统抗性 (induced systemic resistance, ISR) 产生的关键信号分子 (Clarke 等, 2000)。ABA 功能广泛，能调节种子和胚的发育 (Cheng 等, 2002)，参与种子萌发和萌发后幼苗生长过程 (Lopez-Molina 等, 2001; Jiang, 2009) 以及促进休眠、气孔关闭和提高抗逆能力 (Schroeder 等, 2001)。

植物激素参与植物生长发育和抗逆过程的分子机制近年来已有研究，对 SA, JA, ET 介导的抗病信号途径和 ABA 介导的种子休眠、萌发及抗旱途径的分子机制也越来越清晰，且不同植物激素的作用通常相互渗透影响，形成复杂的调控网络。例如，SA 依赖型反应路径与 JA 依赖型反应路径间通常相互拮抗，有时也发生协同作用 (Takahashi 等, 2004; Leon-Reyes 等, 2010)；ET 可中和 SA 对 JA 的拮抗作用 (Leon-Reyes 等, 2009)；ET/SA 信号间存在广泛的协同互作 (Leon-Reyes 等, 2010)。现有研究可能只窥探了其中很小的一部分，因此各激素参与各种重要生命过程的具体机制还有待深入研究。本文通过外施 SA, JA, ET 和 ABA 4 种激素后检测 *AtVQ* 基因家族成员的表达情况来初步

预测 VQ 蛋白的功能, 并为完善各种激素介导的信号途径的分子机理提供一定的参考。

1 材料和方法

1.1 植物材料

选用拟南芥哥伦比亚生态型 (Col-0) 为实验材料, 种子表面消毒后均匀散布在 1/2MS 培养基上 (含 0.6% Agar), 4 °C 春化 3 d, 转移到 22 °C 温室培养 7 d 后移栽到土中, 光照 14 h, 黑暗 10 h, 湿度 40%。移栽苗生长 4 周后进行处理, 分别喷施 0.2 mmol·L⁻¹ 的 SA, 0.1 mmol·L⁻¹ 的 JA, 0.1 mmol·L⁻¹ 的 ACC, 0.1 mmol·L⁻¹ 的 ABA, 在 0 和 8 h 两个时间点取材备用。

1.2 RNA 的提取及 cDNA 的合成

取拟南芥地上部分采用 Trizol 法 (Logemann 等, 1987) 提取总 RNA。进行 DNA 消化后, 加 Oligo (dT)₁₈ primer 1 μL, 5×buffer 4 μL, RNA 酶抑制剂 1 μL, 10 mmol·L⁻¹ dNTPMix 2 μL, 逆转录酶 1 μL 组成 20 μL 体系, 按照 Fermentas 公司生产的反转录试剂盒的操作步骤进行反转录。反应条件为 65 °C 5 min, 42 °C 60 min, 70 °C 10 min。cDNA 合成后以 cDNA 为模板进行 actin 管家基因的 PCR 扩增, 判断是否逆转录成功, 并把其表达水平调为一致后备用, 以检测目的基因表达情况。

1.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

检测目的基因表达量使用 Roche Light Cycler 480 real-time PCR 仪, SYBR green I 染色法进行相对定量。反应体系为: ddH₂O 9.2 μL, 引物-1 0.4 μL, 引物-2 0.4 μL, SYBR green I 10 μL。拟南芥 VQ 成员相应的基因号和定量引物见附表 1。

2 结果分析

2.1 拟南芥 VQ 基因家族系统进化树的建立

从基因数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) 中查得 VQ 基因广泛存在于陆生植物中, 从苔藓、蕨类、裸子植物到被子植物中都已经鉴定到 VQ 基因, 例如小立碗藓 (*Physcomitrella patens*) 中已鉴定 24 个成员, 江南卷柏 (*Selaginella moellendorffii*) 中已鉴定 14 个成员, 水稻中已鉴定 32 个成员, 玉米中已鉴定 37 个成员。目前在拟南芥中已经鉴定到 34 个成员 (<http://www.arabidopsis.org>)。根据在染色体上的排列位置我们分别为这 34 个基因编号, 具体编号与基因号的对应关系见附表 1。34 个拟南芥 VQ 基因中除 AtVQ1 外都只含一个外显子, 而且所编码的蛋白长度一般都小于 300 个氨基酸。比较 34 个

成员所编码的氨基酸序列, 用 MEGA4 构建了拟南芥 VQ 家族系统进化树 (图 1)。这 34 个成员聚集成 2 大簇, 且有多成员两两相聚, 如 AtVQ7 和 AtVQ34, AtVQ15 和 AtVQ24, AtVQ16 和 AtVQ23 等, 两成员之间序列相似性很高。已有文献表明 AtVQ23 即 SIB1 (AT3G56710) 和 AtVQ16 即 SIB2 (AT2G41180) 能识别 WRKY 域激活 WRKY33 的表达进而调控植物病原菌抗性 (Morikawa 等, 2002; Xie 等, 2010; Lai 等, 2011)。这就暗示紧密相聚的成员在功能上可能也具相似性, 为我们进一步探究拟南芥 VQ 基因家族成员功能提供便利。

2.2 拟南芥 VQ 基因家族响应抗性相关激素表达谱分析

植物激素在植物的生长发育以及应对外界逆境时作用重大, 它们通常作为信号分子来广泛参与植物生命过程, 研究激素相关反应成为了解生命奥秘的重要手段。SA, JA, ET, ABA 作为诱发植物抗逆反应的信号分子也引起了广泛关注 (Hirayama 和 Shinozaki, 2007; Leon-Reyes 等, 2010)。为了探究 VQ 蛋白的功能, 我们进行了拟南芥 VQ 基因家族成员响应抗性相关激素信号 (SA, JA, ET, ABA) 的表达谱分析, 实验结果经过 3 次实验重复验证。

