

小麦成熟胚脱分化过程中 WRKY 家族转录因子基因及其下游基因的表达

崔琰, 舒文涛, 赵一丹, 陈新建, 陈军营*

河南农业大学农学院, 郑州 450002

摘要: 用 Affymetrix 小麦基因芯片研究了小麦成熟胚在 MS+2,4-D (2 mg·L⁻¹) 培养基上脱分化过程中不同时间点的基因表达变化, 用 NCBI、DATF 和 DRTF 等生物信息学相关网站对基因表达信息进行处理, 并针对 WRKY 家族转录因子相关基因的变化情况进行分析的结果表明: WRKY 家族中有 20 个相关基因在脱分化过程中的不同时点至少发生一次上调或下调表达变化, 变化幅度分别为 2~40 倍和 2~16 倍, 其中 *WRKY6*、*WRKY18*、*WRKY33* 及其下游基因 CA692019、CA660172、CA640435 等与小麦成熟胚脱分化过程可能有密切关系。*WRKY6* 在脱分化的全过程中一直呈下降趋势, 推测 2,4-D 诱导可能导致成熟胚细胞的抗性下降, 从而有利于脱分化的进行。*WRKY33* 基因可能在脱分化初期的信号转导中有作用。不同物种的组织或器官脱分化过程中的转录因子基因表达有差异, 说明其脱分化机制的多样性和复杂性。

关键词: 小麦成熟胚; 脱分化; 基因芯片; WRKY 家族转录因子基因

Expressions of Transcription Factor Genes in WRKY Family and Their Target Genes during Dedifferentiation of Mature Wheat (*Triticum aestivum* L.) Embryos

CUI Yan, SHU Wen-Tao, ZHAO Yi-Dan, CHEN Xin-Jian, CHEN Jun-Ying*

College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: The expression profiles of transcription factor genes in WRKY family and their target genes were analyzed using Affymetrix wheat GeneChip in this study during dedifferentiation of mature wheat (*Triticum aestivum*) embryos which cultured on MS medium supplemented with 2,4-D (2 mg·L⁻¹) at different time points of 2, 6, 12, 24 and 72 h. The information was processed using bioinformatics tools at NCBI, DATF, and DRTF websites. The result showed that there were 20 transcription factor genes in WRKY family and their target genes changed significantly in up- or down-regulation ranged 2–40 or 2–16 times at least one time point in mature wheat embryos dedifferentiation. According to the known functions of WRKY transcription factors and their changed trend, it was predicted that these genes, especially, *WRKY6*, *WRKY18* and *WRKY33* and their target genes CA692019, CA660172 and CA640435, might play roles in dedifferentiation of mature wheat embryos. *WRKY6* was down-regulation in dedifferentiation and this indicated that 2,4-D might induce the low tolerance of mature wheat embryos to the stress of environment and thus facilitate the initial of dedifferentiation and its proceeding. *WRKY33* might play a role in signal transduction in the early dedifferentiation stage. The different expressions of transcription factor genes in tissue and organ in different species implied the diversity and complex in dedifferentiation mechanism.

Key words: mature wheat embryos; dedifferentiation; gene microarray; WRKY transcription factor family

WRKY 蛋白是植物所特有的一类转录因子家族, 因其结构域中的 N 端均含有高度保守的 WRKYGQK 氨基酸序列而得名。它能够与 (T)TGAcc(A/T) 序列 (W-box) 发生特异性作用, 调节启动子中含 W-box 元件的调节基因或功能基因的表达, 从而参与植物的各种防卫反应, 调节植物的发育和代谢。第一个 WRKY 转录因子是由 Ishiguro 和 Nakamura (1994 年) 从白薯中克隆得到, 随后在野燕麦、拟南芥、马铃薯、烟草和水稻中也相

继发现。目前在拟南芥和水稻中分别发现了 74 和 97 个完整的 WRKY 成员。已有的证据表明, WRKY 与植物的胁迫响应、种子表皮发育、果实成熟、蔗糖及赤霉素信号转导等过程关系密切 (Rushton 等

