

## 水稻OsWRKY转录因子对非生物胁迫响应的重叠表达特性分析

孙利军<sup>1</sup>, 黄磊<sup>2</sup>, 李大勇<sup>2</sup>, 张慧娟<sup>2</sup>, 宋凤鸣<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>南通大学公共卫生学院生命分析化学研究所, 江苏南通226019; <sup>2</sup>浙江大学生物技术研究所水稻生物学国家重点实验室, 杭州310029

**摘要:** WRKY转录因子是植物一类比较大的基因家族, 在水稻中已鉴定出102个成员。研究表明WRKY转录因子在植物生长发育、抗病耐逆等方面都具有重要的作用。本研究利用基因芯片数据结合实时定量分析, 对水稻OsWRKY转录因子基因在不同的非生物逆境下的表达进行了分析, 发现至少有33个OsWRKY基因同时对任何两种非生物胁迫因子做出响应, 且所选20个基因中, 13个基因可被ABA所诱导。OsWRKY基因这种重叠表达的特性, 预示着这些基因在非生物逆境中具有功能多效性, 对于培育抗逆境水稻品种具有重要的理论与实践意义。

**关键词:** 水稻; OsWRKY转录因子; 非生物胁迫响应; 重叠表达

## Comprehensive Expression Analysis Suggests Overlapping of Rice OsWRKY Transcription Factor Genes during Abiotic Stress Responses

SUN Li-Jun<sup>1</sup>, HUANG Lei<sup>2</sup>, LI Da-Yong<sup>2</sup>, ZHANG Hui-Juan<sup>2</sup>, SONG Feng-Ming<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Analytical Chemistry for Life Science, School of Public Health, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226019, China;

<sup>2</sup>State Key Laboratory for Rice Biology, Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

**Abstract:** WRKY transcription factors as one large and plant-specific gene family have been identified 102 members in rice. Extensive studies have revealed that WRKY transcription factors not only play important roles in plant growth and development, but also have functions in regulation of responses to biotic and abiotic stresses. In the present study, microarray data analyses revealed that about 33 *OsWRKY* genes were overlapping expressed during in various abiotic (salinity, drought, cold, and hot) conditions, 13 among 20 representative *OsWRKY* genes were up-regulated in response to ABA. The results of this study provided not only an evidence for the roles of *OsWRKY* genes associated with crosstalk among abiotic stresses and ABA response pathway, but also a useful reference for the functional analysis of *OsWRKY* genes in stress tolerance.

**Key words:** rice; OsWRKY transcription factors; abiotic stress responses; overlapping expression

水稻是最重要的粮食作物之一, 全世界60%的人口以水稻为主食。在水稻的整个生育期内, 经常会受到干旱、高盐、低温等各种非生物胁迫的影响, 这些胁迫通常会造成细胞的损伤, 进而严重影响水稻的生长发育和产量。研究发现, 当植物经受干旱、高盐、低温等各种非生物胁迫时, 会在生理生化及分子水平上作出相应的变化以适应和抵御各种逆境, 其中基因表达的转录调控在水稻适应环境和抵御逆境胁迫中起重要作用。因此, 可以从基因表达水平入手来揭示水稻逆境胁迫抗(耐)性这一复杂的生物学机制。

WRKY转录因子是植物一类比较大的基因家族, 在这类基因的蛋白序列中包括一个或两个保守的WRKYGQK序列(由此而命名为WRKY), 并且C端通常有锌指结构(Ulker和Somssich 2004; Rush-

ton等2010)。研究发现, WRKY蛋白能够与启动子序列中的W-box结合, 从而调控下游靶标基因的表达。WRKY转录因子不仅参与植物的生长发育, 而且在植物生物与非生物胁迫反应中具有重要的作用(Pandey和Somssich 2009; Rushton等2010)。

WRKY转录因子在干旱、盐胁迫、冷害、高热等非生物胁迫反应中具有重要的调控作用。研究发现过量表达拟南芥中的*AtWRKY25*和*AtWRKY33*

收稿 2014-06-19 修定 2014-09-03

资助 国家转基因重大专项(2011ZX08009-003-001)、国家自然科学基金项目(30971880和31400315)、教育部高校博士点专项基金(20120101110070)、江苏省自然科学基金(BK20130389)、南通大学预研项目(13ZY012)、南通大学博士引进人才启动基金(13R41)和南通大学研究生科技创新计划项目(YKC13043)。