2.2.1 AtVQ 家族成员响应 SA 的表达谱分析

0.2 mmol·L⁻¹ 的 SA 处理 8 h 后, 相对于未处理 (0 h) 的植株, 34 个成员中有 12 个 (AtVQ3, AtVQ8, AtVQ10, AtVQ12, AtVQ18, AtVQ19, AtVQ20, AtVQ21, AtVQ22, AtVQ23, AtVQ24, AtVQ28) 成员表达上调, 其中 AtVQ10 表达上调达 65.28 倍, AtVQ12, AtVQ21, AtVQ23 的表达上调也有 10 倍以上 (图 2)。另外 22 个成员处理后表达差异不明显 (附图 1)。SA 是一种内源信号分子, 在植物抵抗病害、干旱、盐渍、高温、冷害、重金属、臭氧和紫外辐射等逆境方面起作用 (Hayat 等, 2010), 目前 SA 在抗病方面的研究比较广泛, 其抗病信号网络分子机制也已比较清晰 (Johnson 等, 2003)。AtVQ 家族中有多个成员受 SA 诱导表达, 暗示这些成员可能也在抗病方面起作用, 这就为我们探索 AtVQ 基因家族功能提供一定线索, 可筛选出受 SA 强烈诱导的成员 (AtVQ10, AtVQ12, AtVQ21, AtVQ23) 探究其在 SA 信号途径里的功能。

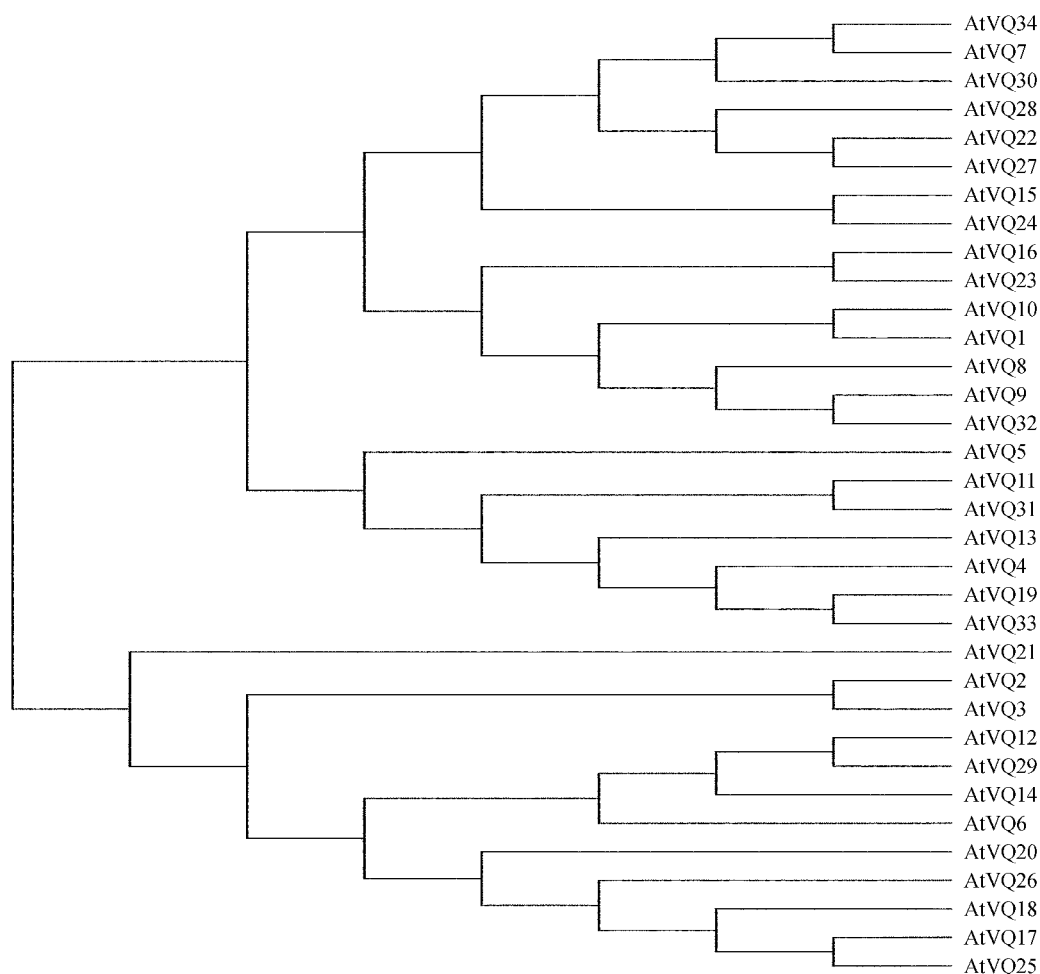
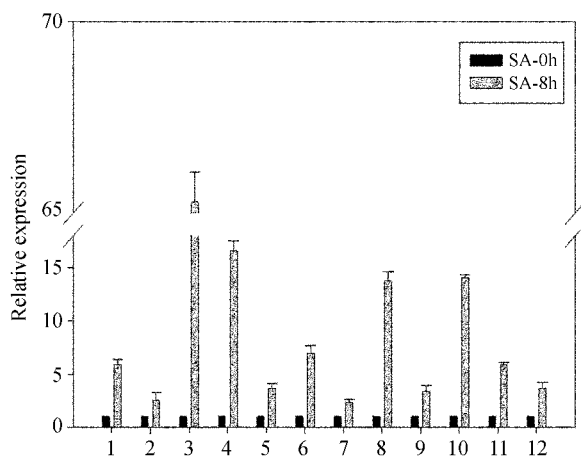


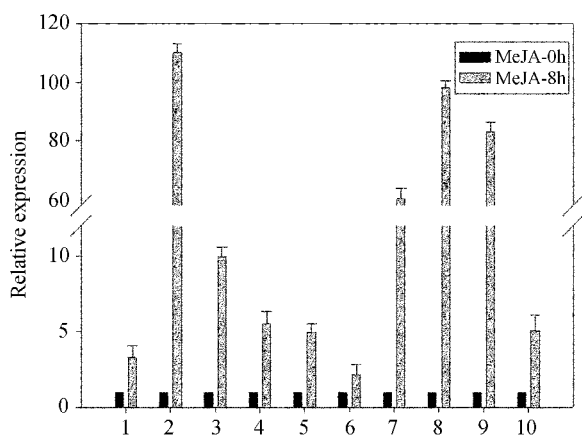
图1 拟南芥 VQ 蛋白家族系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the VQ proteins from *Arabidopsis*图2 受 SA 诱导的 *AtVQ* 成员表达谱Fig. 2 Expression profiles of SA induced *AtVQ* genes

1. *AtVQ3*; 2. *AtVQ8*; 3. *AtVQ10*; 4. *AtVQ12*; 5. *AtVQ18*;
6. *AtVQ19*; 7. *AtVQ20*; 8. *AtVQ21*; 9. *AtVQ22*;
10. *AtVQ23*; 11. *AtVQ24*; 12. *AtVQ28*

