

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201401022

高文成,李玥,张银超,等. 玉米转录因子 WRKY76 克隆及抗纹枯病表达模式分析 [J]. 广西植物, 2016, 36(3):273-279

GAO WC, LI Y, ZHANG YC, et al. Cloning of maize WRKY76 and its expression patterns involved in resistance to maize banded sheath blight [J]. Guihaia, 2016, 36(3):273-279

玉米转录因子 WRKY76 克隆及抗纹枯病表达模式分析

高文成¹, 李玥², 张银超¹, 张志明¹, 潘光堂¹, 林海建^{1*}

(1. 四川农业大学 玉米所/农业部西南玉米生物学与遗传育种重点实验室, 成都 611130; 2. 绵阳农业科学研究院, 四川 绵阳 621000)

摘要: 玉米纹枯病是影响玉米产量和品质的重要病害之一。转录因子 WRKY 家族部分成员能够调控水杨酸和茉莉酸甲酯信号传递方式来激发防卫反应基因的表达。在 NCBI 上检索玉米中 WRKY 家族成员及拟南芥中抗病相关的 WRKY 家族成员, 利用 CLUSTAL X 和 MEGA5.05 构建系统进化树, 发现转录因子 WRKY76 可能参与玉米抗纹枯病的调控途径。该研究以玉米抗纹枯病材料 R15 和感病材料 Ye478 为对象, 在玉米拔节期接种立枯丝核菌 AG1-IA, 首先分别于接菌前(对照)和接菌后 1、2、4、6、12、24 h 取叶鞘; 然后分别进行水杨酸和茉莉酸甲酯胁迫处理, 分别于处理前(对照)和处理后 1、2、4、6、12 h 取叶鞘, 提取 RNA, 实时荧光定量 PCR 分析 WRKY76 转录因子基因在玉米叶鞘组织中不同胁迫条件下的差异表达。结果表明: 在立枯丝核菌 AG1-IA 胁迫下, WRKY76 转录因子基因在胁迫后 1 h 表达量达最大值, 抗病材料 R15 的相对表达量高于感病材料 Ye478 且差异显著 ($P \leq 0.05$); 经水杨酸(Salicylic Acid, SA)处理, WRKY76 在抗感材料中表达趋势相似, 在感病材料掖 478 中, WRKY76 被诱导而显著地上调表达, 在抗病材料中, 相对表达量峰值出现在胁迫后 4 h, 且相对表达量低于感病材料掖 478。经茉莉酸甲酯(Methyl jasmine, MeJA)处理, WRKY76 基因在感病材料中呈现下调表达趋势。WRKY76 基因在 1 h 表达量为对照的 0.6 倍, 其他调查时间点基本都在 0.1~0.3 之间。在抗病材料 R15 中, WRKY76 基因表达呈现上升趋势, 变化趋势不明显。这表明 WRKY76 转录因子基因能够被病原物、SA、MeJA 诱导表达, 可能参与植物抗纹枯病调控途径。

关键词: 纹枯病, 转录调控因子, WRKY 基因, 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q943.2, Q751 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2016)03-0273-07

Cloning of maize WRKY76 and its expression patterns involved in resistance to maize banded sheath blight

GAO Wen-Cheng¹, LI Yue², ZHANG Yin-Chao¹, ZHANG Zhi-Ming¹,
PAN Guang-Tang¹, LIN Hai-Jian^{1*}

(1. Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Maize in Southwest Region, Ministry of Agriculture, Chengdu 611130, China;
2. Mianyang Academy of Agricultural Science, Mianyang 621000, China)

Abstract: Maize banded leaf and sheath blight (BLSB) which is a very destructive disease, can result in a significant yield loss and also heavily affect the quality of corn in maize production area. The expression of defense response genes could be stimulated by SA (salicylic acid) and MeJA (methyl jasmine) in the signal transduction pathway, and regula-

收稿日期: 2014-06-29 修回日期: 2014-11-19

基金项目: 国家自然科学基金(31201221); 国家“863”项目(SS2012AA100107) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31201221); National High-tech R & D Program of China(SS2012AA100107)].