\* 通讯作者(E-mail: fmsong@zju.edu.cn; Tel: 0571-88982481)。

能够增强植物对高盐的胁迫反应(Jiang和Deyholos 2009)。拟南芥中的*AtWRKY75*、*AtWRKY6*、*AtWRKY42*与磷酸盐胁迫反应有关(Devaiah等2007; Chen等2009), 如当*AtWRKY75*基因沉默时, 植株对磷酸盐缺乏的敏感性增加(Devaiah等2007), 而过量表达*AtWRKY6*转基因, 植株对磷酸盐缺乏时也表现得易感(Chen等2009)。在拟南芥中过量表达*GmWRKY13*、*GmWRKY21*和*GmWRKY54* 3个大豆基因, 发现过量表达*GmWRKY21*的转基因植株增强了对冷害的抵抗能力, 过表达*GmWRKY54*的植株对干旱和盐害的耐胁迫能力增强, 而过表达*GmWRKY13*的转基因植株对盐害和甘露醇胁迫的敏感性增加(Zhou等2008)。过量表达水稻*OsWRKY11*可以增强水稻对高热和干旱胁迫的耐性(Wu等2009), 外源表达*OsWRKY45*可增强拟南芥对干旱胁迫的耐性(Qiu和Yu 2009)。这些研究表明WRKY转录因子在植物非生物逆境中具有重要的作用。

通过生物信息学的方法预测在水稻基因组中含有102个WRKY转录因子(Wu等2005), 但是作为一个庞大转录因子家族, 目前对水稻WRKY转录因子在植物抗逆反应中的作用及其机制的认识仍比较薄弱。表达谱分析有助于对基因功能作初步的推测, 如拟南芥WRKY转录调控因子的功能研究从表达谱的分析开始, 成功地预测了在植物耐逆和抗病反应中发挥重要生物学功能的成员基因(Cutler等2010)。本研究利用基因芯片数据结合实时定量分析, 对水稻*OsWRKY*转录因子在不同的非生物逆境下表达进行了研究, 发现至少有33个*OsWRKY*基因同时对任何两种非生物胁迫因子做出响应, 这种重叠表达的特性, 预示着这些基因的功能多效性。

## 材料与方法

### 1 基因芯片数据分析

利用水稻基因芯片公共数据库[Rice Oligonucleotide Array Database (ROAD) (<http://www.ricearray.org/>)], 对多种非生物胁迫下*OsWRKY*家族基因的反应进行分析。通过搜索, 我们在芯片库中发现与84个*OsWRKY*基因相对应的探针, 一个探针代表一个*OsWRKY*基因, 我们提取了84个*OsWRKY*基因在不同非生物胁迫下的表达强度[ $\log_2(\text{signal in-$

tenacity)], 使用的基因芯片实验序列号为GSE6901(高盐、干旱、低温)和GSE14275(高热)。差异表达的*OsWRKY*基因是指相对于对照, 表达强度差值大于1, 即为上调表达, 当差值小于-1即为下调表达, 并对这些差异表达的基因进行显著性检验。表达强度差值采用公式 $\log_2(\text{treated-signal intensity}/\text{mock-signal intensity}) = \log_2(\text{treated-signal intensity}) - \log_2(\text{mock-signal intensity})$ 进行计算。

### 2 植物材料和处理

为了验证胁迫响应*OsWRKY*基因的表达与芯片实验的一致性, 供试水稻(*Oryza sativa* L.)品种‘原丰早’经过催芽后种植在塑料营养钵(直径8 cm, 高10 cm, 每盆播种10株), 置于培养箱中培养。幼苗的生长条件是: 28/26 °C, 16 h光照/8 h黑暗。一周龄的水稻幼苗用于非生物(高盐、干旱、低温、高热)胁迫和ABA处理。对于高盐处理, 将幼苗转移至200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液中放置在28 °C培养箱中持续3 h。对于干旱处理, 将幼苗转移至双层吸水纸上放置在28 °C培养箱中持续3 h。对于低温处理, 将幼苗转移至水中置于4 °C冰箱中3 h。对于高热处理, 将幼苗转移至水中放置在42 °C培养箱中持续3 h。对于ABA处理, 将水稻幼苗转移至水中, 叶面喷施 100 μmol·L<sup>-1</sup> ABA放置在28 °C培养箱中持续3 h。对照处理, 将水稻幼苗转移至水中放置在28 °C培养箱中持续3 h, 所有处理的叶片收集于液氮冷冻后于-70 °C保存。