2.2.2 *AtVQ* 家族成员响应 JA 的表达谱分析

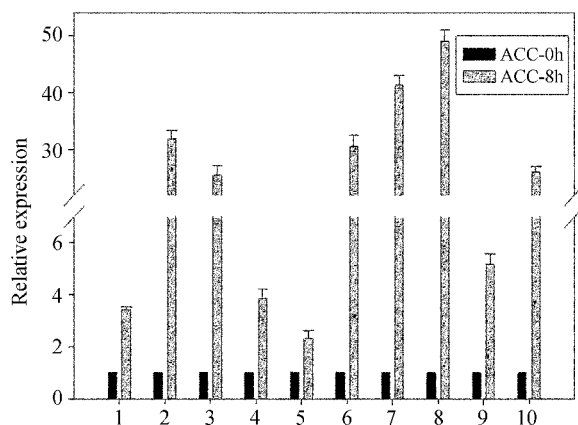
JA 是植物体内起整体性调控作用的植物生长调节物质,一方面与植物的生长发育相关,另一方面作为内源信号分子参与植物在机械伤害、病虫害、干旱、盐胁迫、低温等条件下的抗逆反应 (Cheong 和 Choi, 2003)。外施 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MeJA 8 h 后, 34 个成员中有 *AtVQ2*, *AtVQ3*, *AtVQ5*, *AtVQ18*, *AtVQ20*, *AtVQ22*, *AtVQ23*, *AtVQ24*, *AtVQ26*, *AtVQ29* 较对照表达上调, 其中, 最显著的是 *AtVQ3* 诱导了 100 倍以上, *AtVQ23*, *AtVQ24* 和 *AtVQ26* 诱导了 60 倍以上 (图 3)。其余 24 个成员处理后表达差异不显著 (附图 2)。我们的结果表明 *AtVQ* 家族有 10 个成员表达差异显著, 其在 JA 信号网络中的作用不容忽视, 尤其是 *AtVQ3*, *AtVQ23*, *AtVQ24* 和 *AtVQ26* 可作为重点研究对象。

图3 受JA诱导的*AtVQ*成员表达谱Fig. 3 Expression profiles of JA induced *AtVQ* genes

1. *AtVQ2*; 2. *AtVQ3*; 3. *AtVQ5*; 4. *AtVQ18*; 5. *AtVQ20*;
6. *AtVQ22*; 7. *AtVQ23*; 8. *AtVQ24*; 9. *AtVQ26*; 10. *AtVQ29*

2.2.3 *AtVQ* 家族成员响应 ET 的表达谱分析

ET 是研究最早的植物激素之一, 与植物生长发育过程中许多生理效应有关。近年来, 乙烯与植物抗病及抗逆性的关系得到了广泛的关注, 乙烯信号转导途径中的多个基因已被克隆并定性, 许多植物防卫基因受乙烯诱导表达调控的机制已揭示和验证 (Xu 等, 1994; Kendrick 和 Chang, 2008)。我们喷施 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ET 前体 ACC 8 h 后, 检测 34 个成员的表达变化情况, 结果表明: 相对于未处理 (0 h) 的植株, *AtVQ3*, *AtVQ5*, *AtVQ18*, *AtVQ23*, *AtVQ24*, *AtVQ29* 这 6 个基因的表达上调了 20 倍以上, 而

图4 受ACC诱导的*AtVQ*成员表达谱Fig. 4 Expression profiles of ACC induced *AtVQ* genes

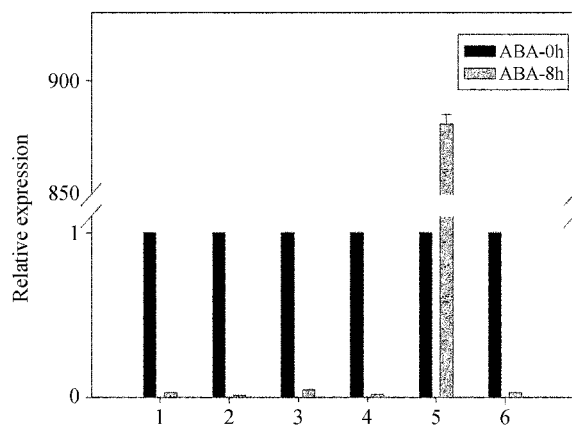
1. *AtVQ2*; 2. *AtVQ3*; 3. *AtVQ5*; 4. *AtVQ13*; 5. *AtVQ17*;
6. *AtVQ18*; 7. *AtVQ23*; 8. *AtVQ24*; 9. *AtVQ28*; 10. *AtVQ29*

AtVQ2, *AtVQ13*, *AtVQ17*, *AtVQ28* 的表达跟对照相比也明显被上调 (图4)。另外 24 个成员处理后表达差异微小 (附图3)。ACC 处理下某些 *AtVQ* 成员反应明显, 共有 10 个成员受 ACC 多倍诱导, 这也为我们进一步探索这些 *AtVQ* 基因家族成员功能提供依据。

