

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00848

# 拟南芥 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 在非生物胁迫条件下的表达分析

付乾堂<sup>1,2</sup>, 余迪求<sup>1</sup>

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

**摘要:** WRKY 转录因子家族在调控植物逆境诱导反应、生长发育及其信号转导等方面起着重要的分子生物学功能。文章采用 Northern 杂交的方法, 对拟南芥 3 个 WRKY 基因进行表达谱分析。结果表明: *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 受多种非生物逆境因子(温度因子、高盐、渗透胁迫和激素脱落酸)的影响, 其中低温和高盐对 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 的诱导尤为明显, 表明这 3 个 *AtWRKY* 基因可能在响应环境信号方面起着一定的作用。作为序列相似性较高的 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 对一些胁迫因子的表达模式呈现一定的相似性; 但 *AtWRKY33* 受高温的抑制和低温的快速诱导, 与另外两个基因的表达模式不同, 推测它们对温度胁迫因子的反应存在差异。此外, 对启动子序列的生物信息学分析发现, 3 个基因的启动子包含多个与非生物逆境反应相关的顺式作用元件。

**关键词:** 拟南芥; *AtWRKY* 基因; 非生物胁迫; 表达谱

## Expression profiles of *AtWRKY25*, *AtWRKY26* and *AtWRKY33* under abiotic stresses

FU Qian-Tang<sup>1,2</sup>, YU Di-Qiu<sup>1</sup>

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 transcription factor WRKY family is one type of key regulatory components of plant development and defense against stress factors. The expression profiles of three *AtWRKY* genes under abiotic stresses were analyzed by Northern blotting analysis. The expression of *AtWRKY25*, *AtWRKY26*, and *AtWRKY33* changed during stress treatments including thermal factors, NaCl, abscisic acid (ABA) and osmotic stress, and significantly under NaCl and cold treatments, suggesting a specific role of the three *AtWRKYs* in adaptation to environmental stresses in plants. We also found that the three *AtWRKY* genes showed distinct expression patterns under thermal stresses. *AtWRKY25* and *AtWRKY26* were gradually induced during heat and cold treatments, whereas *AtWRKY33* was suppressed by heat treatment and induced rapidly during cold stress, indicating that the three *AtWRKYs* may play different roles in response to temperature factors. In addition, we analyzed the sequence of the promoters with bioinformatics approach, and some *cis*-elements involved in abiotic stresses

收稿日期: 2009-10-28; 修回日期: 2010-01-14

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(编号: 2009ZX08009-066B)和国家自然科学基金项目(编号: 90817003)资助

作者简介: 付乾堂(1979-), 男, 博士研究生, 研究方向: 植物功能基因分析。Tel: 0871-5144423; E-mail: qtfu2002@163.com

通讯作者: 余迪求(1964-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 植物功能基因分析、植物抗逆信号传导及分子生物学。Tel: 0871-5178133;  
E-mail: ydq@xtbg.ac.cn

and hormonal responses were revealed. The results provided important information for studying biological functions of three *AtWRKY* genes.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*; *AtWRKY* gene; abiotic stresses; expression profiles

植物在生长发育过程中经受各种不利环境因素, 如极端温度、盐害和干旱胁迫等, 这些胁迫因子都会造成对植物的伤害而影响植物的生长和地域分布<sup>[1]</sup>。植物长期进化的过程, 也是对逆境的不抵抗和适应的过程。在逆境胁迫下植物通过调控基因的表达, 进而改变植物体内的抗氧化酶系统的活性、激素和信号分子的水平等方式来抵御逆境胁迫以减轻伤害<sup>[2,3]</sup>。

WRKY蛋白家族以其高度保守的WRKYGQK的DNA结合域而得名, 属于锌指型转录调控因子<sup>[4]</sup>。WRKY转录因子广泛参与植物的多种生命活动, 如植物抗病反应及其信号转导途径的建立<sup>[4,5]</sup>, 植物的生长发育、形态建成和衰老等过程<sup>[6-8]</sup>。同时, WRKY基因在植物非生物逆境响应及其信号转导过程中也起着非常重要的调控作用<sup>[9]</sup>。拟南芥*AtWRKY22*、*AtWRKY33* 和 *AtWRKY53* 均受冷诱导<sup>[10]</sup>, 水稻WRKY 基因家族中有 41 个水稻 WRKY 至少响应一种非生物胁迫处理, 其中 16 个WRKY响应低温胁迫, 19 个WRKY响应干旱胁迫和 27 个WRKY响应盐胁迫<sup>[11]</sup>。水稻 *OsWRKY11* 在幼苗期受热激和干旱胁迫诱导, 过量表达 *OsWRKY11* 能显著提高植物经过高温预处理后的高温耐性和干旱耐性<sup>[12]</sup>, *OsWRKY45* 受高盐和干旱胁迫诱导, 异源高表达水稻*OsWRKY45* 能增强拟南芥植株的抗盐和抗干旱能力<sup>[13]</sup>。近年来, 在越来越多的物种中发现WRKY 基因参与非生物胁迫。重金属污染治理模式植物遏蓝菜(*Thlaspi caerulescens*) 的 *TcWRKY53* 基因受盐害、冷害和渗透胁迫的诱导, 高表达*TcWRKY53* 能降低转基因烟草植株对渗透胁迫耐受性<sup>[14]</sup>。柑橘类水果两个 WRKY 基因受高温胁迫的诱导<sup>[15]</sup>。沙漠植物三齿拉瑞阿(*Larrea tridentate*) 的 *LtWRKY21* 可以激活ABA信号转导途径并参与ABA介导的抗旱性建立<sup>[16]</sup>。

*AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 3 个蛋白均含有两个WRKY结构域, 它们的氨基酸序列具有较高的相似性, 同归属于第 I 大类WRKY蛋白家族中的一个小组<sup>[17]</sup>。一般认为第 I 大类WRKY蛋白

在起源上属较为原始的一个类群, 基因的功能也较为全面, 可参与对病原菌和非生物逆境的抗性<sup>[18]</sup>。这组基因在拟南芥抗病方面的报道相对较多, 研究表明 *AtWRKY25* 和 *AtWRKY33* 被认为是处于拟南芥促细胞分裂激活蛋白激酶 4(*Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase 4, *AtMPK4*)调节的水杨酸抑制、茉莉酸/乙烯激活的下游组分。酵母双杂交实验表明, *AtMPK4* 亚基 1 (*AtMPK4* substrate 1, *MKS1*) 在蛋白水平上可以和 *AtWRKY25* 和 *AtWRKY33* 相互作用<sup>[19]</sup>。最近的研究表明, *AtWRKY25* 是水杨酸对病程相关基因(Pathogenesis-related 1, *PR1*)的表达调控以及对丁香假单胞杆菌(*Pseudomonas syringae*)抗性的负调控因子<sup>[20]</sup>; *AtWRKY33* 参与拟南芥抗真菌的反应, *wrky33* 突变体增加了对真菌的敏感性并降低了茉莉酸调控的植物防卫蛋白基因(Plant defensin, *PDF1.2*)表达, 而高表达*AtWRKY33* 则提高了拟南芥植株的真菌抗病能力<sup>[21]</sup>。抗坏血酸过氧化物酶基因 1(Cytosolic ascorbate peroxidase 1, *APX1*) 敲除后的基因芯片分析显示, 锌转运蛋白基因 7(Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana*, *Zat7*)、*Zat12* 和 *AtWRKY25* 表达量显著上调<sup>[22]</sup>, 氧化胁迫也能激活 *AtWRKY25* 基因的表达, 而 *AtWRKY25* 参与氧化胁迫反应是依赖锌指蛋白 *Zat12* 而处于其下游<sup>[23]</sup>。

本研究采用 Northern 杂交的方法, 通过对不同非生物逆境胁迫条件下野生型拟南芥材料中的 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 基因进行表达谱分析, 并结合对它们的启动子序列的分析, 明确它们的表达情况和响应的非生物逆境因子, 为进一步研究这 3 个 *AtWRKY* 基因在非生物逆境胁迫中的分子生物学功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Columbia (Col.) 生态型作为本研究的实验材料, 拟南芥种子经 20%的

漂白水表面灭菌后播在 1/2 MS 培养基(含 0.7% agar)上, 4 ℃ 低温处理 3 d 后转移至 12 h 光照(100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ )/12 h 黑暗的 22 ℃ 温室培养一周, 然后将拟南芥苗移栽到土壤中, 生长条件为温度 22 ℃, 光周期为 12 h 光照/12 h 黑暗, 土壤中生长两周的拟南芥苗用于不同非生物胁迫因子处理进行表达谱分析。

## 1.2 方法

### 1.2.1 逆境因子处理

拟南芥苗放置在 42 ℃ 培养箱和 4 ℃ 冷库分别进行高温和低温处理, 或将拟南芥苗移出土壤分别浸泡在 300 mmol/L NaCl、25%PEG 和 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$  ABA 水溶液(先加少量无水乙醇溶解 ABA 粉末, 然后用水定容)中进行处理, 用水处理作为对照, 材料处理后按不同时间点取样, 液氮速冻直接提取 RNA 或 -80 ℃ 保存备用。

### 1.2.2 Northern blotting

总 RNA 的提取采用 Trizol reagent (Invitrogen) 法, Northern 杂交按照标准实验方法进行<sup>[24]</sup>。每个样品取 20  $\mu\text{g}$  总 RNA, 68 ℃ 变性后用 1.5% 甲醛-MOPS 琼脂糖变性胶分离, 照相记录, 确保每个样品的量均匀一致, 然后转移总 RNA 到尼龙膜上。通过序列比对找出 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 3 个基因各自特异的片段, 并设计合成它们特异性的引物(表 1)进行 PCR 扩增, 产物经回收用做杂交探针, 探针用  $^{32}\text{P}$ -dATP 进行标记, 利用 PerfectHyb<sup>TM</sup> Plus 杂交液(Sigma-Aldrich)与转有总 RNA 样品的尼龙膜 68 ℃ 杂交过夜, 洗膜, 测信号强度, 暗室 X 光片放射自显影。每个实验重复 2 次。利用 Bio-1D 软件对杂交图片进行数据量化处理, 并作曲线图。