### 3 水稻总RNA的提取

水稻叶片总RNA的提取主要采用Trizol法。将冻存的叶片组织经液氮研磨至粉末后, 移入到事先加好1 mL Trizol的1.5 mL离心管中, 充分混匀, 在15~30 °C下温育5 min, 再加入500 μL 氯仿, 盖上管盖, 用手剧烈摇晃或涡旋振荡15 s后在室温放置10 min, 4 °C 12 000×g离心10 min, 将上层水相移入新管中再加入200 μL 氯仿, 用手剧烈摇晃或涡旋振荡15 s后在室温放置10 min, 4 °C 12 000×g离心10 min, 将上层水相移入新管中, 加入异丙醇于室温沉淀10 min, 4 °C 12 000×g离心收集RNA沉淀后, 用75% DEPC水处理的乙醇洗涤沉淀并重复离心, 室温放置5 min晾干, 加入DEPC处理过的超纯灭菌水溶解RNA沉淀。将提取的RNA溶液分装成小份贮存于-70 °C备用。核酸浓度及纯度测定在紫外

分光光度计(Eppendorf Biophotometer plus, Germany)上按相应的浓度测定程序进行。

#### 4 cDNA的合成

cDNA的第一条链的合成采用AMV反试剂盒(TaKaRa), 在0.25 mL PCR管中, 反应体系为10  $\mu$ L, 依次加入下列组分: 1  $\mu$ L 10 $\times$ RT buffer, 0.5  $\mu$ L Oligo dT-adaptor primer, 1  $\mu$ L dNTP, 2  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>, 0.25  $\mu$ L RNase inhibitor, 0.5  $\mu$ L AMV Reverse Transcriptase, 0.5  $\mu$ g RNA, 加DEPC处理水至10  $\mu$ L。轻微混合均匀, 反应程序为: 30  $^{\circ}$ C 10 min, 50  $^{\circ}$ C 30 min, 95  $^{\circ}$ C 5 min, 5  $^{\circ}$ C 5 min, 新合成的cDNA的第一条链在-20  $^{\circ}$ C保存。

#### 5 实时定量PCR

为了验证基因芯片*OsWRKY*基因在不同胁迫下的表达, 我们设计了20个水稻*OsWRKY*基因以及*Actin1* (Os05g36290)特异性引物(表1)进行分析。实时定量PCR在CFX96 Real-Time System上进行。反应采用SYBR premix Ex Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa)产品。按下列组份配制PCR反应液(反应液配制在冰上进行): 10  $\mu$ L SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (2 $\times$ ), 0.5  $\mu$ L PCR正向引物(10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>), 0.5  $\mu$ L PCR反向引物(10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>), 0.5  $\mu$ L cDNA模板, dH<sub>2</sub>O (灭菌蒸馏水)补足至20  $\mu$ L。反应程序为95  $^{\circ}$ C 10 min, 60  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C延伸40 s, 进行40个循环, 用2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>方法分析。

表1 实时定量引物

Table 1 The real-time PCR primers

位点	基因名称		引物序列(5'→3')	扩增片段/bp
Os01g09100	<i>OsWRKY003</i>	正向	GGAATCGTCGTTCTGAACGCTGAA	71
		反向	GGCGGTACAACATAACAAGCAACCA	
Os01g14440	<i>OsWRKY004</i>	正向	ATCATCGCCGATGGGTGCCAAT	60
		反向	AGGGTTTCCCTTCGCCATCTTCTG	
Os01g40260	<i>OsWRKY007</i>	正向	TGGGCTTCCACTCAAAGCAGCA	122
		反向	TCCCCTGTCCATCTTGCCAAGATT	
Os01g43650	<i>OsWRKY010</i>	正向	GGGTATTGGACCCCTCCG	114
		反向	CTGGCTGTCGTGGCTCGT	
Os01g51690	<i>OsWRKY013</i>	正向	TTTTTCGTCGCGGGATCAGTCAC	88
		反向	GCTGCACATCAAGCTAAGCCACAG	
Os01g60490	<i>OsWRKY017</i>	正向	ACAGCTCCAGTGAATGTTC	83
		反向	TTCATAGCGTTCTCCTG	
Os01g60640	<i>OsWRKY021</i>	正向	TTGACGCATAACTGACGCACTTCT	69
		反向	CCATTCTGTTACATGGGACATGGT	
Os01g61080	<i>OsWRKY022</i>	正向	AATCCTCTGCTCGTCCTTGC	82
		反向	GCGTCGACGCACTTGACTG	
Os02g08440	<i>OsWRKY025</i>	正向	AGCCTGGTGGTAAAAGATGGGTA	89
		反向	CATCTGAAGTAGGCTCTTGGGCAG	
Os02g26430	<i>OsWRKY027</i>	正向	GTGGCGTCCATGCTCAACC	83
		反向	GCCTCATCCTCCTCCTCTG	
Os03g21710	<i>OsWRKY032</i>	正向	GTGTGGCGAAATATGGGCAGA	67
		反向	TGCACCTGTAGTAGCTCCTTGAT	
Os05g27730	<i>OsWRKY051</i>	正向	AGACGCTGAGCGACATCGACAT	93
		反向	ATTACCTGGGTTGGGGTTGCC	
Os05g39720	<i>OsWRKY052</i>	正向	CCTTCTCCAGCCTGCTCAG	167
		反向	CGTCGGCGATGGGAATAAA	
Os05g40080	<i>OsWRKY056</i>	正向	TGCTGACGAACCGATCATGG	61
		反向	TTCAGATCCGCAAGAAGCTCC	
Os05g46020	<i>OsWRKY057</i>	正向	CGAGATTCTTGACGACGGCT	135
		反向	TCCTTGCCCGCTCCACCCT	
Os05g49620	<i>OsWRKY060</i>	正向	ACGCCGCTTCAAGAAGAGGAA	131
		反向	GCCAAGAATGTCTTCTGGCCGTA	