收稿 2009-06-16 修定 2009-07-21

资助 国家转基因植物研究与产业化专项基金 (JY03-B-19-2) 和河南省杰出人才创新基金 (022100090)。

* 通讯作者 (E-mail: chenjunying3978@126.com; Tel: 0371-63558126)。

1996; Robatzek和Somssich 2002; Kalde等2003; Kim和Zhang 2004; Zheng等2006; Oh等2006; Liu等2006; Journot-Catalino等2006; Devaiah等2007)。

脱分化(dedifferentiation)是已分化的植物器官、组织或细胞,在受到创伤或离体培养时,细胞改变原有的分化状态,重新恢复分裂,形成愈伤组织的生物学过程。早在上世纪50年代就开始研究植物细胞脱分化,但由于植物脱分化过程的复杂性和以前研究技术的局限性,几十年来对其研究进展缓慢。而基因芯片技术的应用为脱分化的研究提供了技术平台。本文采用Affymetrix小麦芯片技术在小麦成熟胚脱分化过程中检测到WRKY家族及其下游基因的表达也发生变化,说明该家族成员在小麦成熟胚脱分化过程中可能也有作用。现报道如下。

材料与方法

普通小麦(*Triticum aestivum* L.)品种‘豫麦18’,由本校小麦遗传育种研究室提供。成熟小麦种子经75%的乙醇浸泡30 s后用0.1%的HgCl₂表面消毒15 min,再用无菌水冲洗4~5次,置于含有2 mg·L⁻¹ 2,4-D的MS培养基上培养,以0 h为对照,分别放在培养基上诱导2、6、12、24、72 h后,取样并迅速用液氮处理后放到-80 °C中保存备用。

按Invitrogen公司的Trizol试剂盒操作程序提取总RNA。总RNA纯化按QIAGEN公司的RNeasy Mini试剂盒操作程序进行,用琼脂糖凝胶电泳(180 V, 0.5 h)检测总RNA的28S和18S比例,以评估总RNA的完整性;在波长260 nm处测定总RNA的含量,利用260 nm与280 nm吸光值的比值检测RNA的纯度。

cDNA、cRNA合成按Affymetrix公司试剂盒方法进行。合成cDNA时,模板量为1~8 μg总RNA。合成生物素标记的cRNA时,取12 μL上述cDNA溶液作模板。cDNA、cRNA纯化按基因芯片分析样品纯化操作程序进行。两者的浓度、纯度和质量检测方法同上。

cRNA片段化和芯片杂交扫描检测时,取15 μL浓度为1 μg·μL⁻¹的cRNA,加6 μL 5×片段化缓冲液,加入9 μL无RNA酶水混匀后放入94 °C温浴中35 min,得到长度为35~200 bp的cRNA片段。

按Affymetrix公司提供的配方配制杂交液,然后将杂交液加至经预杂交处理的Affymetrix小麦芯片中,于45 °C、转速为60 r·min⁻¹的摇床上杂交16 h,吸去杂交液,用GeneChip全自动洗涤工作站450(Affymetrix公司)洗涤和染色芯片。用高分辨芯片扫描仪3000(Affymetrix公司)扫描芯片,获得基因表达信号值。

数据分析用GCOS1.2软件读取、处理信号值数据,获得归一化后的信号值、信号检出(P, A, M)以及实验和对照组的比值。为减少芯片分析误差,用Affymetrix wheat GeneChip®对每个时点脱分化重复检测2次,将2次检测的平均值视为矫正值。以不同时间点的荧光信号值除以0 h荧光信号值并取以2为底的对数,对数值≤-1或≥1为有意义下调或上调差异表达,其他视为表达差异不显著。

确认脱分化相关基因时,将查出WRKY家族转录因子名称分别输入NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)、DATF(www.datf.cbi.pku.edu.cn)和DRTF(www.drtf.cbi.pku.edu.cn)等网站找出它们在拟南芥和水稻等植物中的下游基因,然后查阅相关文献资料对上述基因进行再确认。最后在芯片数据中挑出这些基因,对其数据进行分析。

半定量RT-PCR扩增时,将RNA反转录成cDNA,以肌动蛋白(β-actin)为内参,对基因WRKY2及CA744619进行PCR检测。PCR条件为:94 °C预变性5 min;94 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,40个循环;72 °C延伸5 min。4 °C保存。其他2个待测基因的PCR条件除退火温度与内参的不同外(表1),其他均保持一致。