作者简介: 高文成(1987-), 男, 内蒙开鲁县人, 硕士研究生, 研究方向为玉米逆境分子生物学, (E-mail) gaowencheng2009@163.com。

*通讯作者: 林海建, 博士, 副研究员, 研究方向为玉米分子生物学与遗传育种, (E-mail) linhj521@gmail.com。

ted by members of the WRKY transcription factors family. Transcription factors WRKY family members in Maize and WRKY family members which are related to resistance in *Arabidopsis* were collected from NCBI, and then polygenetic tree was successfully constructed. According to the result of polygenetic which was conducted by using the software CLUSTAL X and the software MEGA5.05, we concluded that the transcription factor *WRKY76* was most likely involved in maize sheath blight resistance network. Whether the transcription factor *WRKY76* plays a truly important role in signal transduction path is still unknown. The materials used in this study were R15 (Resistant line) and Ye478 (Susceptible line). R15 and Ye478 under different kinds of stress conditions were used to characterize the expression pattern of *WRKY76* gene by qRT-PCR, leaf sheath samples were collected at 0, 1, 2, 4, 6, 12 and 24 h post *Rhizoctonia solani* AG1-IA inoculation, and 0, 1, 2, 4, 6, 12 h after SA (salicylic acid) and MeJA (methyl jasmine) stress treatment. When leaf sheath samples were inoculated with *R. solani* AG1-IA at jointing stage, the *WRKY76* gene expression was able to reach to the highest at 1 h post inoculation, and its expression was 20 and 32 times higher than control in Ye478 (Susceptible line) and R15 (Resistant line), with significant difference ($P < 0.05$). The relative expression decreased at 2 h post inoculation. 3 times for Ye478 (Susceptible line) while it returned to the original level for R15 (Resistant line). The expression pattern in R15 (Resistant line) tended to increase along with treatment time increasing, while it was always higher than the susceptible line Ye478 with significant difference ($P < 0.05$). When the maize leaf sheath was treated with SA (salicylic acid), the expression pattern of *WRKY76* between Ye478 (Susceptible line) and R15 (Resistant line) were almost the same level, and its expression in R15 (Resistant line) was higher than that of Ye478 (Susceptible line). For R15 (Resistant line), the relative expression level of *WRKY76* was 33 times at 1 h post inoculation compared to the control, 46 times at 2 h post inoculation, and then decreased to 2.5 time at 12 h post inoculation. However, When the maize leaf sheath was treated with MeJA, Ye478 (Susceptible line) presents the downward trend, R15 (Resistant line) shows a upward pattern according to the results of relative expression level at each treatment time. There was no significant difference between Ye478 (Susceptible line) and R15 (Resistant line). Finally research results of this study indicated that the *WRKY76* gene expression could be induced by *R. solani* AG1-IA, SA (salicylic acid) and MeJA (methyl jasmine), and the *WRKY76* might be involved in plant resistance signal transduction regulation pathway to maize banded leaf and sheath blight.

Key words: maize banded leaf and sheath blight, transcription factor, *WRKY76*, qRT-PCR

玉米是重要的粮食作物和工业原料,其产量的稳定对国民经济的发展和确保我国粮食安全具有重要意义,但生物和非生物逆境胁迫一直是限制玉米高产稳产重要因素。玉米纹枯病是典型的生物逆境,尤其以西南地区最为严重,对该地区玉米的生长、发育、产量和品质均构成严重不利影响(唐海涛等, 2004; 杨俊品等, 2005)。植物经过长期的进化和自然选择,形成了由多条抗性途径在不同时空水平上交叉、重叠而成的复杂的抗性机制和多种表现的抗性形式。在病原菌侵染植物时,激发了病程相关蛋白(pathogenesis-related, PR)基因、组蛋白甲基化基因及染色质重塑基因的表达,这些基因的表达能被植物激素水杨酸(salicylic acid, SA)及茉莉酸(jasmonic acid, JA)调控,激活防卫反应基因的表达从而使植物表现出抗性(Spoel & Dong, 2012)。转录因子WRKY家族部分成员能调控SA及JA信号传递(Li et al, 2004; Mao et al, 2007)。在真核生物中,WRKY转录因子是分布最为广泛、最为保守的