表1 (续)

位点	基因名称		引物序列(5'→3')	扩增片段/bp
Os05g50610	<i>OsWRKY061</i>	正向	CTCATCACGCCCTACTCCA	101
		反向	TGCTTCACGGCAGCATCG	
Os06g44010	<i>OsWRKY066</i>	正向	TGAGCAGACTTCCTGAGC	95
		反向	CCACGAGAACCTTAATCGG	
Os11g02470	<i>OsWRKY087</i>	正向	CAAGAAGCGGTGGCAGTG	80
		反向	TGGTGTACGAGGAGGAGA	
Os11g02530	<i>OsWRKY090</i>	正向	GAAGTACACGCCGGTAACAGCA	79
		反向	TGCAATCCTCAACGACGACTGATG	
Os11g29870	<i>OsWRKY092</i>	正向	CAAATTCCTCAAGGAGCTACTACCG	150
		反向	TCGAAGTTGTCGTTGGATTCTCG	
Os05g36290	<i>Actin1</i>	正向	ATCCTTGTATGCTAGCGGTCGA	118
		反向	ATCCAACCGGAGGATAGCATG	

## 结果与讨论

### 1 水稻*OsWRKY*家族基因对非生物逆境因子响应

高盐、干旱、低温和高热是最普遍的非生物逆境因子,常会对水稻生长发育造成严重的影响,进而导致水稻的减产。我们利用基因芯片数据GSE6901和GSE14275研究了*OsWRKY*家族基因对高盐、干旱、低温、高热胁迫的响应。本研究参照Wu等(2005)对*OsWRKY*家族基因的命名的编号。基因芯片作为一种先进的、大规模、高通量检测技术,从转录水平入手,能较全面地揭示逆境

胁迫下整个基因组的表达水平的表达情况,有助于寻找胁迫响应的关键基因,进而为基因的功能研究奠定基础。本研究利用公共数据库中的基因芯片数据,提取分析了*OsWRKY*家族基因对不同非生物的响应。结果表明,相对于对照,至少67个*OsWRKY*基因对一种非生物胁迫差异表达(表2)。干旱胁迫中,共有30个基因上调表达,9个基因下调表达;高盐胁迫中,共有32个基因上调表达,5个基因下调表达;低温胁迫下,共有19个基因上调表达,3个基因下调表达;高热胁迫下,14个基因上调表达,12个基因下调表达(表2)。

表2 *OsWRKY*基因对不同非生物胁迫响应Table 2 Expressions of *OsWRKY* genes in response to different abiotic stress conditions

基因名称	位点	对照	干旱	高盐	低温	高热
<i>OsWRKY001</i>	Os01g08710	0	-0.96	-0.30	-1.38	-0.20
<i>OsWRKY002</i>	Os01g09080	0	-1.32	0.09	0.16	0.64
<i>OsWRKY003</i>	Os01g09100	0	1.35	2.39	0.85	1.28
<i>OsWRKY004</i>	Os01g14440	0	2.65	1.96	1.62	-0.69
<i>OsWRKY007</i>	Os01g40260	0	3.43	2.87	2.16	0.76
<i>OsWRKY008</i>	Os01g40430	0	-0.17	2.00	-0.24	0.33
<i>OsWRKY010</i>	Os01g43560	0	2.63	1.33	-0.37	0.41
<i>OsWRKY011</i>	Os01g46800	0	-1.00	0.22	0.18	-2.18
<i>OsWRKY012</i>	Os01g47560	0	1.55	1.14	-0.26	-1.59
<i>OsWRKY013</i>	Os01g51690	0	1.82	1.24	2.22	1.02
<i>OsWRKY015</i>	Os01g53260	0	0.90	1.53	-0.93	-2.80
<i>OsWRKY017</i>	Os01g60490	0	2.80	3.78	-0.82	0.84
<i>OsWRKY018</i>	Os01g60520	0	0.06	2.47	1.01	0.54
<i>OsWRKY019</i>	Os01g60540	0	1.18	1.68	-0.08	-0.50
<i>OsWRKY020</i>	Os01g60600	0	1.15	-0.19	2.11	0.25
<i>OsWRKY021</i>	Os01g60640	0	1.00	-0.28	2.26	-0.25
<i>OsWRKY022</i>	Os01g61080	0	2.37	3.09	1.29	-0.29