实验结果

1 WRKY家族转录因子基因在脱分化过程中的表达动态

在Affymetrix小麦基因芯片实验中,检测到WRKY家族基因有7个,其下游基因28个,这35个基因中,有20个基因至少在脱分化过程中一个时点发生有意义的表达变化;其中,有6个基因表达上调,5个基因表达下调,还有9个基因在不同时间点分别表达上调或下调;其上调和下调范围分别为2~40倍和1~16倍(表2)。推测这些基因在脱分化过程中可能发生了剧烈的变化。

表1 用于半定量RT-PCR分析的基因引物序列、退火温度和扩增产物

Table 1 The primer sequence, annealing temperature and product size of genes analyzed by semi-quantity RT-PCR

基因ID号	引物(5' → 3')		退火温度/°C	扩增产物/bp
	上游引物	下游引物		
β-actin	GTTCCAATCTATGAGGGATAC	GAACCTCCACTGAGAACAACA	55	421
WRKY2	GGTAAGAAGCCACCAGAG	GAAGCTAACCCAACAACA	54	204
CA744619	CATTGACATCCTTGAGCAG	CATTGTAGGGGTCTCATTTA	52	295

表2 7个WRKY家族转录因子基因及其下游基因在小麦成熟胚脱分化过程中的表达

Table 2 Expression profile of 7 WRKY family transcription factor genes and their target genes during dedifferentiation of mature wheat embryos

GenBank 登录号	0 h	2 h	6 h	12 h	24 h	72 h	基因描述
BJ286829	0	1.1	1.2	0.7	0.7	1.2	WRKY 家族转录因子 2 (<i>WRKY2</i>)
CK207466	0	-0.6	-0.9	<u>-1.7</u>	-0.9	-0.2	WRKY 家族转录因子 3 (<i>WRKY3</i>)
CA623872	0	-0.2	<u>-1.0</u>	-0.8	-0.4	-0.5	WRKY 家族转录因子 6 (<i>WRKY6</i>)
CK203728	0	1.7	-0.3	<u>-1.1</u>	1.3	2.4	WRKY 家族转录因子 18 (<i>WRKY18</i>)
BQ605592	0	<u>-3.2</u>	-0.3	<u>-3.0</u>	<u>-4.0</u>	-0.6	WRKY 家族转录因子 27 (<i>WRKY27</i>)
CD454906	0	1.1	0.5	0.2	1.6	0.5	WRKY 家族转录因子 33 (<i>WRKY33</i>)
BQ838257	0	0.05	<u>-1.0</u>	0.5	2.2	3.8	WRKY 家族转录因子 53 (<i>WRKY53</i>)
CA642823	0	1.9	1.6	2.4	2.3	0.6	病原相关蛋白 1-3 (<i>PR1-3</i>)
BJ287603	0	<u>-1.6</u>	0.02	1.7	1.7	3.9	病原相关蛋白 1 (<i>PR1</i>)
AF384143.1	0	<u>-2.5</u>	-0.4	1.9	0.4	5.3	病原相关蛋白 1 (<i>PR1</i>)
CA692019	0	-0.8	0.4	1.5	2.9	2.5	病原相关蛋白 1 (<i>PR1</i>)
CA744619	0	<u>-1.3</u>	<u>-2.7</u>	<u>-2.5</u>	<u>-2.2</u>	<u>-1.0</u>	NPR1 基因 (<i>NPR1</i>)
CA729979	0	<u>-2.2</u>	<u>-3.4</u>	<u>-3.1</u>	<u>-3.4</u>	<u>-1.3</u>	NPR1 基因 (<i>NPR1</i>)
CK212409	0	0.1	<u>-1.3</u>	0.7	1.9	1.9	GH3 生长素响应蛋白 (<i>DFL-1</i>)
CA660172	0	1.1	2.8	3.8	0.2	3.7	GH3 生长素响应蛋白 (<i>DFL-1</i>)
CD875153	0	<u>-1.0</u>	-0.8	<u>-1.9</u>	2.8	4.3	衰老特异性半胱氨酸蛋白酶 12 (<i>SAG12</i>)
CA679714	0	1.3	0.9	0.5	0.2	0.8	裂源有丝蛋白激酶 4 (<i>MPK4</i>)
CA662794	0	1.3	1.3	1.0	0.9	0.8	裂源有丝蛋白激酶 4 (<i>MPK4</i>)
CA640435	0	1.8	<u>-1.0</u>	1.07	0.8	3.0	衰老特异性半胱氨酸蛋白酶 12 (<i>SAG12</i>)
CK192992	0	<u>-1.7</u>	2.0	3.4	4.4	2.7	衰老特异性半胱氨酸蛋白酶 12 (<i>SAG12</i>)