一类蛋白,广泛参与植物的激素反应、生长发育、逆境胁迫以及防御反应等生理生化过程(Eulgem et al, 2000; Eulgem & Somssich, 2007),在拟南芥(Qin et al, 2013)、水稻(Baldoni et al, 2013)、烟草(Li et al, 2012)、棉花(Sun et al, 2012)等植物中均有WRKY转录因子基因功能的报道,这类基因能显著提高植物的抗逆性。拟南芥的WRKYIIa亚家族成员包括WRKY28、WRKY62、WRKY71、WRKY76等,对该亚家族所有成员进行过表达可提高水稻对白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)的抗病性(Peng et al, 2010)。AtWRKY70是植物SA防卫信号传导途径的一个重要决定因子,AtWRKY70过表达能提高SA介导的对白粉病菌(*Erysiphe horae*)抗性(Li et al, 2004);相反,敲除或抑制WRKY70的表达则会降低植物对SA介导的对白粉病菌抗性(Ren et al, 2008)。这些研究表明,在植物抗病防卫反应过程中,WRKY基因主要以防卫基因转录调节子的角色介导了植物的抗病性。

目前,已有大量 *WRKY* 转录因子基因被报道在介导植物生物与非生物胁迫中发挥作用,但在玉米抗纹枯病的研究中还未见报道。本研究以构建系统进化树结果为依据,以 *WRKY76* 为候选基因,通过 RT-PCR 技术克隆 *WRKY76* 基因的全长 cDNA 序列,并运用实时荧光定量 PCR 分析玉米叶鞘组织在不同胁迫条件下的表达特征,揭示 *WRKY76* 基因在病害、激素等多种胁迫下的时空表达特征,为今后阐明玉米抗纹枯病的分子调控机制和利用基因工程手段培育抗病品种奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 系统进化树构建

利用 CLUSTAL X 软件对检索得到的与拟南芥中抗病相关 *WRKY* 家族基因蛋白进行多序列联配分析。根据多序列联配结果,采用 MEGA5.05 软件邻接法 (Neighbor-Joining method) 的 Poisson 模型,进行 Bootstrapping 检验,重复 100 次,选用 Uniform rates 构建进化树 (Tamura et al, 2011)。

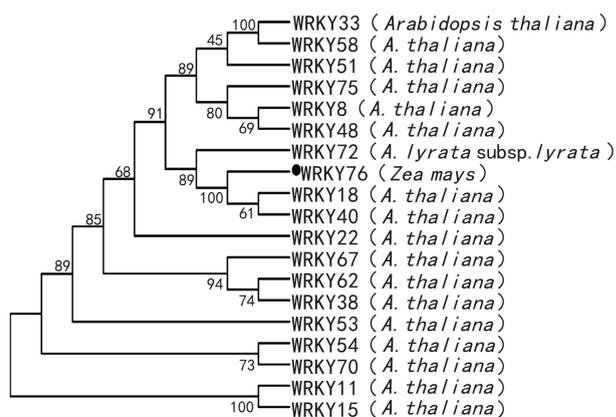


图 1 玉米 *WRKY76* 基因与拟南芥抗病相关 *WRKY* 基因的系统发生树

Fig. 1 Polygenic tree of maize *WRKY76* and *Arabidopsis* pathogen resistance *WRKY* genes

本研究构建了该基因编码蛋白与拟南芥抗病相关 *WRKY* 转录因子的同源进化树,同时进行自展分析,由图 1 可知,各组及亚组分枝及深部节点都有较高的自展值支持,由此表明该进化树的构建较为准确,各组及亚组的分枝关系得到显著支持。根据系统发育树的拓扑结构,结合遗传距离和自展支持值分析,玉米 *WRKY76* 基因与拟南芥抗病相关 *WRKY* 基因之间具有较高的同源性,成员多且分支有限,形