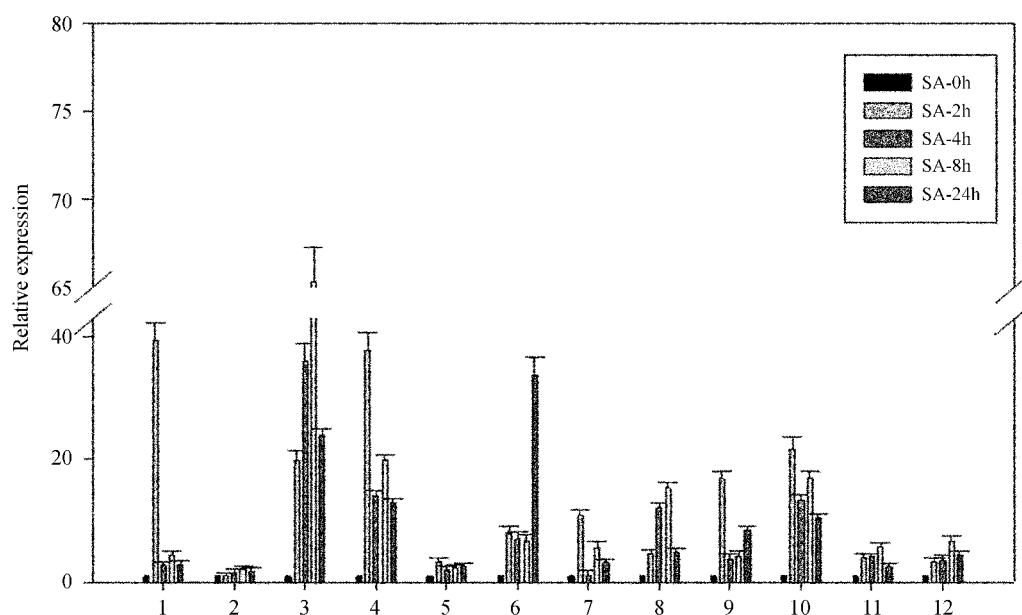
2.2.4 *AtVQ* 家族成员响应 ABA 的表达谱分析

外施 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ABA 8 h 后, 相对于未处理 (0 h) 的植株, 34 个成员中只有 *AtVQ27* 表达上调了 881 倍, 而 *AtVQ13*, *AtVQ18*, *AtVQ20*, *AtVQ26*, *AtVQ29* 的表达被抑制了 100 多倍 (图5); 另外的 28 个成员表达差异微小 (附图4)。ABA 是植物体内最重要的激素之一, 广泛参与调控植物的生长和发育过程, 在植物对抗外界各种不利环境, 如, 干旱、高盐、低温和病虫害等过程中也发挥着非常关键的调控作用 (Finkelstein 等, 2002; Shinozaki 等, 2003)。34 个成员中只有 *AtVQ27* 表达量显著上升, 推测 *AtVQ27* 可能在 ABA 信号途径中起作用。而其他 *AtVQ* 成员的表达差异不明显可能是由于其在 ABA 信号调控网络中的作用可能本来就不明显, 也可能是由于实验设置不完善, 比如浓度及诱导时间不合理等。

为验证实验结果的可靠性, 也为把握激素处理下各成员表达变化的整体波动趋势, 选择响应 SA 信号的成员检测 WT 中 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SA 处理后 0, 2, 4, 8, 24 h 其表达量。结果表明它们的表达变化趋势与先前实验一致 (图6), 且一半

图5 ABA处理后表达变化明显的*AtVQ*成员表达谱Fig. 5 Expression profiles of varied *AtVQ* genes after ABA treatment

1. *AtVQ13*; 2. *AtVQ18*; 3. *AtVQ20*; 4. *AtVQ26*;
5. *AtVQ27*; 6. *AtVQ29*

图6 受SA诱导的*AtVQ*成员表达谱Fig. 6 Expression profiles of SA induced *AtVQ* genes

1. *AtVQ3*; 2. *AtVQ8*; 3. *AtVQ10*; 4. *AtVQ12*; 5. *AtVQ18*; 6. *AtVQ19*; 7. *AtVQ20*; 8. *AtVQ21*;
9. *AtVQ22*; 10. *AtVQ23*; 11. *AtVQ24*; 12. *AtVQ28*

成员 (*AtVQ3*, *AtVQ12*, *AtVQ18*, *AtVQ20*, *AtVQ22*, *AtVQ23*) 能迅速响应 SA 信号, 在 2 小时时表达量最高, 以后再趋于稳定的诱导表达; *AtVQ8*, *AtVQ10*, *AtVQ21*, *AtVQ24*, *AtVQ28* 这 5 个成员的表达变化趋势相同, 在 8 h 内逐渐升高, 8 h 后有一定程度的下降; 而 *AtVQ19* 先趋于较稳定的诱导表达, 处理 24 h 后才达到最高, 可能 *AtVQ19* 较慢响应 SA 信号。说明我们的研究能为探索拟南芥 VQ 基因家族成员功能提供一定的参考。

3 讨论

广泛存在于陆生植物中的 VQ 蛋白是一类植物特异性蛋白, 具有一个保守的 VQ-motif: FXhVQ ChTG (pfam05678), X 为任一氨基酸, h 为疏水性氨基酸 (Morikawa 等, 2002; Andreasson 等, 2005)。据目前在拟南芥中已经鉴定的 34 个成员的氨基酸序列, 用 MEGA4 构建了拟南芥 VQ 家族系统进化树 (图 1)。这 34 个成员聚集成 2 大簇, 且有多成员两两相聚, 其两者间序列相似性很高。已有文献表明 *AtVQ23* 即 SIB1 和 *AtVQ16* 即 SIB2 能识别 WRKY 域激活 WRKY33 的表达进而调控植物病原菌抗性 (Morikawa 等,

2002; Xie 等, 2010; Lai 等, 2011)。而我们的表达谱分析结果中也存在两两相聚的成员趋向响应相同的激素信号的现象 (*AtVQ2* 和 *AtVQ3* 都响应 JA 和 ET 信号), 这就暗示紧密相聚的成员在功能上可能也具相似性, 为我们进一步探究拟南芥 VQ 基因家族成员功能提供便利。

目前 34 个 *AtVQ* 成员中有 5 个 *AtVQ* 基因 (*AT2G35230*, *AT3G18690*, *AT2G41010*, *AT3G56710* 和 *AT2G41180*) 的功能已有所研究。研究表明某些 *AtVQ* 家族成员与 WRKY 因子相互作用形成蛋白复合物, 而植物特异的转录因子 WRKY 家族蛋白广泛参与植物抗逆反应 (Chen 等, 2010; Pandey 和 Somssich, 2009), 暗示 *AtVQ* 家族成员可能也参与了抗逆反应。植物激素不仅在植物的生长发育过程中起重要作用, 在应对外界逆境时也使植物能快速响应外界环境变化以更好的生存。近年来有关植物激素响应外界逆境的研究越来越多, 如对 SA, JA, ET, ABA 发挥其功能的信号通路和分子机制都有一定研究, 尤其是依赖 SA, JA, ET 信号途径的抗生物胁迫反应, 其信号网络分子机制比较明晰。已得出抗病信号途径的主要成员, 各信号的合成、感受、传导、引发

的防御反应基因以及作用于关键成员的一些调控转录因子也都有一定研究, 如 *SID2*, *COI1*, *EIN2*, *NPR1*, *PR1*, *PDF1.2*, *WRKY8* 等。但已有的成果远远不够清晰描述植物具体的抗病分子机制, 至今还没找到直接调控 JA 积累的基因; JA、ET 具体通过什么路径引起下游防御基因的表达等, 至于调控这些关键基因表达的转录因子也需进一步研究。

