

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.02.021

徐展,林良斌. 受非生物胁迫和稻瘟病胁迫双重诱导的 OsWRKY 转录因子基因表达特征分析[J]. 广西植物,2014,34(2):248—255

Xu Z, Lin LB. Gene expression analysis of five OsWRKY transcription factors induced by abiotic and rice blast stresses[J]. *Guihaia*, 2014, 34(2):248—255

受非生物胁迫和稻瘟病胁迫双重诱导的 OsWRKY 转录因子基因表达特征分析

徐 展, 林良斌*

(云南农业大学 农学与生物技术学院, 昆明 650201)

摘 要: OsWRKY 转录因子在水稻非生物胁迫和抗病反应中具有相当重要的调节作用。为阐明其调节作用提供依据,研究了疑似功能广泛的 OsWRKY 转录因子表达谱,采用五个 OsWRKY 转录因子基因,即 OsWRKY7、OsWRKY11、OsWRKY30、OsWRKY70 和 OsWRKY89,利用 real-time PCR 研究各种非生物胁迫和稻瘟菌胁迫诱导表达特征,以及各种激素对 OsWRKY 表达量的影响。所采用的五个基因均受到稻瘟菌胁迫的诱导,而且各种非生物胁迫也能不同程度地诱导其表达。在各个激素处理下,有些被诱导或被抑制,也有未受影响。五个 OsWRKY 基因均有可能参与稻瘟病胁迫响应。其中 OsWRKY7 和 OsWRKY70 可能是在 JA 和 SA 相互拮抗调控下参与,OsWRKY89 可能是通过非本研究涉及的其他激素途径参与。在非生物胁迫方面,OsWRKY7 可能通过 ABA 途径参与干旱、高盐和极端温度胁迫;OsWRKY11 有可能参与高盐胁迫;OsWRKY30 有可能参与高盐和高温胁迫;OsWRKY70 可能参与高盐、干旱和极端温度胁迫;OsWRKY89 可能参与高温胁迫,但并不是通过本研究所涉及的四种激素途径。

关键词: OsWRKY 转录因子; 稻瘟病胁迫; 非生物胁迫; 实时定量 PCR; 基因表达

中图分类号: Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)02-0248-08

Gene expression analysis of five OsWRKY transcription factors induced by abiotic and rice blast stresses

XU Zhan, LIN Liang-Bin*

(College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China)

Abstract: OsWRKY transcription factors have vital function in respond to adverse environment and pathogens in rice. In order to elucidate the regulatory role of these genes, we used Realtime-PCR to investigate expression profiles of five OsWRKY transcription factors (OsWRKY7, OsWRKY11, OsWRKY30, OsWRKY70 and OsWRKY89) under abiotic stresses and pathogen challenges. The expression characteristics of hormone treatments were also investigated in order to study which hormone way they were functioning through. All five OsWRKY could be induced by pathogen inoculation and all these genes had different rate inductions under abiotic stress. In each hormone treatment, some were induced, others were suppressed, and still others unaffected. Five OsWRKY genes were all likely to be involved in the infection process of rice blast stress. OsWRKY7 and OsWRKY70 might participate in the resistance to rice blast by JA and SA in a mutually antagonistical manner; OsWRKY89 also might be involved in it, but not through the four hormone ways studied in this research. In the aspect of abiotic stress, OsWRKY7 might participate in drought, high salt and extreme temperature stresses through the ABA way; OsWRKY11 had the possibility to be involved in high

收稿日期: 2013-08-23 修回日期: 2013-10-25

基金项目: 中国科学院转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08009-066B)

作者简介: 徐展(1986-), 男, 浙江浦江人, 硕士, 主要从事植物分子生物学研究, (E-mail) gxuxuzhan@sina.com。

*通讯作者: 林良斌, 博士, 教授, 主要从事植物分子生物学研究, (E-mail) binliangbin@163.com。

salt stress; OsWRKY30 was possible to participate in high salt and hot stresses; OsWRKY70 might be involved in high salt, drought and extreme temperature stresses; OsWRKY89 might be involved in hot stress, but not through the four hormone ways studied in this research.

Key words: OsWRKY transcription factor; rice blast stress; abiotic stress; real-time PCR; gene expression

各种非生物胁迫(高盐、干旱、高温和寒冷)是造成水稻减产的主要非生物因素,而稻瘟病是最具毁灭性的水稻病害之一(Jena, 2006)。研究水稻与各种非生物胁迫以及稻瘟菌互作的分子机制对于品种遗传改良和抗病性的合理利用非常必要。在植物抵抗非生物胁迫和抗病防御反应中,转录因子对下游相关基因的转录调控起关键作用。WRKY 蛋白是主要存在于植物中的一类转录因子(Somssich, 2004)。WRKY 蛋白可与含(T)TGACC(A/T)(W 盒, W-box)核心序列的 DNA 特异结合(Chen *et al.*, 2001),它含有 1 或 2 个 WRKY 结构域,该结构域约含有 60 个氨基酸残基,每个结构域的 N 端含有保守的七 WRKYGQK, C 端为 C2H2 或 C2HC 的锌指纹。根据 WRKY 结构域数目和锌指纹结构组成,可将 WRKY 蛋白分成 3 组:第一组含 2 个 WRKY 结构域,锌指纹模式为 C2H2;第二和第三组含 1 个 WRKY 结构域,前者的锌指纹模式为 C2H2,后者则为 C2HC(Eulgem *et al.*, 2000)。拟南芥中 WRKY 家族有 72~74 个成员(Eulgem *et al.*, 2000);水稻中有 100 余个成员(Guo *et al.*, 2005),主要分布于 1 号和 5 号染色体上。许多 WRKY 的表达被病原侵染、模拟接种(Barth *et al.*, 2003)和水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)等植物激素所诱导(Jiang *et al.*, 2008)。WRKY 转录因子已被证实参与植物的衰老、抗胁迫能力(Brader *et al.*, 2004)及生长发育的调控(Johnson *et al.*, 2002),而且在调节抗病防御反应中发挥重要功能(Pandey *et al.*, 2009)。一些水稻 WRKY 参与抗病防御反应的调节与建立,如 OsWRKY03(Bai *et al.*, 2005)、OsWRKY13(Ding *et al.*, 2007)、OsWRKY23(Jing *et al.*, 2009)、OsWRKY31(Guo *et al.*, 2008)、OsWRKY45(Qiu *et al.*, 2009)、OsWRKY71(Bai *et al.*, 2007)和 OsWRKY89(Chen *et al.*, 2007)。WRKY 蛋白在植物抗病防御反应中既可作为正调控因子,也可作为负调控因子参与抗病防御的信号传递(Eulgem *et al.*, 2007)。