成相对独立的亚组分枝,没有出现交叉现象,其中 *ZmWRKY76* 与抗病相关的 *AtWRKY18* 及 *AtWRKY40* (Xu et al, 2006) 聚类为一个分支,由此表明 *WRKY76* 基因很可能参与植物的抗病反应过程。

1.2 材料及取样

供试材料为课题组前期鉴定筛选的感纹枯病自交系掖 478 和抗纹枯病自交系 R15,均由四川农业大学玉米研究所提供。在玉米拔节期进行胁迫处理:生物胁迫为人工接种高致病性立枯丝核菌 AG1-IA,分别于接菌前(对照)和接菌后 1、2、4、6、12、24 h 取叶鞘;非生物胁迫为水杨酸和茉莉酸甲酯,水杨酸处理浓度为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,茉莉酸处理浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,分别于处理前(对照)和处理后 1、2、4、6、12 h 取叶鞘,经液氮速冻后保存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成

玉米叶鞘总 RNA 提取按照 TRIzol 试剂操作流程进行。RNA 完整性通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测;用核酸蛋白仪检测 RNA 浓度和纯度。根据 RNA 的浓度确定反转录体系中 RNA 的体积,将总 RNA 反转录成 cDNA 按照宝生物公司 (TaKaRa) 试剂盒说明进行操作,cDNA 样品保存于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,备用。

本研究用于基因克隆的 cDNA 来自 R15 接菌后 1 h 的叶鞘组织 RNA 的反转录;用于荧光定量分析的材料是 R15 和掖 478 生长到拔节期的植株,选择生长一致的植株,进行立枯丝核菌 AG1-IA、SA、MeJA 三种处理,提取叶鞘组织 RNA。提取后的 RNA 通过琼脂糖凝胶电泳检测,28S 和 18S 条带清晰,无拖尾现象(图 2),表明所提 RNA 完整性较好;通过核酸蛋白仪测定 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值在 1.8~2.1 之间,表明 RNA 的纯度较好。因此,所提 RNA 可用于后续基因克隆和实时荧光定量分析。

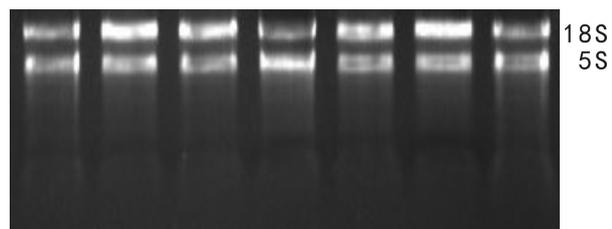


图 2 玉米叶鞘总 RNA 电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of maize sheath total RNA

1.4 *WRKY76* 基因克隆

根据 NCBI 数据库公布的玉米 *WRKY76* mRNA

序列,用 Primer Premier 5.0 设计目标基因的特异引物扩增包含整个 CDS 的序列(表 1)。以反转录的 cDNA 为模板,进行 RT-PCR 反应,反应条件如下:模板 cDNA 2 μL 、上下游引物各 0.6 μL 、 $2\times\text{KOD}$ Buffer 10 μL 、2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs 4 μL 、KOD FX 0.4 μL 、加无菌 ddH₂O 至 20 μL 。PCR 反应程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;以 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min,循环 35 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 8 min。PCR 结束之后,取 10 μL 进行电泳检测分析结果,回收 PCR 产物并连接到 pMD[®]19-T 载体上,转化 *E. coli* DH5 α ,菌落 PCR 验证阳性克隆,送上海英俊生物有限公司测序。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Names and sequences of primers used in this study

引物 Primer	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer	引物用途 Function
1	AGACACACGCAGGTCATGAT	TGAGGGAGATTTCGGCTCTAA	克隆 Cloning
2	ACCGAGATCATCGCCTAC	CTGTCCCTGCTCCTCTTC	qRT-PCR
<i>GAPDH</i>	ACTTCGGCATTGTTGAGG	AAGTCGGTAGAAACCAGAT	qRT-PCR