### 1.2.3 启动子分析

分别选取 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 3 个基因 ATG 上游 3 kb 的碱基序列, 在 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 网站<sup>[25]</sup>上进行顺式作用元件的预测。

## 2 结果与分析

### 2.1 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 氨基酸序列相似性分析

*AtWRKY25* cDNA 全长 1 608 bp, 编码 393 个氨基酸; *AtWRKY26* cDNA 全长 1 159 bp, 编码 309 个氨基酸;

*AtWRKY33* cDNA 全长 1 902 bp, 编码 519 个氨基酸。*AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 的氨基酸序列分析表明, 3 个蛋白具有较高的序列相似性, 为 37.79%, 都含有两个 WRKY 结构域, 并且它们保守区域的相似性达 56.67% (图 1), 与它们同归属于第 I 大类 WRKY 蛋白家族中的一个小组相一致<sup>[17]</sup>。氨基酸序列高度的相似性也预示着它们有相似的基因功能, 3 个基因之间也可能存在功能上的互补和相互的调控; 同时, 3 个蛋白的氨基酸也有各自特异的序列, 预示着它们在行使生物学的功能方面也可能存在差异。

### 2.2 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 在温度胁迫下的表达分析

正常生长的拟南芥中, *AtWRKY25* 和 *AtWRKY26* 几乎没有表达, 而 *AtWRKY33* 则有一定的基础表达量。42 ℃ 高温处理 0.5 h 后 *AtWRKY25* 就开始有一定量的表达, 随着处理时间延长 *AtWRKY25* 的表达逐渐增强, 变化趋势明显, 并在 42 ℃ 处理 4~6 h 后达到表达量的高峰, 然后逐渐降低; *AtWRKY26* 在 42 ℃ 的处理下的趋势虽与 *AtWRKY25* 相似, 但表达量一直很低, 直至处理后的 4~6 h 才有可见的表达量; *AtWRKY33* 在 42 ℃ 处理下的表现则与 *AtWRKY25* 相反, 是随着处理时间的延长表达量逐渐降低, 直至 8 h 后完全消失(图 2)。4 ℃ 低温处理后, *AtWRKY25* 和 *AtWRKY26* 的表达也是逐渐增强的, 不过增强的趋势比 42 ℃ 处理的明显, 4 ℃ 处理 4 h 后 *AtWRKY25* 的表达水平就有明显的增加, 约是 42 ℃ 处理最高表达量的 5~6 倍, 并随处理时间一直持续增加; *AtWRKY26* 受低温的诱导趋势也比高温诱导的明显, 在 4 ℃ 处理 0.5 h 就有可见的表达量, 然后缓慢增加, 至处理 24 h 达到表达的最高水平; *AtWRKY33* 在 4 ℃ 处理下的表达水平呈现出先增加后降低的趋势, 表达差异变化明显, 在处理 1 h 后就达到最高的表达量, 并维持一定量水平至 8 h, 然后逐渐降低直到消失(图 2)。 *AtWRKY25* 和 *AtWRKY26* 在高温和低温处理后的表达变化趋势是相似的, 而 *AtWRKY33* 在高温和低温处理后的表达模式则是完全不同的(图 2)。

### 2.3 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 在 NaCl 和渗透胁迫下的表达分析

高盐胁迫可对植物造成离子毒害和渗透胁迫两

表 1 Northern 杂交探针的 PCR 扩增引物序列和扩增条件

基因名称	引物序列(5 3 )	复性温度 Tm( )	片段长度(bp)
<i>AtWRKY25</i>	AACCAAGAAGGTCGGTGAAA AGTACTGGACCAACCAACCT	61.9	459
<i>AtWRKY26</i>	AACCCATCAAAAAATAGCTGAGT AGAAGGGAAATGGACAAATCA	60.8	659
<i>AtWRKY33</i>	AGGTTCTAGCTTCTCCAACCA TGTGATCTGACCTTCCAAAGAT	61.5	515