近些年,水稻 OsWRKY 研究已取得很大突破,但对其参与非生物胁迫和抵抗病原菌的了解仍然有限,有很多 OsWRKY 基因的功能广泛仍未发现和

证实。本研究拟从前人的研究出发,筛选出一些疑似功能广泛的 OsWRKY 转录因子,采用 Real-time PCR,对其表达谱和激素途径进行分析,为进一步研究其在水稻非生物抗性和抗稻瘟病菌过程中的调节功能提供基础。

1 材料与方法

本试验于 2010 年 4 月至 2011 年 6 月在中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部,植物分子生物学实验室完成。

1.1 水稻材料培养

用水稻日本晴材料(*Oryza sativa japonica cultivar-group*, Nipponbare),光强 $100 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 昼夜周期 14 h/8 h, 28 °C/20 °C, 相对湿度 85%。

1.2 非生物胁迫处理

材料:3~4 叶期稻苗。高盐处理:营养液(含 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl);干旱处理:幼苗限水;冷处理:植株置冷库 4 °C 下暗培养;热处理:植株置培养箱 42 °C 下暗培养;机械损伤处理:用止血钳压伤叶片。

1.3 激素处理

3~4 叶期稻苗用于各种激素处理。用 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸(SA)、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯(Me-JA)、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱落酸(ABA)、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙烯利(ACC)喷施,以蒸馏水喷施为对照。

1.4 病原接种

稻瘟菌由云南农业科学院提供。稻瘟菌孢子按 Peng *et al.* (1988)的方法制备。用每毫升 10^5 个的分生孢子悬液(加 0.025% Tween-20)对五叶期稻苗进行喷雾接种,以 0.025% Tween-20 喷雾模拟接种。

1.5 RNA 提取以及荧光定量 PCR

总 RNA 按照 Chomczynski *et al.* (1987)的方法提取。取 $1 \mu\text{g}$ 经 DNase I 消化的 RNA,根据 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)进行反转录:反转录 OligdT 引物 $1 \mu\text{L}$, 反转录酶 $1 \mu\text{L}$, $5 \times \text{Buffer}$ $4 \mu\text{L}$, RNA 酶抑制剂 $1 \mu\text{L}$, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP Mix $2 \mu\text{L}$, 反转录体系 $20 \mu\text{L}$;反应条件为 42 °C 60 min, 70 °C 10 min;取 $1 \mu\text{L}$ cD-

NA 用作 PCR 模板,用内参基因 Ubiquitin 5 进行 PCR,检测其表达水平近似一致后,进行荧光定量 RT-PCR(qRT-PCR)反应在 Roche Light-Cycler 480 仪器上进行,Ubiquitin 5 作为内参基因,所有引物退火温度均为 60 ℃,45 个循环。

目的基因引物:

OsWRKY7:5'-GGACGAAGTCAGAGATCGAG-3'
5'-CCGGTAGTAGTTCCCTTGGGT-3'
OsWRKY11:5'-ACTCCAAGAAACCGAACAAGC-3'
5'-GTCCTCGAGGTGATCAACCT-3'
OsWRKY30:5'-TTTCAACCCATTTTGGGATCT-3'
5'-ACTGAAGACTGAGCTCCTGGTG-3'
OsWRKY70:5'-GTGGTTGTGCAGACGATGAG-3'
5'-ACTTGTAGTAGCTCCTTGGGT-3'
OsWRKY89:5'-GTGGCTCATATTACTGCTTCCT-3'
5'-ACCCGGCTCTAATTTACATCC-3'
内参基因引物:
OsUBQ5:5'-AGAAGCGCAAGAAGAAGACGTA-3'
5'-CCACCTTGTAGAACTGGAGCAC-3'
qRT-PCR 反应体系 20 μL:cDNA 模板 1 μL;

10 μmol/L 基因特异性引物各 0.4 μL;2×SYBR Premix Ex Taq 10 μL;ddH₂O 8.2 μL。

1.6 序列分析

用 NCBI(<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)的 BlastP 工具,搜索同源蛋白质;用 InterProScan(<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>)预测 WRKY 蛋白的结构域;用 PSORT(<http://psort.hgc.jp/>)预测核定位信号。