表2 (续)

基因名称	位点	对照	干旱	高盐	低温	高热
<i>OsWRKY024</i>	Os01g74140	0	-0.38	-1.44	-0.60	-1.05
<i>OsWRKY025</i>	Os02g08440	0	2.28	2.57	2.82	-0.54
<i>OsWRKY026</i>	Os02g16540	0	-0.17	1.00	0.88	1.15
<i>OsWRKY027</i>	Os02g26430	0	5.05	3.56	-0.05	0.73
<i>OsWRKY029</i>	Os02g47060	0	-1.39	-0.19	-0.74	2.03
<i>OsWRKY030</i>	Os02g53100	0	-1.36	-0.09	-0.19	0.09
<i>OsWRKY032</i>	Os03g21710	0	2.27	1.85	0.98	0.48
<i>OsWRKY035</i>	Os03g53050	0	-1.10	-0.25	-0.30	-0.48
<i>OsWRKY036</i>	Os03g55164	0	2.68	0.51	-0.21	0.01
<i>OsWRKY037</i>	Os03g55080	0	1.50	0.53	0.07	-0.99
<i>OsWRKY038</i>	Os03g58420	0	-3.09	-2.01	-0.35	1.79
<i>OsWRKY040</i>	Os04g21950	0	1.23	0.78	-0.87	0.15
<i>OsWRKY041</i>	Os04g39570	0	0.62	0.11	-1.89	0.00
<i>OsWRKY042</i>	Os04g46060	0	0.64	0.67	0.08	-2.37
<i>OsWRKY045</i>	Os05g03900	0	-3.44	-1.07	-0.02	-0.32
<i>OsWRKY046</i>	Os05g04640	0	1.25	-0.69	-0.74	-0.95
<i>OsWRKY047</i>	Os05g09020	0	0.47	0.86	1.51	-0.30
<i>OsWRKY048</i>	Os05g14370	0	-1.19	1.49	-0.26	1.50
<i>OsWRKY049</i>	Os05g25700	0	1.96	0.59	0.94	0.46
<i>OsWRKY050</i>	Os05g25770	0	0.02	-0.27	2.87	-1.16
<i>OsWRKY051</i>	Os05g27730	0	1.21	1.04	1.10	-1.07
<i>OsWRKY052</i>	Os05g39720	0	2.44	3.45	0.19	0.15
<i>OsWRKY053</i>	Os05g40060	0	0.77	2.33	0.06	0.62
<i>OsWRKY056</i>	Os05g40080	0	2.16	2.99	3.26	-1.22
<i>OsWRKY057</i>	Os05g46020	0	1.55	2.01	1.92	-0.24
<i>OsWRKY059</i>	Os05g49210	0	-0.38	-0.56	-0.30	1.97
<i>OsWRKY060</i>	Os05g49620	0	0.22	1.63	0.61	0.72
<i>OsWRKY061</i>	Os05g50610	0	4.27	2.27	0.08	0.51
<i>OsWRKY062</i>	Os05g50700	0	1.63	2.16	2.62	-0.16
<i>OsWRKY063</i>	Os06g05380	0	-0.32	-0.64	-0.17	-1.54
<i>OsWRKY064</i>	Os06g06360	0	0.52	2.46	-0.20	-1.30
<i>OsWRKY066</i>	Os06g44010	0	2.38	4.46	2.31	0.69
<i>OsWRKY069</i>	Os07g27670	0	0.24	0.81	-1.61	-0.56
<i>OsWRKY072</i>	Os07g48260	0	-0.89	-0.65	0.19	-2.53
<i>OsWRKY073</i>	Os08g13840	0	-0.09	1.04	-0.21	-0.44
<i>OsWRKY074</i>	Os08g17390	0	-1.69	-0.27	-0.03	1.43
<i>OsWRKY075</i>	Os08g29660	0	-1.03	-0.76	-0.25	0.38
<i>OsWRKY076</i>	Os08g38990	0	1.45	1.86	-0.91	-2.20
<i>OsWRKY077</i>	Os09g09360	0	-0.85	-0.83	0.79	1.14
<i>OsWRKY080</i>	Os09g16510	0	-0.25	-0.18	1.40	-2.18
<i>OsWRKY082</i>	Os09g25070	0	0.23	2.09	0.52	0.08
<i>OsWRKY083</i>	Os09g30400	0	0.34	0.25	-0.12	-1.30
<i>OsWRKY086</i>	Os10g42850	0	-2.55	-0.93	0.40	2.44
<i>OsWRKY087</i>	Os11g02470	0	0.91	2.46	1.91	2.01
<i>OsWRKY090</i>	Os11g02530	0	0.38	0.45	2.42	3.28
<i>OsWRKY092</i>	Os11g29870	0	2.55	2.70	0.37	0.63
<i>OsWRKY094</i>	Os11g45850	0	1.59	1.41	1.77	0.57
<i>OsWRKY096</i>	Os12g02540	0	1.59	-1.06	0.68	1.14
<i>OsWRKY097</i>	Os12g02450	0	2.04	-1.90	0.92	0.89
<i>OsWRKY100</i>	Os12g02440	0	-0.24	-0.25	0.15	2.00