AtWRKY25.txt	NQSFGTERQIKIPAYMV.....SRNSNDGYGWRKYGQKQ	178
AtWRKY26.txt	.....KTSDDGYNWRKYGQKQ	129
AtWRKY33.txt	QSEQWSCTETRPNNQAVSYNGREQRKGEDGYNWRKYGQKQ	196
Consensus	dgy wrkygqkq	
AtWRKY25.txt	VKKSENPRSYFKCTYPDCVSKKIVET.ASDGQITEIIVYKG	217
AtWRKY26.txt	VKGSSENPRSYFKCTYPNCLTKKKVETSLVKGQMIETIVYKG	169
AtWRKY33.txt	VKGSSENPRSYFKCTEPNCPKTKKVER.SLEGQITEIIVYKG	235
Consensus	vk senprsy kct p c kk ve gq ei ykg	
AtWRKY25.txt	GHNHPKPEFTKRPSQSS.LPSSVNGRRLFNPA SVVSEPHD	256
AtWRKY26.txt	SHNHPKPQSTKRSS.....STAIAAHQ	191
AtWRKY33.txt	SHNHPKPQSTRSSSSSSTFHSAVYNASLDHNRQASSDQP	275
Consensus	hnhpkp t r s	
AtWRKY25.txt	QSENSISFDYSDLECKSFKSEYGEIDEEEEQ.....	288
AtWRKY26.txt	NSSNG.....DGK.....DIGEDE.....	205
AtWRKY33.txt	NSNNSFHQSDSFGMQCED.NTTSDSVGDDEFEQGSSIVSR	314
Consensus	s n e	
AtWRKY25.txt	.....PEMKRMKREGEDEGMSIEVSKGVKEPRVVVQT	320
AtWRKY26.txt	.....TEAKRWKRE.....ENVKEPRVVVQT	226
AtWRKY33.txt	DEEDCGSEPEAKRWKGDNETNGNGGGSKTVPREPRIVVQT	354
Consensus	e kr k v epr vvqt	
AtWRKY25.txt	ISDIDVLI DGFWRWRYGCKVVKGNINPRSYKCTFQCGGV	360
AtWRKY26.txt	TSIDIDI LDGYRWRYGCKVVKGNPNPRSYKCTFTGCFV	266
AtWRKY33.txt	TSIDIDI LDGYRWRYGCKVVKGNPNPRSYKCTTIGCPV	394
Consensus	sdid l dg rwrkygqkvvkg n nprsykct gc v	
AtWRKY25.txt	KKQVERSAADERAVLTTYEGRHNDIPTAL.....RRS	393
AtWRKY26.txt	RKHVERAFQDPKSVITTYEGKHKHQIPTPR.....RGP	299
AtWRKY33.txt	RKHVERASHDMRAVITTYEGKHNHDVFAARGSGYATNRP	434
Consensus	k ver d v ttyeg h h p r	

图 1 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 氨基酸序列相似性分析  
下划线表示 WRKY 结构域。

方面的影响<sup>[26]</sup>。本文分别采用 300 mmol/L NaCl和 25% PEG按不同时间段处理野生型拟南芥，检测 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 的表达情况。结果表明，*AtWRKY25* 和 *AtWRKY26* 受NaCl的明显诱导，并随着处理时间的延长表达持续增强；而 *AtWRKY33* 则表现出开始受NaCl处理的抑制，在处理 4 h后表达量达最低水平，然后表达量才又逐渐增加，在处理 24 h时和*AtWRKY25*、*AtWRKY26* 一样都达到了表达的最高水平，3 个基因在NaCl的胁迫下呈现相似的表达模式(图 3)。在PEG的渗透胁迫

下，*AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 都表现出了先急剧增加后缓慢降低的趋势，与对照 H<sub>2</sub>O 处理后的表达相似，不过 3 个基因受渗透胁迫诱导的持续时间要比 H<sub>2</sub>O 处理的时间长(图 4)；它们在渗透胁迫下的变化趋势与低温、NaCl 的处理相比均不很明显。