2 结果与分析

2.1 五个基因序列分析

利用 Blastp(<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)搜索发现,OsWRKY7、OsWRKY11、OsWRKY30、OsWRKY70 和 OsWRKY89 与高粱、短柄草、大麦和玉米等多种植物的 WRKY 蛋白或其他序列同源。氨基酸的同源性见表 1。利用 InterProScan(<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>)和 PSORT(<http://psort.hgc.jp/>)对五个 OsWRKY 基因编码的蛋白进行结构域和 NLS 分析(表 2)。

表 1 五个 OsWRKY 蛋白与其他物种序列同源性分析
Table 1 Homology analysis of 5 OsWRKY proteins with other species

转录因子 Transcription factor	高粱 Sorghum	短柄草 <i>Brachypodium distachyon</i>	大麦 Barley	玉米 <i>Zea mays</i>
OsWRKY7	XP_002440147 (71%)	XP_003568011 (71%)	ABI13385 (72%)	NP_001148337 (73%)
OsWRKY11	XP_002455987 (68%)	XP_003566905 (59%)	BAJ98419 (46%)	NP_001147623 (62%)
OsWRKY30	XP_002444812 (55%)	CAJ26376 (56%)	ABI13407 (60%)	NP_001170182(57%)
OsWRKY70	XP_002441255 (56%)	XP_003566147 (58%)	BAK07677 (60%)	NP_001147820 (56%)
OsWRKY89	XP_002445412(70%)	XP_003571606(63%)	ABR87003(66%)	NP_001151453(69%)

注:表格中分别为基因登录号,以及和相应水稻 OsWRKY 蛋白氨基酸的同源性。
Note: The number in the form is accession number of each gene,with their identities with corresponding OsWRKY proteins.

表 2 五个 OsWRKY 蛋白结构域和 NLS 分析
Table 2 Protein structure domain and NLS analysis of 5 OsWRKY genes

转录因子 TF	分子量 MW(KD)	等电点 PI	分组 Group	核定位信号 NLS	WRKY 基序 WRKY motif	锌指基序 Zinc-finger motif
WRKY7 (221aa)	23.17	7.14	第二组 Group II	?	WRKYGKK (140~146)	CX4CX23HXX (160~191)
WRKY11 (379aa)	39.86	7.06	第二组 Group II	PNKPKKKAEK (177~186)	WRKYGQK (210~216)	CX4CX23HXX (230~261)
WRKY30 (674aa)	73.26	7.76	第一组 Group I	HKRRK (443~447)	WRKYGQK (282~288) (493~499)	CX4CX21HXX (302~331) CX4CX23HXX (513~544)
WRKY70 (572aa)	59.65	5.50	第一组 Group I	PTKKKVE (250~256) PDSKRWR (351~357)	WRKYGQK (224~230) (397~403)	CX4CX22HXX (244~274) CX4CX23HXX (417~448)
WRKY89 (550aa)	59.78	6.71	第一组 Group I	KRRP (115~118) PQPKRSRII (362~370)	WRKYGQK (233~239) (401~407)	CX4CX22HXX (253~283) CX4CX23HXX (421~453)

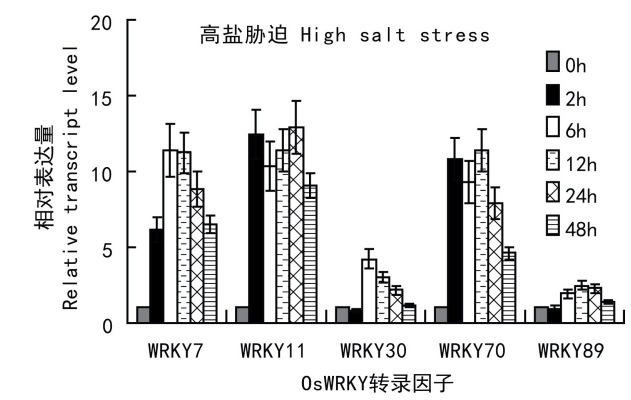


图 1 高盐胁迫 a: 横坐标为各个 OsWRKY 基因,纵坐标为其相对表达量; b: 未经处理的实验值设置为 1,实验数值为三组独立实验的平均值±标准差。下同。

Fig. 1 High salt stress treatment a: X coordinate for each OsWRKY genes, Y coordinate for the relative transcript level; b: The untreated is arbitrarily set to 1, the values from three independent experiments are shown as mean±SE. The same below.