我们的研究表明拟南芥 VQ 基因家族中有 12 个成员 (*AtVQ3*, *AtVQ8*, *AtVQ10*, *AtVQ12*, *AtVQ18*, *AtVQ19*, *AtVQ20*, *AtVQ21*, *AtVQ22*, *AtVQ23*, *AtVQ24*, *AtVQ28*) 受 SA 诱导表达, 10 个成员 (*AtVQ2*, *AtVQ3*, *AtVQ5*, *AtVQ18*, *AtVQ20*, *AtVQ22*, *AtVQ23*, *AtVQ24*, *AtVQ26*, *AtVQ29*) 受 JA 诱导, 10 个成员 (*AtVQ2*, *AtVQ3*, *AtVQ5*, *AtVQ13*, *AtVQ17*, *AtVQ18*, *AtVQ23*, *AtVQ24*, *AtVQ28*, *AtVQ29*) 受 ACC 诱导。这说明拟南芥 VQ 基因家族中有多个成员响应植物激素信号, 有的成员还不止响应一种激素的刺激, 它们可能参与了相应的激素信号途径, *AtVQ* 家族中可能有多个成员位于 SA, JA, ET 抗病信号途径。Xie 等 (2010) 和 Lai 等 (2011) 的研究表明 *AtVQ23* 即 SIB1 可能介导 SA 和 JA 抗病信号途径的交叉作用, 而我们的结果中 *AtVQ23* 受 SA 诱导上调 14 倍, JA 诱导上调 60 倍, 受 ACC 诱导上调 41 倍, 推测其也可能与 ACC 信号介导的交互作用有关。越来越多的证据表明依赖于 SA、JA 和 ET 的防御途径的成员能够互相影响: SA 依赖型反应路径与 JA 依赖型反应路径间通常相互拮抗, 有时也发生协同作用 (Takahashi 等, 2004; Leon-Reyes 等, 2010)。SA, JA 和 ET 信号途径广泛的交互作用在我们的研究中也得到印证。我们的研究表明有多个成员分别单独只受 SA 或 JA 的诱导, 也有部分成员 (*AtVQ3*, *AtVQ18*, *AtVQ20*, *AtVQ22*, *AtVQ23*, *AtVQ24*) 同时受 SA 和 JA 的诱导 (图 2, 3), 暗示了其拮抗和协同作用的可能。多数情况下, JA/ET 信号路径之间相互作用是协同的 (Shinshi 和 Hideaki, 2008)。我们的研究表明 34 个基因中分别有 10 个受 JA 和 ACC 诱导 (图 3, 4), 而受这两种激素同时诱导的基因竟然高达 7 个 (*AtVQ2*, *AtVQ3*, *AtVQ5*, *AtVQ18*, *AtVQ23*, *AtVQ24*, *AtVQ29*),

这就侧面验证了其广泛的协同作用。ET/SA 信号间也存在广泛的协同互作 (Leon-Reyes 等, 2010), *AtVQ3*, *AtVQ18*, *AtVQ23* 和 *AtVQ24* 同时受 SA, JA, ET 诱导, 这更印证了各信号途径的交互作用。这就为我们进一步探索 *AtVQ* 基因功能提供依据, 也对进一步丰富和完善 SA, JA, ET 信号调控网络意义重大。

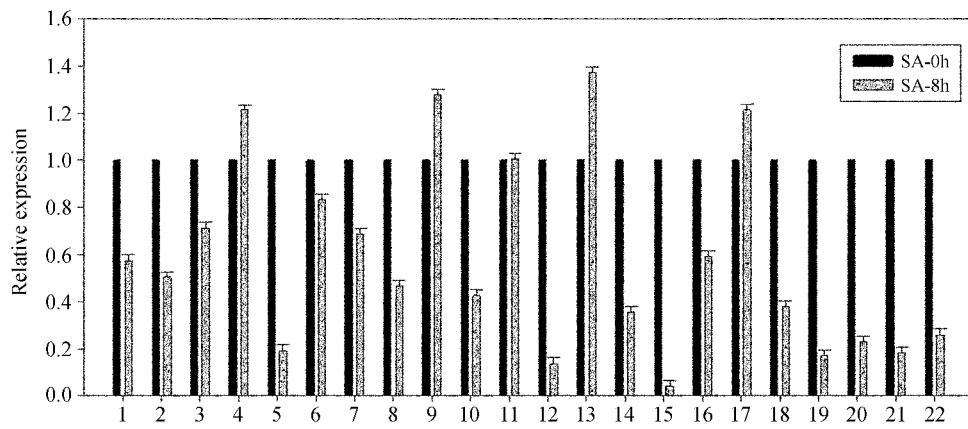
ABA 作为一种植物激素, 在植物生物胁迫和非生物胁迫的互作关系中都发挥广泛作用。Perruc 等 (2004) 的研究已表明 *AtVQ15* 能参与调控非生物胁迫逆境, 在我们的实验中 *AtVQ15* 不受 ABA 诱导, 也就从侧面验证了 Perruc 等的研究, 即 *AtVQ15* 并不是通过 ABA 介导的抗逆途径来参与调控非生物胁迫逆境, 而是可能参与到 Ca^{2+} 信号介导的抗逆途径。我们外施 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ABA 8 小时后发现 34 个成员中只有 *AtVQ27* 表达量显著上升, 这可能是由于其在 ABA 信号调控网络中的作用可能本来就不明显, 也可能是由于实验设置不完善, 比如浓度及诱导时间不合理使得表达差异不能反映。而 *AtVQ27* 受 ABA 强烈诱导暗示其可能在 ABA 信号途径中起作用。

我们的研究表明 *AtVQ* 基因强烈响应抗性相关激素信号, 有多个成员在 SA, JA, ET 作用下反应明显, 可能丰富了 SA, JA, ET 抗病信号网络。*AtVQ* 基因在 ABA 信号途径中也可能有作用。但我们的研究只提供了探索 *AtVQ* 基因功能的有限线索, 其具体分子机制需进一步研究, 在其它方面的功能也有待进一步挖掘。