## 2 水稻*OsWRKY*家族基因的重叠表达特性研究

对不同胁迫条件下的*OsWRKY*基因表达特性进行分析,发现至少有33个*OsWRKY*基因同时对任何两种非生物胁迫因子做出响应(图1-A),在这些基因中,17个*OsWRKY*基因同时对任意3种非生物胁迫因子做出响应,16个*OsWRKY*基因同时对任意2种非生物胁迫因子做出响应(图1-B)。实时定量PCR证实,在高盐、干旱、低温和高热胁迫下选择的20个*OsWRKY*基因表达和基因芯片数据基本一致(图2)。这种重叠表达的特性,预示着这些基因的功能多效性。这种生物学功能的多效性对于*OsWRKY*转录因子的转基因利用极为有利,即有可能通过改变一个*OsWRKY*转录因子基因的表达或其蛋白活性达到改良多个生物学性状。且多个*OsWRKY*基因同时对非生物逆境做出响应,预示着这些基因在植物抗逆作用中的相似性及其复杂的调控网络。

## 3 水稻*OsWRKY*家族基因对ABA响应

ABA是一种重要的与非生物胁迫相关的信号分子,研究发现高盐、干旱、低温可以使植物内源的ABA积累,ABA通过调节一些与胁迫相关的基因上调表达,从而减轻环境胁迫对植物的损伤(Cutler等2010; Wasilewska等2008)。在ABA信号响应的机制中,拟南芥中一组WRKY转录因子(*AtWRKY18*、*AtWRKY40*、*AtWRKY60*)至少在两种ABA受体:ABAR和PYR/PYL/RCAR复合体的信号通路下游发挥作用(Shang等2010; Antoni等2008)。我们进一步研究了选择的20个*OsWRKY*基因对ABA处理3 h的响应,结果发现共有13个*OsWRKY*基因(*OsWRKY003*、*OsWRKY004*、*OsWRKY010*、*OsWRKY013*、*OsWRKY017*、*OsWRKY021*、*OsWRKY022*、*OsWRKY032*、*OsWRKY060*、*OsWRKY061*、*OsWRKY066*、*OsWRKY087*和*OsWRKY092*)上调表达(图3)。这些*OsWRKY*基因可能作为ABA信号通路中的关键调控因子,在水稻非生物胁迫响应中发挥重要的作用。

*OsWRKY*转录因子作为水稻一个比较大的转录因子家族,目前对其在水稻抗逆反应中的作用机制研究还不多。本研究表明:多个*OsWRKY*基因同时对多种非生物胁迫因子及ABA信号响应的重叠表达特性,预示着这些基因在非生物逆境中的功能多效性以及相互间的协同调控作用。这种生