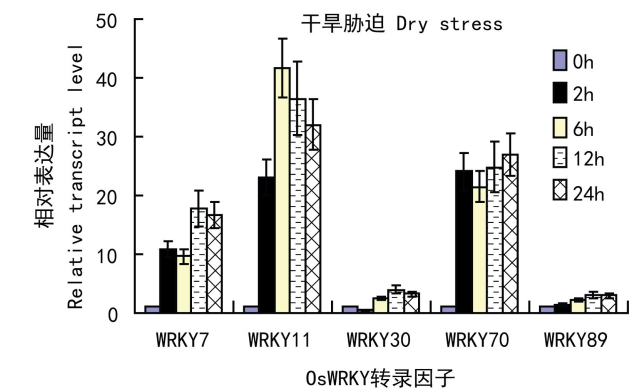


图 2 干旱胁迫
Fig. 2 Dry stress treatment

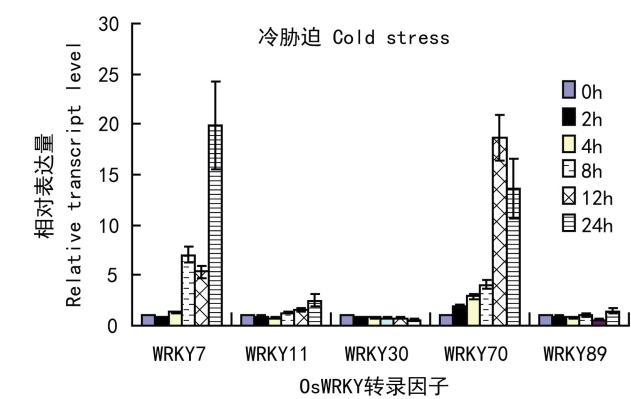


图 3 热处理
Fig. 3 Hot stress treatment

经过结构域分析(表 2), OsWRKY30、OsWRKY70 和 OsWRKY89 具有两个 WRKY 结构域,属于第一组;OsWRKY7 和 OsWRKY11 只有一

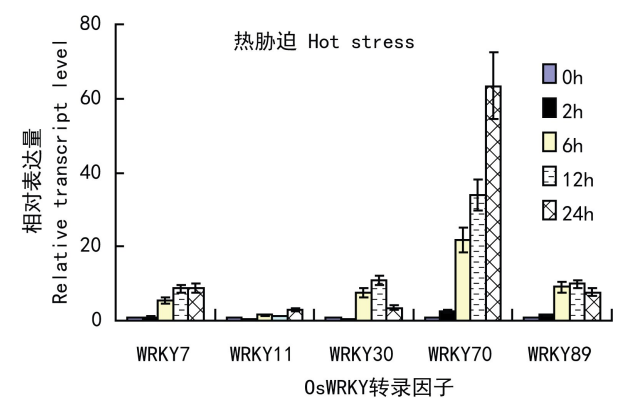


图 4 冷处理
Fig. 4 Cold stress treatment

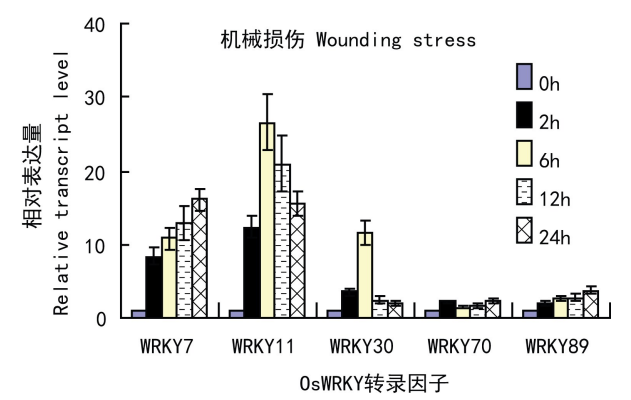


图 5 机械损伤
Fig. 5 Wound stress treatment

个 WRKY 结构域,属于第二组。经过 PSORT 预测分析(表 2), OsWRKY7 没有检测到 NLS, OsWRKY11 和 OsWRKY30 分别检测到一个 NLS,而 OsWRKY70 和 OsWRKY89 分别检测到两个 NLS。

2.2 各种非生物胁迫下表达特征

本研究采用五种非生物胁迫,分别为高盐胁迫、干旱胁迫、冷胁迫、热胁迫和机械损伤。通过 real-time PCR 结果表明(图 1,图 2):高盐和干旱胁迫对五个 WRKY 基因都有诱导效应,特别对 OsWRKY7、OsWRKY11 和 OsWRKY70 具有猛烈的诱导,均在 10 倍以上,尤其是干旱对 OsWRKY11 诱导了 40 倍左右,这之前对 OsWRKY11 的研究相符合(Kishitani *et al.*, 2009)。在中花 11 中,OsWRKY30 则被干旱强烈诱导且被证实正调控干旱和高温胁迫(Liu *et al.*, 2012)。在极端温度胁迫条件下(图 3,图 4), OsWRKY7 和 OsWRKY70 受到高温和低温的双重强烈诱导; OsWRKY30 和 Os-

WRKY82 仅受到高温胁迫的强烈诱导。机械损伤对这五个 OsWRKY 都有诱导效应(图 5),除 OsWRKY70 和 OsWRKY89 诱导效果微弱外,其余三个 OsWRKY 基因都诱导了 10 倍以上。

2.3 激素处理下的表达特征

对这五个基因,采用 4 种激素处理,分别为 SA、JA、ABA 和 ACC。用水喷雾处理作为对照(图 6)。结果显示,水喷雾处理条件下,除 OsWRKY11 外,其余四个基因都有所诱导。预示这些基因可能参与非生物胁迫,如高湿环境、喷雾接触胁迫、或由于试验时延长黑暗引起的昼夜节律变化。JA 处理后(图 8),OsWRKY30 表达量上调,其余基因都被抑制;而 SA 强烈诱导 OsWRKY30,微弱诱导 OsWRKY7 和 OsWRKY70(图 7)。一般认为 JA 和 SA 途径大多是拮抗的,它们对 OsWRKY7 和 OsWRKY70 的效果相反,而 JA 和 SA 协同诱导 OsWRKY30。本研究因为受到处理时间限制,JA 在 24 h 内没有

诱导 OsWRKY89 表达,而在 Ryu *et al.*(2006)的研究中,Northern blot 分析 OsWRKY89(本文为 OsWRKY82)在 48 h 受到一定程度诱导,72 h 诱导效果很明显。因此,OsWRKY89 还是受到 JA 的诱导,只是响应时间是在 48 h 之后。ABA 处理后(图