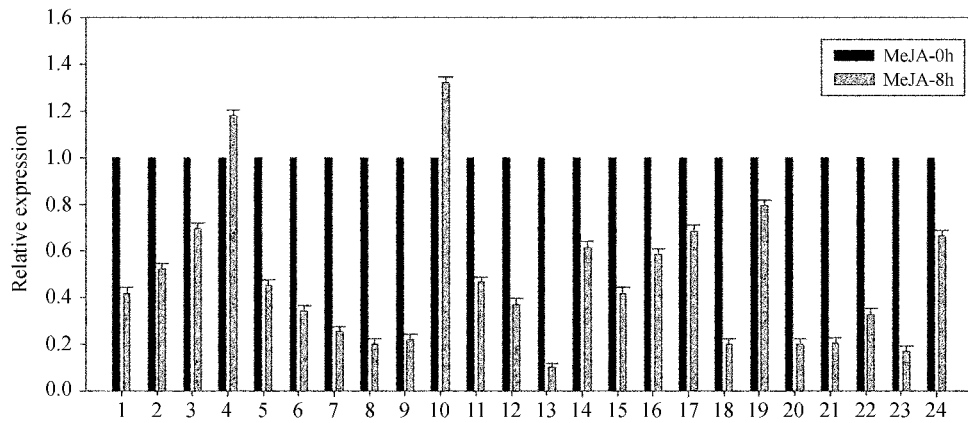
(参 考 文 献)

- Andreasson ET, Jenkins J, Brodersen P *et al.*, 2005. The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses [J]. *European Molecular Biology Organization Journal*, **24**: 2579—2589
- Chen LG, Zhang LP, Yu DQ, 2010. Wounding-induced WRKY8 is involved in basal defense in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **23** (5): 558—565
- Cheng WH, Endo A, Zhou L *et al.*, 2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions [J]. *The Plant Cell*, **14**: 2723—2743
- Cheong JJ, Choi YD, 2003. Methyl jasmonate as vital substance in plants [J]. *Trends in Genetics*, **19** (7): 409—413

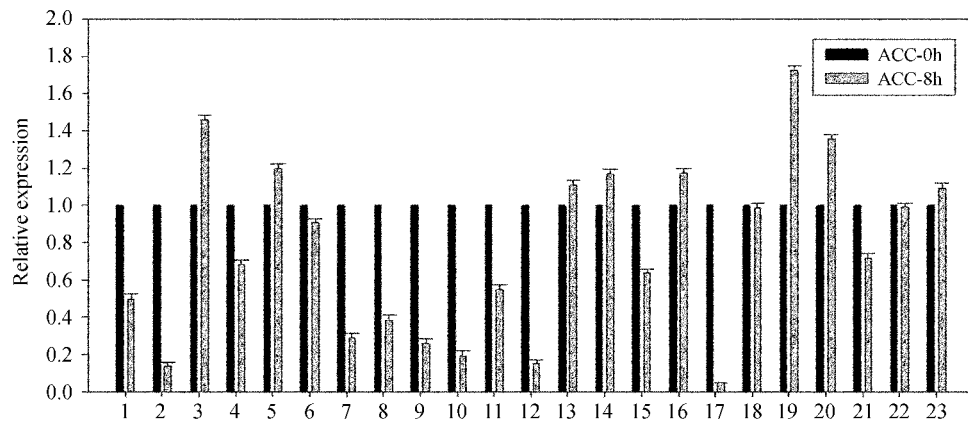
- Clarke JD , Volko SM , Ledford HD *et al.* , 2000. Roles of salicylic acid , jasmonic acid , and ethylene in cpr-induced resistance in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell* , **11** (12) : 2175—2190
- Finkelstein RR , Gampala S , Rock C , 2002. Absciscic acid signaling in seeds and seedlings [J]. *The Plant Cell* , **14** (Suppl) : S15—S45
- Garcia D , Saingery V , Chambrier P *et al.* , 2003. *Arabidopsis haiku* mutants reveal new controls of seed size by endosperm [J]. *Plant Physiology* , **131** (4) : 1661—1670
- Genoud T , Trevino Santa Gruz MB , Métraux JP , 2001. Numeric simulation of plant signaling networks [J]. *Plant Physiology* , **126** : 1430—1437
- Hayat Q , Hayat S , Irfan M *et al.* , 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review [J]. *Environmental and Experimental Botany* , **68** (1) : 14—25
- Hirayama T , Shinozaki K , 2007. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA [J]. *Trends Plant Science* , **12** (8) : 343—350
- Jiang WB , Yu DQ , 2009. Arabidopsis WRKY2 transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid [J]. *BMC Plant Biology* , **9** (1) : 96
- Johnson C , Boden E , Arias J *et al.* , 2003. Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell* , **15** (8) : 1846—1858
- Kendrick MD , Chang C , 2008. Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation [J]. *Current Opinion in Plant Biology* , **11** (5) : 479—485
- Lai ZB , Ying L , Chen ZX *et al.* , 2011. Arabidopsis sigma factor binding proteins are activators of the WRKY33 transcription factor in plant defense [J]. *The Plant Cell* , **23** (10) : 3824—3841
- Leon-Reyes A , Du YJ , Koorneef A *et al.* , 2010. Ethylene signaling renders the jasmonate response of *Arabidopsis* insensitive to future suppression by salicylic acid [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions* , **23** (2) : 187—197
- Leon-Reyes A , Spoel SH , De lange ES *et al.* , 2009. Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling [J]. *Plant Physiology* , **149** (4) : 1797—1809
- Logemann J , Chell JS , Willmitzer L , 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues [J]. *Analytical Biochemistry* , **163** (1) : 16—20
- Lopez-Molina L , Mongrand S , Chua NH , 2001. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , **98** (8) : 4782—4787
- Luo M , Dennis ES , Berger F *et al.* , 2005. MINISEED3 (MINI3) , a WRKY family gene , and HAIKU2 (IKU2) , a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene , are regulators of seed size in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , **102** (48) : 17531—17536
- Morikawa K , Shiina T , Murakami S *et al.* , 2002. Novel nuclear-encoded proteins interacting with a plastid sigma factor , Sig1 , in *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS Letters* , **514** (2-3) : 300—304
- Pandey SP , Somssich IE , 2009. The role of WRKY transcription factors in plant immunity [J]. *Plant Physiology* , **150** (4) : 1648—1655
- Penninckx IAMA , Eggermont K , Terras FRG *et al.* , 1996. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway [J]. *The Plant Cell* , **12** (8) : 2309—2323
- Perruc E , Charpentreau M , Ramirez BC *et al.* , 2004. A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings [J]. *The Plant Journal* , **38** (3) : 410—420
- Qiu JL , Fiil BK , Petersen K *et al.* , 2008. Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus [J]. *European Molecular Biology Organization Journal* , **27** (16) : 2214—2221
- Ross AF , 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants [J]. *Virology* , **14** (3) : 340—358
- Schroeder JI , Kwak JM , Allen GJ , 2001. Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants [J]. *Nature* , **410** (6826) : 327—330
- Shinshi H , 2008. Ethylene-regulated transcription and crosstalk with jasmonic acid [J]. *Plant Science* , **175** (1-2) : 18—23
- Shinozaki K , Yamaguchi-Shinozaki K , Seki M , 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses [J]. *Current Opinion in Plant Biology* , **6** (5) : 410—417
- Takahashi H , Kanayama Y , Zheng MS *et al.* , 2004. Antagonistic interactions between the SA and JA signaling pathways in *Arabidopsis* modulate expression of defense genes and gene-for-gene resistance to cucumber mosaic virus [J]. *Plant and Cell Physiology* , **45** (6) : 803—809
- Wang AH , Garcia D *et al.* , 2010. The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal* , **63** (4) : 670—679
- Xie YD , Li W , Guo D *et al.* , 2010. The *Arabidopsis* gene SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1 plays a role in the salicylate- and jasmonate-mediated defence responses [J]. *Plant Cell and Environment* , **33** (5) : 828—839
- Xu Y , Chang PF , Liu D *et al.* , 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate [J]. *The Plant Cell* , **8** (6) : 1077—1085