粗体和下划线标示的数字分别表示有意义上调和下调。

2 WRKY家族转录因子基因和它们的下游基因在脱分化过程中的表达

根据WRKY家族转录因子对下游基因调节情况将上述20个基因分为6类:(1) *WRKY2*在2、6、72 h时间点表达上调; *WRKY3*在12 h时间点表达下调;其下游基因CA642823在0~72 h都表达上调(图1-a),从其表达趋势可以推测在脱分化过程中*WRKY2*对CA642823正调控而*WRKY3*对CA642823进行负调控。(2) *WRKY18*在2、24、72 h时间点表达上调,在6和12 h表达下调;其下游基因CA692019、BJ287603和AF384143.1在6~72 h都

表现为上调,而在2 h时间点表达下调,推测在脱分化过程中*WRKY18*可能正调控CA692019、BJ287603和AF384143.1(图1-b)。(3) *WRKY6*与其下游基因CA729979和CA744619在所有时间点都表达下调(图1-c)。推测在脱分化过程中*WRKY6*正调控CA729979和CA744619,*WRKY6*可能是脱分化过程中一个正调节因子。(4) *WRKY27*对其下游基因CA660172起负调控作用(图1-d)。(5) *WRKY33*对其下游基因CA679714和CA662794,*WRKY53*对其下游基因CD875153(除12 h时间点外)、CA640435、CK192992分别起正调控作用