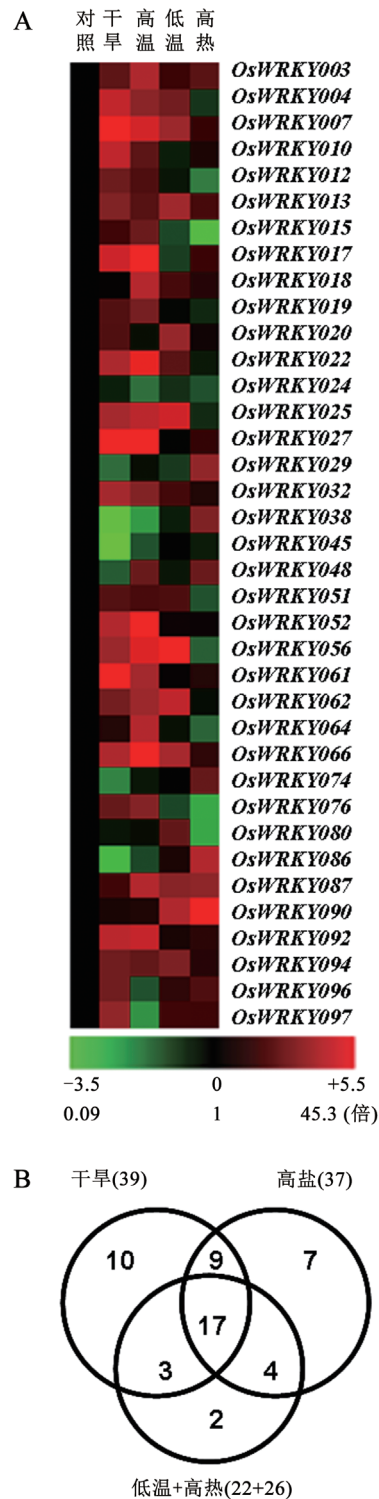


图1 *OsWRKY*基因对非生物胁迫响应的重叠表达特性  
Fig.1 Overlapping expressions of *OsWRKY* genes in response to various abiotic stress conditions

A: 热图表示在至少两种非生物胁迫下*OsWRKY*基因的差异表达,表达强度差值用于TreeView,颜色的变化表示表达强度差值,红色表示表达上调,绿色表示表达下调; B: 圆图表示在不同非生物胁迫下*OsWRKY*基因特异表达或重叠表达的基因的个数。

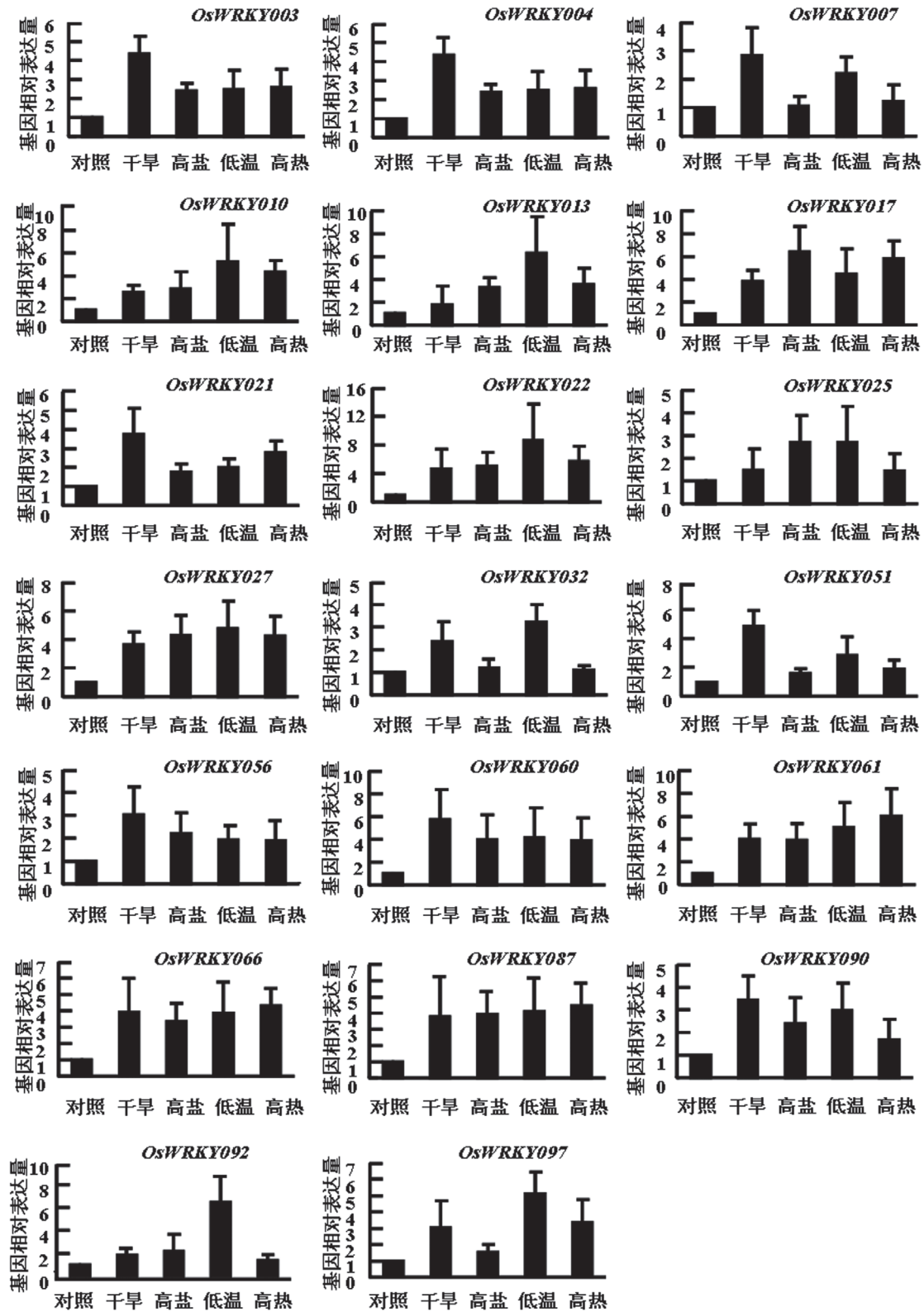
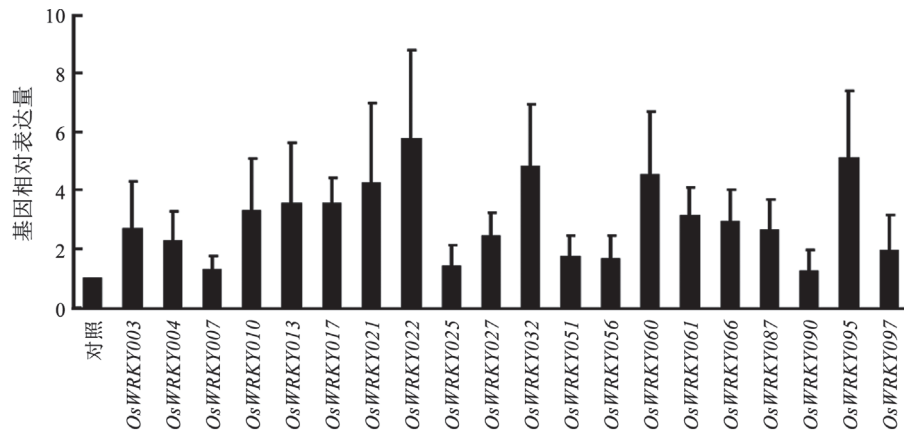