2.4 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 在ABA 处理下的表达分析

ABA 是重要的植物激素之一，参与植物的生长发育，同时 ABA 也是抵御外界环境胁迫的一个

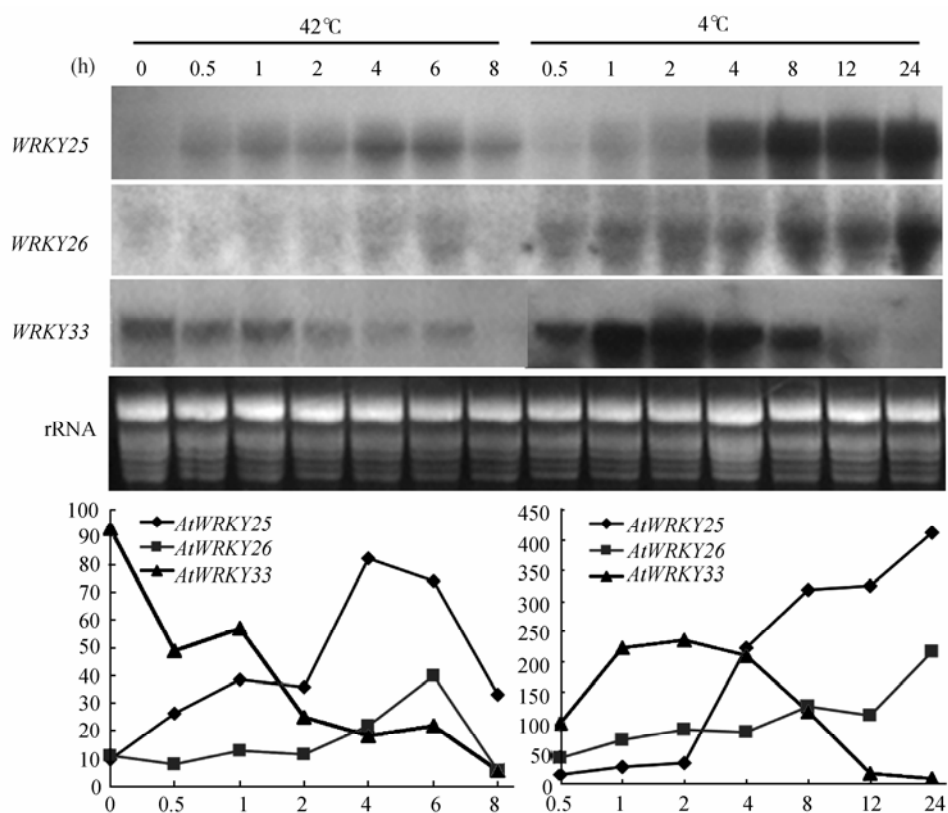


图 2 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 在温度逆境胁迫下的表达谱

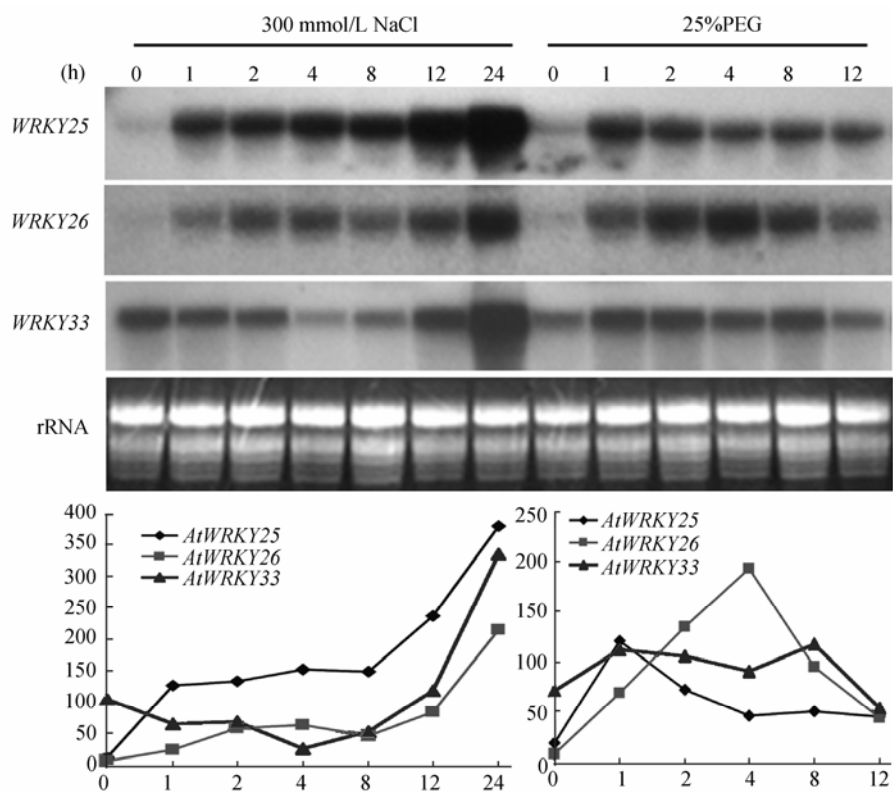


图 3 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 在 NaCl 和 PEG 胁迫下的表达谱

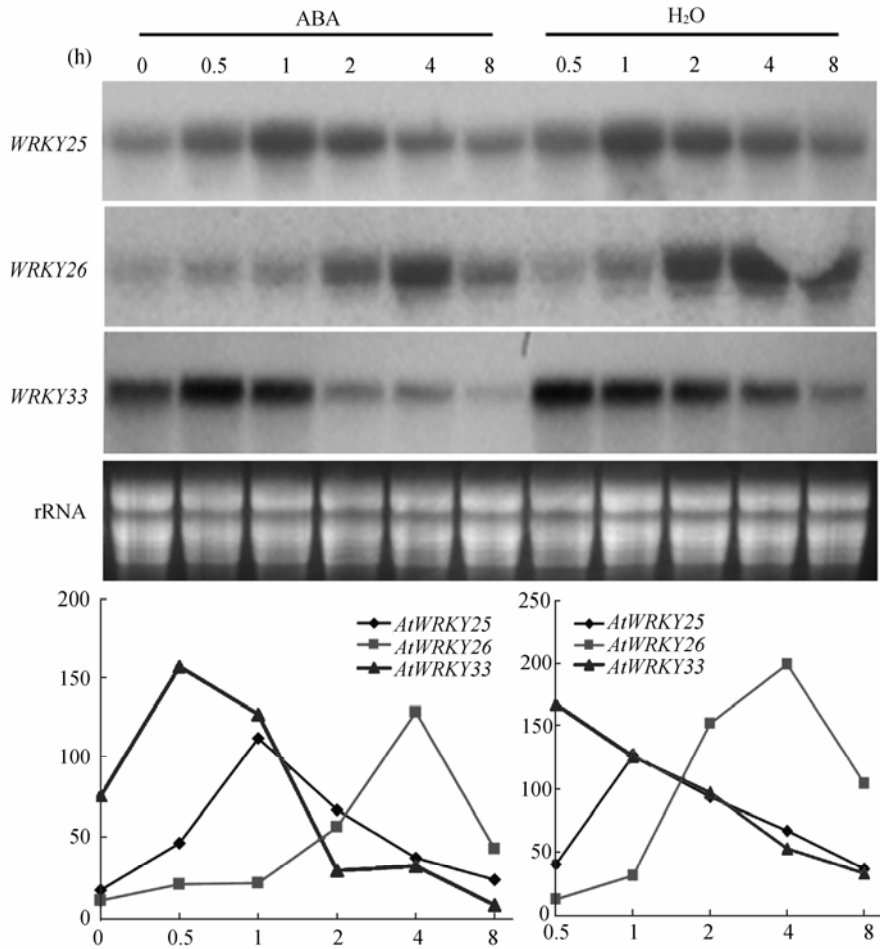


图 4 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 在激素 ABA 处理下的表达谱

重要信号分子。研究表明 ABA 通过复杂的信号途径广泛参与植物的多个生理反应, 如低温、高温、高盐和渗透胁迫等方面的调节 [26,27]。 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 很容易受高温、低温、NaCl 和 PEG 等处理的影响, 推测这 3 个基因参与的逆境反应或许与 ABA 信号途径有关, 所以本研究进一步分析了 ABA 处理野生型拟南芥材料后 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 的表达, 同时 H<sub>2</sub>O 处理作为对照。如图 4 所示, *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 在 100  $\mu$ mol/L ABA 的处理下的表达谱与 H<sub>2</sub>O 处理后的表达趋势相似, 只是它们的表达水平在 ABA 处理 2 h 后与 H<sub>2</sub>O 处理相比受到了一定的抑制, 说明这 3 个基因也响应了 ABA 的处理; 另外, 这 3 个基因也受到作为对照 H<sub>2</sub>O 处理的诱导, 可能是因 H<sub>2</sub>O 造成渗透胁迫或氧化胁迫的影响, 说明 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 对外界环境反

应极为敏感。