附图1 SA处理后表达变化不明显的 *AtVQ* 成员表达谱Appendix Fig. 1 Expression profiles of invariable *AtVQ* genes after SA treatment

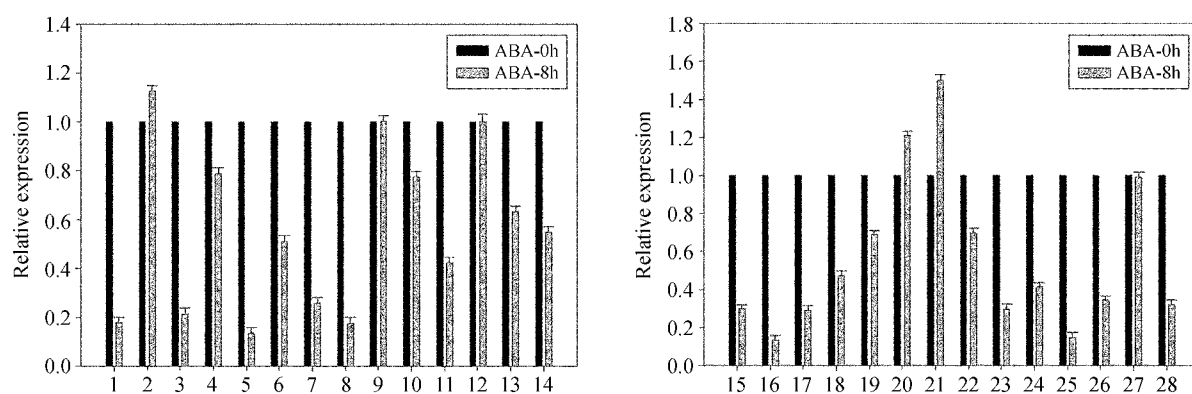
1. *AtVQ1*; 2. *AtVQ2*; 3. *AtVQ4*; 4. *AtVQ5*; 5. *AtVQ6*; 6. *AtVQ7*; 7. *AtVQ9*; 8. *AtVQ11*; 9. *AtVQ13*; 10. *AtVQ14*; 11. *AtVQ15*; 12. *AtVQ16*; 13. *AtVQ17*; 14. *AtVQ25*; 15. *AtVQ26*; 16. *AtVQ27*; 17. *AtVQ29*; 18. *AtVQ30*; 19. *AtVQ31*; 20. *AtVQ32*; 21. *AtVQ33*; 22. *AtVQ34*

附图2 JA处理后表达变化不明显的 *AtVQ* 成员表达谱Appendix Fig. 2 Expression profiles of invariable *AtVQ* genes after JA treatment

1. *AtVQ1*; 2. *AtVQ4*; 3. *AtVQ6*; 4. *AtVQ7*; 5. *AtVQ8*; 6. *AtVQ9*; 7. *AtVQ10*; 8. *AtVQ11*; 9. *AtVQ12*; 10. *AtVQ13*; 11. *AtVQ14*; 12. *AtVQ15*; 13. *AtVQ16*; 14. *AtVQ17*; 15. *AtVQ19*; 16. *AtVQ21*; 17. *AtVQ25*; 18. *AtVQ27*; 19. *AtVQ28*; 20. *AtVQ30*; 21. *AtVQ31*; 22. *AtVQ32*; 23. *AtVQ33*; 24. *AtVQ34*

附图3 ACC处理后表达变化不明显的 *AtVQ* 成员表达谱Appendix Fig. 3 Expression profiles of invariable *AtVQ* genes after ACC treatment

1. *AtVQ1*; 2. *AtVQ4*; 3. *AtVQ6*; 4. *AtVQ7*; 5. *AtVQ8*; 6. *AtVQ9*; 7. *AtVQ10*; 8. *AtVQ11*; 9. *AtVQ12*; 10. *AtVQ14*; 11. *AtVQ15*; 12. *AtVQ16*; 13. *AtVQ19*; 14. *AtVQ20*; 15. *AtVQ21*; 16. *AtVQ22*; 17. *AtVQ26*; 18. *AtVQ27*; 19. *AtVQ30*; 20. *AtVQ31*; 21. *AtVQ32*; 22. *AtVQ33*; 23. *AtVQ34*

附图4 ABA处理后表达变化不明显的 *AtVQ* 成员表达谱Appendix Fig.4 Expression profiles of invariable *AtVQ* genes after ABA treatment

1. *AtVQ1*; 2. *AtVQ2*; 3. *AtVQ3*; 4. *AtVQ4*; 5. *AtVQ5*; 6. *AtVQ6*; 7. *AtVQ7*; 8. *AtVQ8*; 9. *AtVQ9*; 10. *AtVQ10*; 11. *AtVQ11*; 12. *AtVQ12*; 13. *AtVQ14*; 14. *AtVQ15*; 15. *AtVQ16*; 16. *AtVQ17*; 17. *AtVQ19*; 18. *AtVQ21*; 19. *AtVQ22*; 20. *AtVQ23*; 21. *AtVQ24*; 22. *AtVQ25*; 23. *AtVQ28*; 24. *AtVQ30*; 25. *AtVQ31*; 26. *AtVQ32*; 27. *AtVQ33*; 28. *AtVQ34*