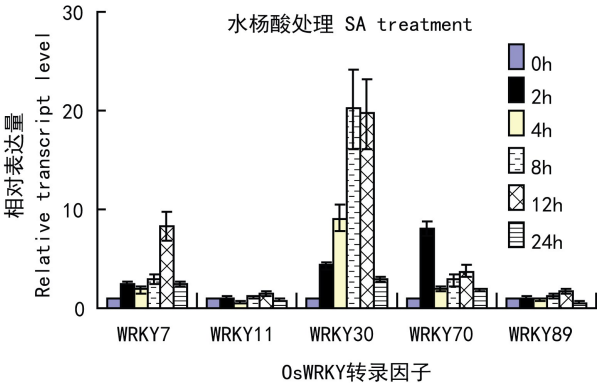


图 8 茉莉酸处理
Fig. 8 JA treatment

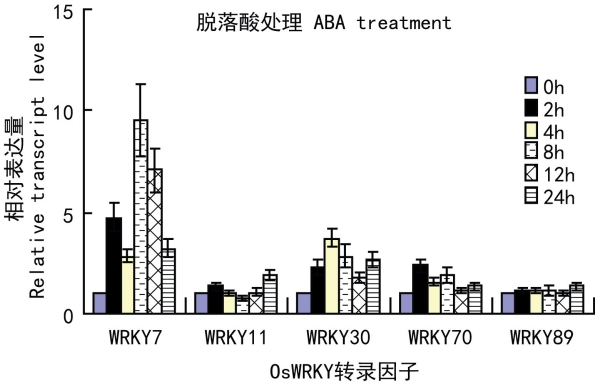


图 9 脱落酸处理
Fig. 9 ABA treatment

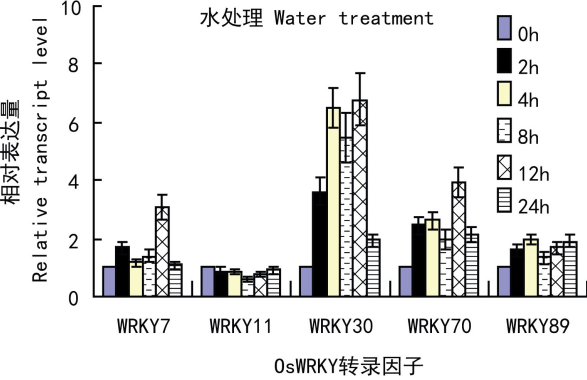


图 6 水喷雾处理
Fig. 6 Water treatment

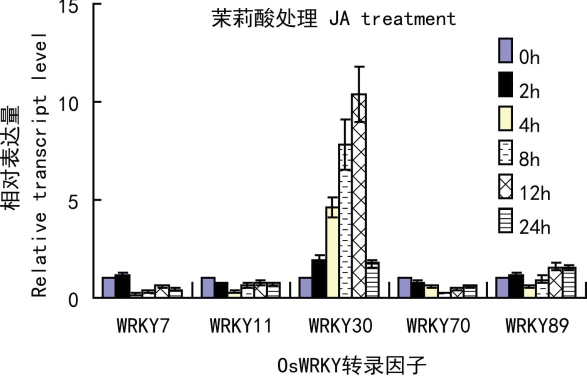


图 7 水杨酸处理
Fig. 7 SA treatment

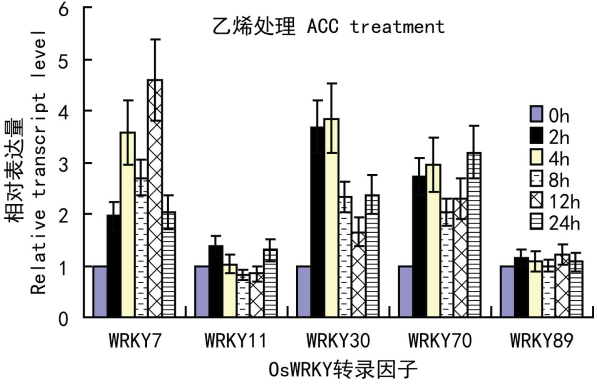


图 10 乙烯处理
Fig. 10 ET treatment

9), OsWRKY7 被诱导, OsWRKY30 虽然表现为微弱诱导, 但与水处理对照, 其效果是抑制的。这与对秀水 11 品种研究结果一致(Hu *et al.*, 2011)。在中花 11 中 ABA 诱导 OsWRKY30 的表达(Liu *et al.*, 2012)。在 ACC 处理后(图 10), OsWRKY7、OsWRKY30 和 OsWRKY70 都有所微弱诱导, 但与水处理对照之后, 均未被诱导。说明这五个 OsWRKY 基因不是 ET 途径的。

2.4 稻瘟菌处理下的表达模式

接种强致病稻瘟菌, 云南标准菌株 95-8-36 之后, OsWRKY7、OsWRKY30 和 OsWRKY89 有较高程度诱导(图 11, 图 12), 尤其是 OsWRKY30 被诱导 10 倍以上, 与 Peng 等的结果相一致(Hu *et al.*, 2011, 2012)。接种后(图 12), OsWRKY7 和 OsWRKY89 的表达逐步被诱导, OsWRKY7 表达量继续上升至 48 h, OsWRKY89 表达量上升至 24 h 后陡然下降。OsWRKY30 的表达, 至 6 h 达最大