## 2.5 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 的启动子分析

把 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 可能的启动子序列在 PLACE 网站上进行顺式作用元件预测, 部分结果见表 2。分析结果表明, 3 个 *AtWRKY* 基因的启动子序列中均含有响应多种逆境和植物激素的顺式元件, 并且含有多个相同的元件, 如 ABRE 类似序列、ARR1 结合元件、MYB 核心序列、MYC 识别位点、W 盒等元件, 但每个启动子所含的数量有一定的差别; 另外, 3 个启动子序列也分别存在各自特异的作用元件。 *AtWRKY25* 启动子上含有 3 个 HSEs 热激元件, 而 *AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 的启动子则分别含有 0 和 1 个, 与 3 个基因高温胁迫下的表达谱一致。参与抗病和盐诱导的基因表达的 GT-1 盒在 *AtWRKY25* 启动子上有 5 个, 而另外两个

表 2 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 启动子上的顺式作用元件预测

调控元件	序列	调控元件可能的作用	在各启动子的数量		
			<i>pAtWRKY25</i>	<i>pAtWRKY26</i>	<i>pAtWRKY33</i>
ABRE 类似序列	ACGTG	受干旱、缺氧和氧化胁迫的诱导	2	3	7
ARF 结合位点	TGTCTC	生长素反应因子结合位点, 受 IAA 的调控	0	5	3
ARR1 结合元件	nGATT	反应调节因子, 起转录激活作用	22	18	14
CCAAT 盒	CCAAT	与 HSEs 一起促进热激启动子活性	10	5	5
CuRE 核心序列	GTAC	铜反应因子核心序列, 也参与氧化胁迫反应	8	5	5
LTRE 核心序列	CCGAC	低温反应元件核心序列, 受低温和干旱诱导	1	0	3
DPBF-1 和 2	ACACNNG	DPBF-1 和 2 结合序列中心, 也响应 ABA 诱导	3	3	0
GT-1 盒	GAAAAA	参与抗病和盐诱导的基因表达	5	0	0
HSE	GAAAnnTTC	热激元件, 热激因子结合基序	3	0	1
LTRE-1	CCGAAA	低温反应元件	0	1	1
MYB 核心序列	CnGTTTr	MYB 结合位点, 受干旱和水胁迫诱导	4	7	5
MYC 识别位点	CAnnTG	MYC 识别位点, 受低温和干旱影响	12	15	14
P 盒	CCTTTT	啞啞盒, 赤霉素反应顺式元件	3	2	1
W 盒	(T)TGAC(C/T)	WRKY 蛋白特异结合基序, 参与植物抗病反应	2	4	1

*AtWRKY* 启动子则不含该元件, 表达谱分析表明 *AtWRKY25* 明显受高盐胁迫的诱导。低温反应元件 LTRE-1 和 LTRE 核心序列在各个启动子上的差异也可能影响着 3 个 *AtWRKY* 对低温胁迫的响应。启动子顺式元件的预测与 3 个基因在非生物胁迫下的表达谱基本一致, 是对表达谱分析的验证和补充。在这些不同功能顺式元件的共同作用下, 3 个基因均表现出对多种非生物逆境因子的响应, 启动子的差异可能导致它们表达谱和基因功能的差异。