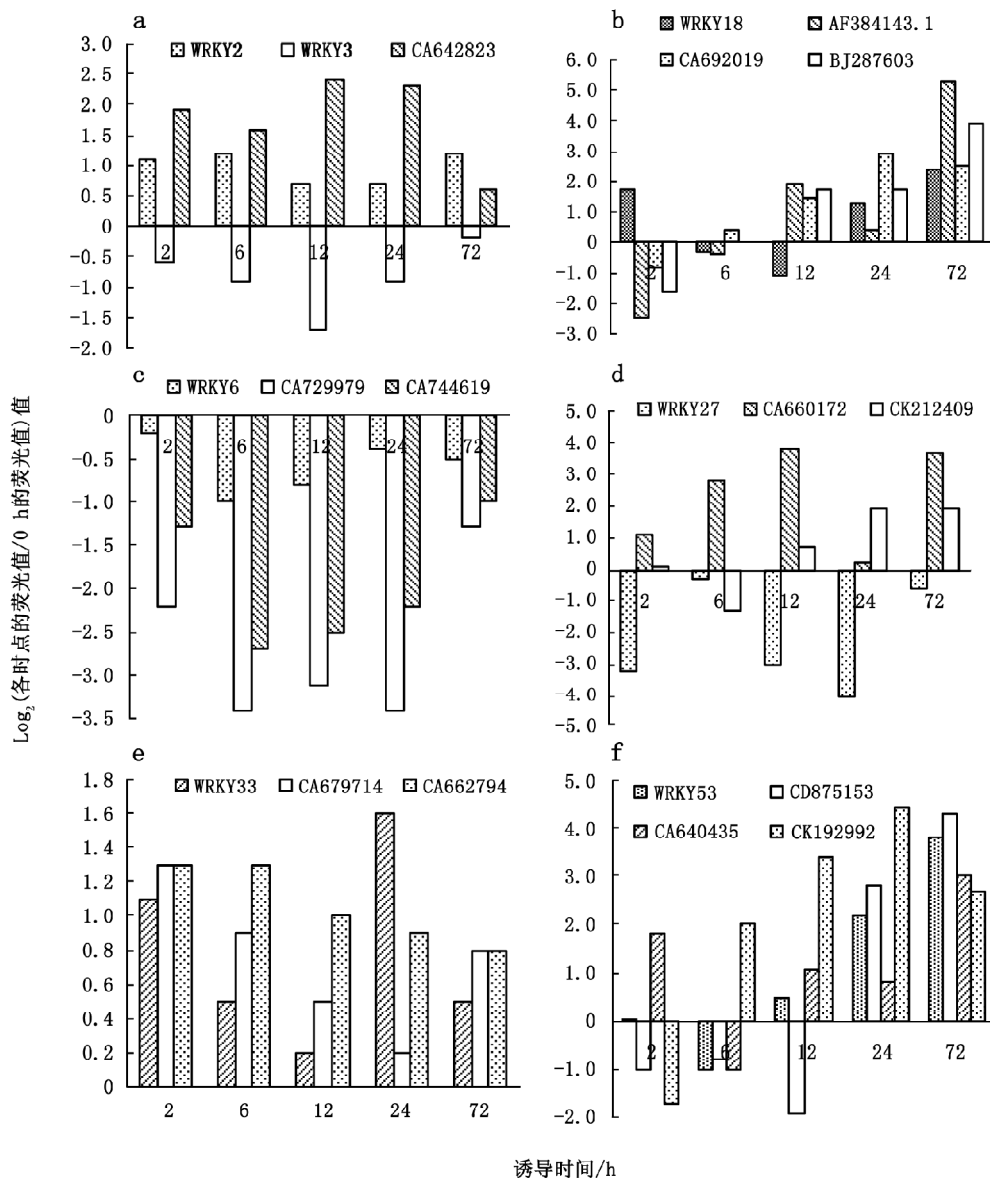


图1 WRKY 家族转录因子及其下游基因在小麦成熟胚脱分化过程中的动态表达

Fig.1 Dynamic expression of WRKY transcription factor family genes and their target genes during dedifferentiation of mature wheat embryos

(图 1-e、f)。

3 目的基因在脱分化过程中表达的半定量RT-PCR 检测

为了检测基因芯片数据的可靠性,对 *WRKY2* 和 *CA744619* 两个基因作半定量RT-PCR检测(图2)表明,该结果与芯片检测结果基本一致,说明芯片结果正确可靠。

讨 论

Oh等(2006)研究辣椒中 *WRKY2* 及 *PR1* 的结果

表明,在创伤处理 3 h 内, *WRKY2* 表现为上调, 3 h 后表达下调; 其下游基因 *PR1* 在处理 0~1.5 h、6~24 h 表达上调, 1.5~6 h 表达下调, 我们芯片的结果与其基本上一致, 由此推测本文中小麦成熟胚离体培养可能会导致成熟胚组织的创伤, 从而启动了 *WRKY2*、*WRKY3* 和 *WRKY18* 共同调节的水杨酸代谢途径, 表明小麦成熟胚脱分化可能也与胁迫响应类似。 *WRKY6* 调控的 *NPR1* 基因是调控植物抗性的关键基因(Robatzek 和 Somssich 2002), 本文结果表明, *WRKY6* 在脱分化的全过程中一直呈下降趋