值, 之后陡然下降至原有水平, 响应时间比其余 4 个 OsWRKY 要快, 推测 OsWRKY30 在稻瘟病胁迫响应过程中靠近上游。OsWRKY11 和 OsWRKY70 受到稻瘟菌的影响微弱, 但 OsWRKY70 在抗病材料 RIL260 中受到稻瘟菌强烈诱导。

3 结论与讨论

利用 InterProScan 对五个 OsWRKY 基因蛋白序列分析表明: OsWRKY7、OsWRKY11 为第二组成员, 只有 1 个 WRKY 结构域, 锌指纹均为 C2H2; OsWRKY30、OsWRKY70 和 OsWRKY82 为第一组成员, 具有 2 个 WRKY 结构域, 锌指纹均为 C2H2。利用 PSORT 亚细胞定位预测表明: 除 OsWRKY7 以外, 都具有典型的核定位信号, 提示这些基因编码核蛋白, 发挥转录因子的调控作用。OsWRKY7 可能有另外序列介导入核。

综合所有表达谱以及激素响应特征(表 3), 在非生物胁迫条件下高盐胁迫与干旱胁迫对 5 个 OsWRKY 基因的诱导程度具有相似性, 说明植物对这两种胁迫的响应有重叠。强烈诱导的 OsWRKY7、OsWRKY11 和 OsWRKY70 预示可能参与水稻对高盐和干旱胁迫的响应。在干旱胁迫方面, 本研究的水稻日本晴材料和 Hu *et al.* (2011) 研究的秀水 11 材料中, OsWRKY30 表达量受到 ABA 抑制, 而在中花 11 材料中 ABA 和干旱强烈诱导 OsWRKY30 的表达, 并正调控干旱胁迫, 且发挥功能需要 MPK 蛋白磷酸化激活(Liu *et al.*, 2012)。说明 OsWRKY30 在中花 11 中通过 ABA 途径参与干旱胁迫, 而在日本晴和秀水 11 中则没有这条途径。OsWRKY11 已经证实正调控干旱和高温胁迫(Kishitani *et al.*, 2009), 然而从表达谱看出, 其仍有可能参与高盐胁迫和稻瘟病胁迫。温度是普遍存在的一种胁迫, 从温度胁迫表达谱(图 1)看出: 在极端温度胁迫下, OsWRKY7 和 OsWRKY70 受到高温和低温的双重强烈诱导; 而 OsWRKY30 和 OsWRKY82 仅受到高温胁迫的强烈诱导。因此 OsWRKY7 和 OsWRKY70 应该参与植物适应极端温度环境(高温天气、寒冷天气), 而 OsWRKY30 和 OsWRKY89 可能仅参与适应高温天气。ABA 是一种广泛参与干旱、高盐和寒冷的植物激素, OsWRKY7 可能通过 ABA 途径介导水稻对干旱、高盐和寒冷的抗性。除 OsWRKY70 外, 机械损伤对

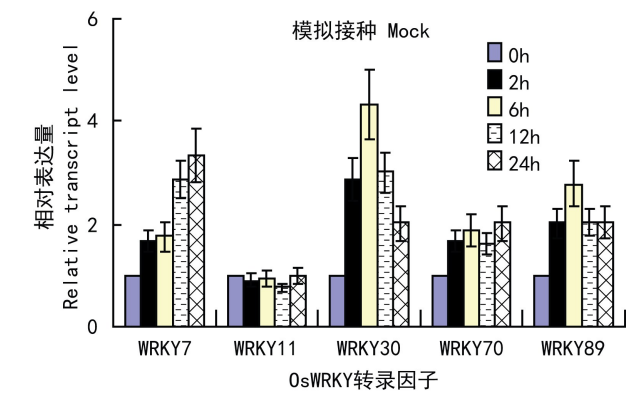


图 11 模拟接种
Fig. 11 Mock inoculation

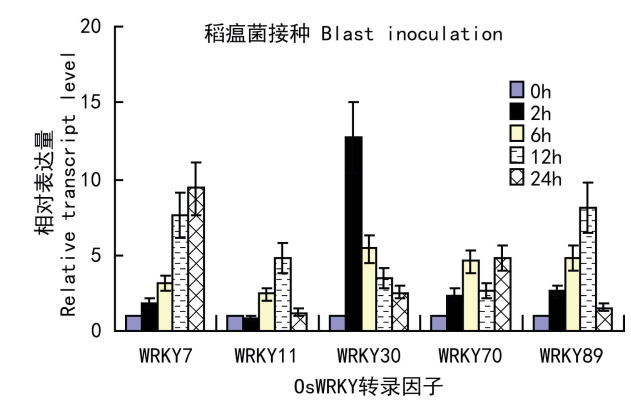


图 12 稻瘟菌(95-8-36)接种
Fig. 12 Rice blast inoculation

表 3 五个 OsWRKY 基因在响应病原体接种, 激素处理和非生物胁迫下的表达谱

Table 3 Expression characteristics of 5 OsWRKY genes in response to pathogen inoculation, chemical treatments and abiotic stress

转录因子 TF	高盐 High salt	干旱 Dry	温度 Temperature	伤 Wound	稻瘟菌 Magnaporthe oryzae	激素途径 Hormone way
WRKY7	↑↑	↑↑	↑(冷,热)(Cold,hot)	↑↑	↑↑	JA↓ SA↑ ABA↑
WRKY11	↑↑	↑↑	—	↑↑	↑	JA↓
WRKY30	↑	↑	↑(热)(Hot)	↑↑	↑↑	JA↑ SA↑ ABA↓
WRKY70	↑↑	↑↑	↑(冷,热)(Cold,hot)	—	↑	JA↓ SA↑
WRKY89	—	—	↑(热)(Hot)	↑	↑	—

注:“↑↑”代表强烈诱导;“↑”代表微弱诱导;“↓”代表抑制。
Note:“↑↑” represents strong induction;“↑” on behalf of the induction;“↓” on behalf of the inhibition.