图2 20个选择的*OsWRKY*基因在不同非生物胁迫下的表达

Fig.2 Real-time PCR analysis of 20 representative *OsWRKY* genes to validate differential expression during dry, salt, cold and hot Y轴表示相对表达量, X轴表示非生物胁迫条件, 误差线表示3次重复的标准差。

图3 *OsWRKY*基因对ABA的响应Fig.3 Expressions of *OsWRKY* genes in response to ABA

物学功能的多效性对于OsWRKY转录因子的应用极为有利, 即有可能通过改变一个OsWRKY转录因子基因的表达或其蛋白活性达到改良多个生物学性状的目的, 对于培育抗逆境水稻新品种具有重要的理论与实践意义。

### 参考文献

- Antoni R, Rodriguez L, Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Rodriguez PL (2011). News on ABA transport, protein degradation, and ABFs/WRKYs in ABA signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 14 (5): 547-553
- Chen YF, Li LQ, Xu Q, Kong YH, Wang H, Wu WH (2009). The WRKY6 transcription factor modulates *PHOSPHATE1* expression in response to low Pi stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21 (11): 3554-3566
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010). Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol*, 61 (1): 651-679
- Devaiah BN, Karthikeyan AS, Raghothama KG (2007). WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 143 (4): 1789-1801
- Jiang YQ, Deyholos MK (2009). Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible *WRKY25* and *WRKY33* transcription factors in abiotic stresses. *Plant Mol Biol*, 69: 91-105
- Pandey SP, Somssich IE (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol*, 150 (4): 1648-1655
- Qiu YP, Yu DQ (2009). Over-expression of the stress-induced *OsWRKY45* enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Environ Exp Bot*, 65 (1): 25-47
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ (2010). WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci*, 15 (5): 247-258
- Shang Y, Yan L, Liu ZQ, Cao Z, Mei C, Xin Q, Wu FQ, Wang XF, Du SY, Jiang T et al (2010). The Mg-chelatase H subunit of *Arabidopsis* antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. *Plant Cell*, 22 (6): 1909-1935
- Ulker B, Somssich IE (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol*, 7 (5): 494-498
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frey dit Frey N, Leung J (2008). An update on abscisic acid signaling in plants and more... *Mol Plant*, 1: 198-217
- Wu KL, Guo ZJ, Wang HH, Li J (2005). The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins. *DNA Res*, 12 (1): 9-26
- Wu X, Shiroto Y, Kishitani S, Ito Y, Toriyama K (2009). Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing *OsWRKY11* under the control of *HSP101* promoter. *Plant Cell Rep*, 28 (1): 21-30
- Zhou QY, Tian AG, Zou HF, Xie ZM, Lei G, Huang J, Wang CM, Wang HW, Zhang JS, Chen SY (2008). Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Biotechnol J*, 6 (5): 486-503