### 3 讨论

近年来关于 WRKY 蛋白的研究报道很多, WRKY 蛋白具有多种重要的生物学功能。本文主要分析了 *AtWRKY25*、*WRKY26* 和 *WRKY33* 在各种非生物胁迫下的表达模式, 为进一步研究它们的分子生物学功能明确方向。作为进化上较为原始 WRKY 蛋白家族中的第 1 大类, *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 这一小组蛋白广泛参与植物抗病并极易响应多种非生物逆境因子的胁迫, 表现出了较为广泛的生物学功能<sup>[18]</sup>。氨基酸序列分析表明 3 个 *AtWRKY* 具有较高的相似性(图 1), 而聚类分析聚集在一小组的基因成员之间一般具有相似的基因表达模式<sup>[17]</sup>。*AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 对

同一种逆境因子的诱导表达模式也表现出了一定的相似性和部分的差异, 与聚在同一小组存在结构功能上的相似性相一致, 也预示着它们可能具有相似的分子生物学功能; 表达模式的部分差异也表明 3 个基因之间存在一定的生物学功能分工。

通过对 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 的表达谱和对 3 个基因的启动子进行分析, 发现三个基因极易受环境因子的影响, 并且它们的启动子包含多个响应非生物逆境的顺式作用元件(表 2)。虽然 3 个基因的表达受多种非生物逆境因子胁迫的影响, 但从表达水平上看, 高温、渗透胁迫和植物激素 ABA 的影响较弱, 表达变化趋势不是很明显, 而低温和高盐的处理与对照相比, 它们的表达变化差异明显(图 2~图 4); 因此推测 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 与 *AtWRKY33* 的分子生物学功能可能主要体现在拟南芥抵抗低温和高盐胁迫因子等方面。表达谱分析发现 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 在多种逆境处理材料中的表达谱是一致的, 尤其是对低温和高盐胁迫; 而 3 个基因对高温的反应上又表现出差异, 启动子预测的 HSEs 热激元件在它们启动子上的数量也不同(表 2), 可能处在同一聚类小组的基因一方面表现功能的相似和互补, 另一方面存在相互的调控关系。温度因子是限制植物生长和发育

的一个重要因素,很多基因对高温和低温的反应是一致的,即同时受高温、低温的抑制或诱导,即为温度胁迫因子的交叉适应<sup>[28]</sup>,这种状况在*AtWRKY25*和*AtWRKY26*对高温和低温的胁迫反应中是一致的,均受两种胁迫的诱导;而*AtWRKY33*则表现出了对高温和低温的反应不一致,受高温的抑制而受低温的诱导(图 2),*AtWRKY33*可能对高温和低温的反应机制不同。*AtWRKY25*、*AtWRKY26*与*AtWRKY33*受高盐胁迫的诱导明显,而渗透胁迫的作用不大(图 3),推测 3 个基因可能在植物的离子毒害方面起作用,待用其他盐离子处理进一步进行验证。此外,*AtWRKY33*在拟南芥植物正常生长的状态下就有一定量的基础表达,该基因可能对维持植物正常的生长发育也起到了一定的作用。*AtWRKY25*受氧化胁迫的诱导表达<sup>[23]</sup>,本研究发现*AtWRKY25*受温度因子、高盐和渗透胁迫的诱导,可能这些胁迫因子通过对植物造成氧化胁迫而诱导*AtWRKY25*的表达。

初步的表达谱分析为研究本组*AtWRKY*在抗非生物逆境方面提供一些信息和导向,通过筛选本组*AtWRKY*基因的突变体和构建高表达转基因植株可进一步研究它们在这些非生物胁迫中行使的分子生物学功能。从ABRC(The *Arabidopsis* Biological Resource Center)拟南芥突变体库分别购买获得 3 个基因的SALK系列突变体,根据T-DNA插入的位置,设计特异引物进纯合突变体PCR筛选。已对筛选到的*Atwrky25*、*Atwrky26*和*Atwrky33*纯合突变体株系进行初步的逆境胁迫实验,结果发现在逆境条件下 3 个基因的单个突变体与野生型材料相比并未产生明显的表型差异,推测可能是由于*AtWRKY25*、*AtWRKY26*和*AtWRKY33* 3 个蛋白之间的功能互补。作为一个多基因的转录调控因子家族,亲缘关系相近的 WRKY 成员之间可能存在功能上的冗余和信号途径上的重叠和互作,如*AtWRKY7*、*AtWRKY11*和*AtWRKY17*这 3 个基因亲缘关系比较近,并在病原菌诱导的表达模式上相同,但是单个*Atwrky17*突变体并没有明显的抗性上的变化<sup>[29]</sup>。对于多基因家族的基因进行功能研究时,最好能以相似性较高和处于同一聚类小组的两个基因的双突变体或多个基因的多突变体进行研究,可能会获得更为明显的表型,也更有利于分析它们的分子生物学