其余四个 OsWRKY 都有诱导效应,而且有三个 WRKY 被诱导了 10 以上。通常认为,JA 是调节植物对伤反应的激素分子(Ebneth *et al.*,1992)。在本研究中,OsWRKY30 受到伤的诱导,可能是 JA 途径介导的。然而,伤激活 OsWRKY7 和 OsWRKY11,有可能与其他激素途径有关。

稻瘟菌可以将 5 个 OsWRKY 不同程度诱导,说明这些基因都有可能参与稻瘟病胁迫响应。Peng 已经证实 OsWRKY30 正调控水稻对纹枯病和稻瘟病的抗性(Hu *et al.*,2012)。在本研究的日本晴材料中,OsWRKY70 受到稻瘟菌的诱导效果微弱,但是 OsWRKY70 在抗病材料 RIL260 中受到稻瘟菌强烈诱导,这可能是因为日本晴是一种感病材料所致,其在本晴中发挥功能不能像抗病材料 RIL260 那样出色,可能不在稻瘟菌介导的路径中,也有可能是所用的稻瘟菌菌种不同所致。一般认为,SA 和 JA 介导的抗病信号途径是相互拮抗的,前者一般参与对活体营养型病菌的抗性,后者则通常参与对死体营养型病菌和虫害的抗性(Hammond-Kosack *et al.*,2003)。稻瘟菌是一种半活体营养型病菌(Jin *et al.*,2009),在本研究中,SA 可能诱导 OsWRKY7、OsWRKY30 和 OsWRKY70 参与稻瘟病胁迫。JA 和 SA 相互拮抗作用于 OsWRKY7 和 OsWRKY70 的表达,但是协同诱导 OsWRKY30 的表达。这也反映了 OsWRKY 蛋白作为不同激素途径的调控交叉点,通过协同或者拮抗作用参与植物病原防御机制。ET 是另一种调控植物抗病反应的重要信号,但是通过水喷雾对照,ET 并不影响这些基因的表达水平,说明这些基因不是通过 ET 途径发挥作用的。OsWRKY 蛋白还可以反馈调控激素的合成途径,比如秀水 11 材料中稻瘟菌接种 24 h 之后,OsWRKY30 高表达植株的 JA 含量比野生型高,正反馈调控 JA 的合成和积累

(Hu *et al.*,2012)。对于其余四个 OsWRKY 基因或许也存在这样的反馈调控,需进一步证实。

综上所述,这五个 OsWRKY 基因可能功能广泛,可能通过 ABA、SA 和 JA 广泛参与各种非生物胁迫和稻瘟病胁迫响应。OsWRKY7 可能通过 ABA 途径参与干旱、高盐和极端温度胁迫,并通过 SA 和 JA 相互拮抗地调控其参与稻瘟病胁迫。OsWRKY11 已被证实正调控干旱和高温胁迫,但它仍有可能参与高盐胁迫及稻瘟病胁迫。OsWRKY30 在中花 11 中已证实通过 ABA 途径参与干旱和高温胁迫;并在秀水 11 材料中已证实,SA 和 JA 相互协同调控其参与抗稻瘟病和纹枯病。但它仍有可能参与高盐胁迫。OsWRKY70 可能参与高盐、干旱和极端温度胁迫,JA 和 SA 相互拮抗地调控其参与稻瘟病胁迫。OsWRKY89 可能参与高温胁迫和稻瘟病胁迫。

致谢 十分感谢林良斌老师和余迪求老师一年多对我的培养,实验室师兄师姐对我的照顾。

参考文献:

Bai XQ, Liu XQ, Qian Q, *et al.* 2005. OsWRKY03, a rice transcriptional activator that functions in defense signaling pathway upstream of OsNPR1[J]. *Cell Res*, **15**(8): 593—603
Bai XQ, Liu XQ, Wang XJ, *et al.* 2007. OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response[J]. *J Plant Physiol*, **164**(8): 969—979
Barth M, Kalde M, Somssich IE, *et al.* 2003. Members of the *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways[J]. *Mol Plant-Microb Inter*, **16**:295—305
Brader G, Li J, Palva ET. 2004. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense[J]. *Plant Cell*, **16**(2):319—331
Chen CH, ChenZX, Yu DQ. 2001. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression[J]. *Plant Cell*, **13**(7):1 527—1 540
Chen XJ, Hao JJ, Wang HH, *et al.* 2007. Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance

- in rice plants[J]. *Plant Mol Bio*, **65**:799—815
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. *Analy Biochem*, **162**(1):156—159
- Ding XH, Qiu DY, Xiao J, *et al.* 2007. OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate dependent signaling[J]. *Mol Plant-Microb Inter*, **20**(5):492—499
- Ebneth M, Hildmann T, Peña-Cortés H, *et al.* 1992. General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding[J]. *Plant Cell*, **4**:1 157—1 170
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, *et al.* 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. *Trend Plant Sci*, **5**(5):199—206
- Eulgem T, Somssich IE. 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling[J]. *Curr Opin Plant Biol*, **10**:366—371
- Guo ZJ, Peng YL, Zhang J. 2008. Constitutive expression of pathogen inducible OsWRKY31 enhances disease resistance and affects root growth and auxin response in transgenic rice plants[J]. *Cell Res*, **18**:508—521
- Guo ZJ, Wang HH, Wu KL, *et al.* 2005. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins[J]. *DNA Res*, **12**(1):9—26
- Hammond-Kosack KE, Parker JE. 2003. Deciphering plant pathogen communication; fresh perspectives for molecular resistance breeding[J]. *Curr Opin Plant Biol*, **14**:177—193
- Hu Y, Peng X, Tang X, *et al.* 2012 Nov. Constitutive expression of rice WRKY30 gene increases the endogenous jasmonic acid accumulation, PR gene expression and resistance to fungal pathogens in rice[J]. *Planta*, **236**(5):1 485—98
- Hu YJ(胡耀军), Peng XX(彭喜旭), Tang XK(唐新科), *et al.* 2011. Isolation and expression profiles of rice WRKY30 induced by jasmonic acid application and fungal pathogen infection(受 JA 和真菌病原接种诱导的 OsWRKY30 表达谱)[J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), **44**(12):2 454—2 461
- Jena KK. 2006. Beating blast[J]. *Rice Today*, **1**:36—37
- Jiang SY, Ramamoorthy R, *et al.* 2008. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments[J]. *Plant Cell Physiol*, **49**(6):865—879
- Jin J, Lee YW, Park JY, *et al.* 2009. Rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae*) infects *Arabidopsis* via a mechanism distinct from that required for the infection of rice[J]. *Plant Physiol*, **149**:474—486
- Jing SJ, Song Y, Zhou X, *et al.* 2009. Heterologous expression of OsWRKY23 gene enhances pathogen defense and dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. *Plant Growth Reg*, **58**:181—190
- Johnson CS, Koevski B, *et al.* 2002. *Transparent testa glabra 2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor[J]. *Plant Cell*, **14**(6):1 359—1 375
- Kishitani S, Shiroto Y, Wu X, *et al.* 2009. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter[J]. *Plant Cell Rep*, **28**(1):21—30
- Liu C, Shen H, Zhang Y, *et al.* 2012. OsWRKY30 is activated by MAP kinases to confer drought tolerance in rice[J]. *Plant Mol Biol*, **80**(3):241—53
- Pandey SP, Somssich IE. 2009. The role of WRKY transcription factors in plant immunity[J]. *Plant Physiol*, **150**:1 648—1 655
- Peng YL, Shishiyama J. 1988. Temporal sequence of cytological events in rice leaves affected with *Pyricularia oryzae* [J]. *Can J Bot*, **66**:730—735
- Qiu YP, Yu DQ. 2009. Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Environ Exper Bot*, **65**:35—47
- Somssich IE, Ülker B. 2004. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function[J]. *Curr Opin Plant Biol*, **7**:491—498

(上接第 150 页 Continue from page 150)

Burchard 反应和 Molish 反应均呈阳性, 薄层色谱的 R_f 值及显色行为与胡萝卜苷对照品一致, 因此鉴定化合物 **11** 为胡萝卜苷(daucosterol)。

参考文献:

- Feng F(冯锋), Zhu MX(朱明晓), Xie N(谢宁). 2008. Studies on the chemical constituents of the roots of *Ilex pubescens* (毛冬青化学成分研究)[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), **43**(10): 732—736
- Kang SS, Kim JS, Xu YN, *et al.* 1999. Isolation of a new cerebroside from the root bark of *Aralia elata* [J]. *J Nat Prod*, **62**: 1 059—1 060
- Li LJ(李路军), Du P(杜鹏), Zhang P(张鹏), *et al.* 2013. Chemical constituents in leaves of *Ilex ficoidea* (榕叶冬青叶的化学成分研究)[J]. *Chin Trad Herb Drugs* (中草药), **44**(5):519—523
- Lu XH(路新华), Zhang JJ(张金娟), Liang H(梁鸿), *et al.* 2004. Chemical constituents of *Angelica sinensis* (当归化学成分的研究)[J]. *J Chin Pharm Sci* (中国药学), **13**(1):1—3

- Öksüz S, Serin S. 1997. Triterpenes of *Centaurea ptosimopap-poides* [J]. *Phytochemistry*, **46**(3):545—548
- Shi DY(史大永), Han LJ(韩丽君), Sun J(孙杰), *et al.* 2005. Chemical constituents from marine alga *Chaetomorpha basiretor-sa* (海藻基根硬毛藻的化学成分研究)[J]. *Chin J Chin Mat Med* (中国中药杂志), **30**(5):347—350
- The Compilation of Chinese herbal Medicine Drafting Group(全国中草药汇编编写组). 1975. The Compilation of Chinese herbal Medicine(全国中草药汇编)[M]. Beijing(北京):Peoples Medical Publishing House(人民卫生出版社)
- Xi PZ(席鹏洲), Qin YL(秦亚丽), Wang YH(王跃虎), *et al.* 2011. Studies on the chemical constituents in *Streptocaulon grif-fithii* Hook (马莲鞍化学成分研究)[J]. *J Northwest A & F Univ:Nat Sci Edit* (西北农林科技大学学报·自然科学版), **39**(8):185—189
- Yu ZX(余振喜), Wang GL(王钢力), Dai Z(戴忠), *et al.* 2007. Studies on Chemical constituents of *Phlomis medicinalis* II (萝卜秦艽化学成分的研究 II)[J]. *Chin Pharm J*, **42**(17): 1 295—1 298