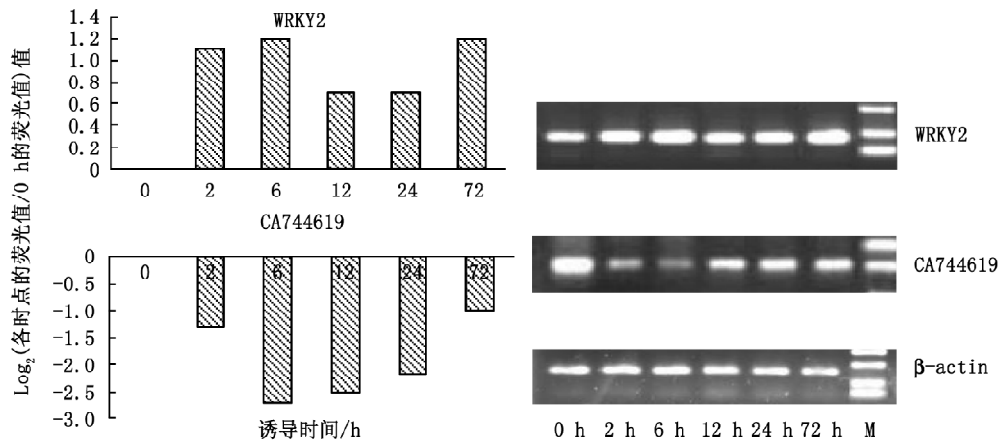


图2 基因芯片检测与RT-PCR检测结果比较
Fig.2 The result comparison of gene chip and RT-PCR

势, 其下游基因CA729979和CA744619都明显呈下调趋势, 推测2,4-D的效应可能会导致成熟胚细胞的抗性下降, 从而有利于脱分化的进行。

Nakazawa (2001)的研究表明, *DFL-1* 基因与植物激素信号传递相关, 本文结果显示, *WRKY27*在脱分化过程中的表达变化可能会影响 *DFL-1* 基因的表达, 从而影响脱分化过程。Andreasson 等(2005)的研究表明, *WRKY33* 与 *MPK4*在信号转导途径中相互协调, 相互促进。从本文结果也可以看到, 在0~2 h它们呈明显的快速上调趋势, 而在2~12 h的响应期间呈明显的下调趋势, 在12 h以后的脱分化过程中它们的表达变化比较复杂, 说明其可能还有其他转录因子对其进行调控, 这种调控作用大于 *WRKY33* 对它的调控。由此可以推测 *WRKY33* 基因可能在脱分化初期的信号转导中起作用。

从上述分析中可以看到, *PR1* 和 *NPR1* 在脱分化过程中的表达相反, 与 *PR1* 相似的基因在脱分化过程中主要表现为上调, 而在芯片中与 *NPR1* 相似的基因主要表现为下调。这与 Che 等(2006)在拟南芥根愈伤组织诱导过程的结果有所不同。Che 等(2006)曾观察到, *PR1* 在形成愈伤组织过程中主要表现为下调, *NPR1* 在愈伤组织形成过程的前半期下调而后半期则上调。这表明愈伤组织的形成过程很复杂, 可能还有大量的转录因子对它们进行调控。*WRKY27* 负调控的一个下游基因激素响应GH3蛋白在脱分化过程中各个时点与0 h都表现为上调, 而 Che 等在拟南芥的研究表明在脱分化的全过程都为下调。据此可以推测, 不同物种的组织或

器官脱分化过程有很大的差异, 其脱分化的途径可能完全不同。

参考文献

- Andreasson E, Jenkins E, Brodersen P, Thorgrimsen S, Petersen NH, Zhu S, Qiu JL, Micheelsen P, Rocher A, Petersen M et al (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J*, 24 (14): 2579~2589
- Che P, Love TM, Frame BR, Wang K, Carriquiry AL, Howell SH (2006). Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus cultures. *Plant Mol Biol*, 62 (1~2): 1~14
- Devaiah BN, Karthikeyan AS, Ragothama KG (2007). *WRKY75* transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 143 (4): 1789~1801
- Ishiguro S, Nakamura K (1994). Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPFI, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and β -amylase from sweet potato. *Mol Gen Genet*, 244 (6): 563~571
- Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, Kroj T (2006). The transcription factors *WRKY11* and *WRKY17* act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 18 (11): 3289~3302
- Kalde M, Barth M, Somssich IE, Lippok B (2003). Members of the *Arabidopsis* *WRKY* group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Mol Plant Microbe Interact*, 16 (4): 295~305
- Kim CY, Zhang S (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces *WRKY* family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J*, 38 (1): 142~151

- Liu X, Bai X, Wang X, Chu C (2006). OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response. *J Plant Physiol*, 164 (8): 969~979
- Nakazawa M, Yabe N, Ichikawa T, Yamamoto YY, Yoshizumi T, Hasunuma K, Matsui M (2001). *DFL1*, an auxin-responsive *GH3* gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *Plant J*, 25: 213~221
- Oh SK, Yi SY, Yu SH, Moon JS, Park JM, Choi D (2006). CaWRKY2, a chili pepper transcription factor, is rapidly induced by incompatible plant pathogens. *Mol Cells*, 22 (1): 58~64
- Robatzek S, Somssich IE (2002). Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev*, 16 (9): 1139~1149
- Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J*, 15 (20): 5690~5700
- Zheng Z, Qamar SA, Chen Z, Mengiste T (2006). *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J*, 48 (4): 592~605