功能。通过单突变体植株之间的花杂交并筛选获得双突变和 3 突变植株,目前已获得*wrky25*×*wrky26*、*wrky25*×*wrky33* 两两双突变体和*wrky25*×*wrky26*×*wrky33*三突变体植株,待做进一步的功能分析。

## 参考文献(References):

- [1] Zhu JK. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(5): 401–406. [\[DOI\]](#)
- [2] Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Molecular responses to dehydration, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(2): 194–199. [\[DOI\]](#)
- [3] Clarke SM, Mur LA, Wood JE, Scott IM. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2004, 38(3): 432–447. [\[DOI\]](#)
- [4] Yu D, Chen C, Chen Z. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell*, 2001, 13(7): 1527–1540. [\[DOI\]](#)
- [5] Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 2002, 415(6875): 977–983. [\[DOI\]](#)
- [6] Johnson CS, Kolevski B, Smyth DR. TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell*, 2002, 14(6): 1359–1375. [\[DOI\]](#)
- [7] Luo M, Dennis ES, Berger F, Peacock WJ, Chaudhury A. *MINISEED3 (MINI3)*, a WRKY family gene, and *HAIKU2 (IKU2)*, a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(48): 17531–17536. [\[DOI\]](#)
- [8] Robatzek S, Somssich IE. Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev*, 2002, 16(9): 1139–1149. [\[DOI\]](#)
- [9] Zhou QY, Tian AG, Zou HF, Xie ZM, Lei G, Huang J, Wang CM, Wang HW, Zhang JS, Chen SY. Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Biotechnol J*, 2008, 6(5): 486–503. [\[DOI\]](#)
- [10] Fowler S, Thomashow MF. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold

- response pathway. *Plant Cell*, 2002, 14(8): 1675–1690. [\[DOI\]](#)
- [11] Ramamoorthy R, Jiang SY, Kumar N, Venkatesh PN, Ramachandran S. A comprehensive transcriptional profiling of the *WRKY* gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(6): 865–879. [\[DOI\]](#)
- [12] Wu X, Shiroto Y, Kishitani S, Ito Y, Toriyama K. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings over-expressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(1): 21–30. [\[DOI\]](#)
- [13] Qiu Y, Yu D. Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Environ Exp Bot*, 2009, 65(1): 35–47.
- [14] Wei W, Zhang YX, Han L, Guan ZQ, Chai TY. A novel WRKY transcriptional factor from *Thlaspi caerulescens* negatively regulates the osmotic stress tolerance of transgenic tobacco. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(4): 795–803. [\[DOI\]](#)
- [15] Sanchez-Ballesta MT, Lluch Y, Gosalbes MJ, Zacarias L, Granell A, Lafuente MT. A survey of genes differentially expressed during long-term heat induced chilling tolerance in citrus fruit. *Planta*, 2003, 218(1): 65–70. [\[DOI\]](#)
- [16] Zou X, Seemann JR, Nemnan D, Shen QJ. A *WRKY* gene from creosote bush encodes an activator of the abscisic acid signaling pathway. *J Biol Chem*, 2004, 279(53): 55770–55779. [\[DOI\]](#)
- [17] Dong J, Chen C, Chen Z. Expression profiles of the *Arabidopsis WRKY* gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol*, 2003, 51(1): 21–37. [\[DOI\]](#)
- [18] Ülker B, Somssich IE. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7(5): 491–498. [\[DOI\]](#)
- [19] Andreasson E, Jenkins T, Brodersen P, Thorgrimsen S, Petersen NHT, Zhu SJ, Qiu JL, Micheelsen P, Rocher A, Petersen M, Newman MA, Nielsen HB, Hirt H, Somssich I, Mattsson O, Mundy J. The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J*, 2005, 24(14): 2579–2589. [\[DOI\]](#)
- [20] Zheng Z, Mosher SL, Fan B, Klessing DF, Chen Z. Functional analysis *Arabidopsis* WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. *BMC Plant Biol*, 2007, 7: 2. [\[DOI\]](#)
- [21] Zheng Z, Qamar SA, Chen Z, Mengiste T. *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J*, 2006, 48(4): 592–605. [\[DOI\]](#)
- [22] Pnueli L, Liang H, Rozenberg M, Mittler R. Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (*Apx1*)-deficient *Arabidopsis* plants. *Plant J*, 2003, 34(2): 187–203. [\[DOI\]](#)
- [23] Rizhsky L, Davletova S, Liang HJ, Mittler R. The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2004, 279(12): 11736–11743. [\[DOI\]](#)
- [24] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [25] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 297–300. [\[DOI\]](#)
- [26] Zhu JK. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 247–273. [\[DOI\]](#)
- [27] Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 2002, 14(Suppl.): s165–s183. [\[DOI\]](#)
- [28] Knight H, Knight MR. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross talk. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(6): 262–267. [\[DOI\]](#)
- [29] Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, Kroj T. The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2006, 18(11): 3289–3302. [\[DOI\]](#)