附表1 拟南芥 *AtVQ* 基因家族各成员引物表Appendix table 1 Primers of *AtVQ* genes

序号	基因名称	引物序列
<i>AtVQ1</i>	AT1G17147	5'-TGAGATCTGAACCGATGAAGG-3'; 5'-ACGACTGCGTTTTTACCTGTG-3'
<i>AtVQ2</i>	AT1G21320	5'-TTTACCACATGCTGGGATTTTA-3'; 5'-TACCTTCTTGTGGATCGGTTG-3'
<i>AtVQ3</i>	AT1G21326	5'-TACCATTGAAAGTCCGTGGAG-3'; 5'-GTTCTTGCTGATGGGTTTGTG-3'
<i>AtVQ4</i>	AT1G28280	5'-ATTACAGCTTTCTCTCCCGTA-3'; 5'-ATCAAACGGGTCGGGTATAAG-3'
<i>AtVQ5</i>	AT1G32585	5'-CGACCAACTAAACGCTGACTC-3'; 5'-AAGGCTTTTGAAGTCGTTCTTG-3'
<i>AtVQ6</i>	AT1G32610	5'-TGGAGACCAGTTTGGGTCTAA-3'; 5'-GGCTGCATTGCTTTTCATTA-3'
<i>AtVQ7</i>	AT1G35830	5'-TCTCATCTCCGACGACATCTCT-3'; 5'-TTTCTAGGGTTTCGGGAAGA-3'
<i>AtVQ8</i>	AT1G68450	5'-GAATCCCAACCATCAAGAAA-3'; 5'-TGGATCACTTTTGGAGAATGC-3'
<i>AtVQ9</i>	AT1G78310	5'-AATCACCAGTCTCTTCTGACAT-3'; 5'-GAGGTGAGACCAAAGGAGCTAA-3'
<i>AtVQ10</i>	AT1G78410	5'-TCGGTGAAGATACCAGACAGC-3'; 5'-TCTTCCATGTGAGGCATCTCT-3'
<i>AtVQ11</i>	AT1G80450	5'-CGTCTCTCACCTAGACCCATTC-3'; 5'-CGGAAGGAAGTAGAACCCTTTTT-3'
<i>AtVQ12</i>	AT2G22880	5'-TCACTTCATTGACCCGTAAG-3'; 5'-TGCACCAGTTAGCCTCTGAAC-3'
<i>AtVQ13</i>	AT2G33780	5'-GAGCTTCGATGATGACCAAGA-3'; 5'-GAGAAGTCGAGGCTCCGTATC-3'
<i>AtVQ14</i>	AT2G35230	5'-CCTCTCCCATGTTCACTCAGA-3'; 5'-TATTCGGGTAACCGTAGGAG-3'
<i>AtVQ15</i>	AT2G41010	5'-TATATCGCCAAGGTTTCAACG-3'; 5'-ATCGAAGAAAGCAGAGGAAGG-3'
<i>AtVQ16</i>	AT2G41180	5'-TCTCATCTGCTCTCCGACTAGG-3'; 5'-TCTCGACTCTCATCGGATTTG-3'
<i>AtVQ17</i>	AT2G42140	5'-GGTCTTGAACGGGTTAGGAG-3'; 5'-TGTAAGTGGGAGGAAGAAGCA-3'
<i>AtVQ18</i>	AT2G44340	5'-AAGAAGAGTGGGGATCAGGTG-3'; 5'-TCTCATGGGAAACGAAGAGAA-3'
<i>AtVQ19</i>	AT3G15300	5'-GCGGATTTAAACAACAACCTCA-3'; 5'-AGCTAGGCGACAAAATCTCCT-3'
<i>AtVQ20</i>	AT3G18360	5'-CGGAGAACATGACAGGTTAAT-3'; 5'-GGAAAATCGGAAATGTCGGTA-3'
<i>AtVQ21</i>	AT3G18690	5'-AGATCTGTGCTCCTCTCCTT-3'; 5'-ACCACCGGCTCTCTAGGAATA-3'
<i>AtVQ22</i>	AT3G22160	5'-AAACTGGCCGTGTAACCAAG-3'; 5'-GCCAGTCTATTGCTGAACCA-3'
<i>AtVQ23</i>	AT3G56710	5'-AAAACCATCTCCGGTTTCAAG-3'; 5'-TTTGAAGTCTCATGGGTTTG-3'
<i>AtVQ24</i>	AT3G56880	5'-CATCGATTCTGCTGCTACTCTC-3'; 5'-AGGAGATGATTGCGTGGAAGT-3'
<i>AtVQ25</i>	AT3G58000	5'-GAGAACCCGAGCATTTGTAT-3'; 5'-CCATTCAAGAACCCTCCAGA-3'
<i>AtVQ26</i>	AT3G60090	5'-AGAACATACGGCTGAAGTGA-3'; 5'-AGATCGATCAAACCGTCAAAA-3'
<i>AtVQ27</i>	AT4G15120	5'-ACACTTTTCAACACCGACACAG-3'; 5'-TTGCCAAGGAGAGGAAGATATC-3'
<i>AtVQ28</i>	AT4G20000	5'-AAACGCAAACCCTAGCAATTT-3'; 5'-AGACCCGAAATCCAAAGTCAC-3'
<i>AtVQ29</i>	AT4G37710	5'-CACAAGGGCAACGAAAAATTA-3'; 5'-GACATGAGGATGCATTGGATT-3'
<i>AtVQ30</i>	AT4G39720	5'-TCTTCTTCGCCAAACACTTACA-3'; 5'-GCAGATTCATATCCTCGAAACC-3'
<i>AtVQ31</i>	AT5G08480	5'-ATGTATGAGCCCAAGCTTGA-3'; 5'-GTGCCACTGCACTTGATTA-3'
<i>AtVQ32</i>	AT5G46780	5'-GTCACATCAAAACGGTCTTAA-3'; 5'-GCAAAATGGGTGAGGAACAA-3'
<i>AtVQ33</i>	AT5G53830	5'-TTTCCGAAGCTAGGGCTAAAC-3'; 5'-TCAGCAATGGCTTTGTCTCTCT-3'
<i>AtVQ34</i>	AT5G65170	5'-CCTCGAGCTTGAGAACGAGTA-3'; 5'-TTAGGGTTGGCTGTGTCATC-3'