2 结果与分析

2.1 *WRKY76* 基因的克隆

根据 NCBI 数据库公布的玉米 *WRKY76* mRNA 序列,设计目标基因的特异引物扩增包含整个 CDS 的一段序列,进行 PCR 扩增,获得一条长度为 1 083 bp 片段(图 3);将其克隆到 pMD19-T 载体上,菌落 PCR 筛选阳性克隆,送上海英俊生物有限公司进行基因测序。将测序结果与已知的序列进行 BLAST 比对,结果与原氨基酸序列同源性达到了 100%,这说明克隆得到的序列为目的基因。

2.2 *WRKY76* 基因表达特征分析

2.2.1 *WRKY76* 在立枯丝核菌 AG1-IA 胁迫下的差异表达 实时定量 PCR 分析结果表明,立枯丝核菌 AG1-IA 侵染玉米 R15 和掖 478 1 h 后,*WRKY76* 能够强烈迅速上调表达,此时表达量达到最高,其中在感病材料掖 478 及抗病材料 R15 中,表达量分别为对照的 20 倍和 32 倍;随后 2 h 的相对表达量较 1 h 相对表达量降低,感病材料掖 478 相对表达量为 3 倍左右,抗病材料 R15 回到原水平;在之后的 4~24 h,在感病材料中,又出现两次峰值,分别出现在 4 h 和 12 h,在胁迫 24 h 时,相对表达量回到原水平;但在抗病材料 R15 中,表达呈上升趋势,到达 6 h 时,

1.5 *WRKY76* 基因表达特征分析

以玉米看家基因 *GAPDH* 为内参基因,根据克隆测序的玉米 *WRKY76* 序列,用 Premier 5.0 设计目的基因的 qRT-PCR 引物(表 1)。利用 Bio-Rad CFX 实时荧光定量 PCR 仪对玉米叶鞘组织不同胁迫处理时间点的样品进行表达特征分析,反应体系为 EvaGreen[®] Supermix 5 μL 、模板 1 μL 、上下游引物各 0.5 μL 、加 ddH₂O 至总体积 10 μL 。反应条件为 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 s,59 $^{\circ}\text{C}$ (*GAPDH*)、55.9 $^{\circ}\text{C}$ (*WRKY76*) 退火和延伸 10 s;循环 39 次;65~95 $^{\circ}\text{C}$,作融解曲线。试验共设 3 个重复,结果分析采用 Bio-Rad CFX Manager 自带的 gene study 程序进行。

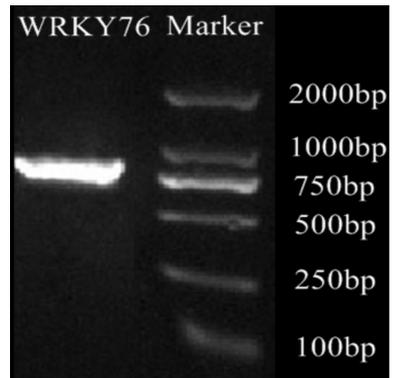


图 3 目的基因(*WRKY76*)扩增电泳图
左侧为目的基因,右侧为 Marker。

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of target gene(*WRKY76*)
The target gene is on the left, Marker is on the right.

变化平缓,相对表达量维持在较高水平(图 4)。统计分析结果表明,该基因在抗病材料 R15 中的相对表达量与感病材料掖 478 中的差异达到了显著水平 ($P\leq 0.05$),由此表明 *WRKY76* 转录因子基因很可能是玉米纹枯病抗感差异原因之一。

2.2.2 *WRKY76* 在 SA 处理下的差异表达 在植物的抗病信号转导途径中,水杨酸(salicylic acid, SA)作为一种内源信号分子通过调控作用激活过敏性坏死反应(hypersensitive response, HR)和系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)反应。外施 SA

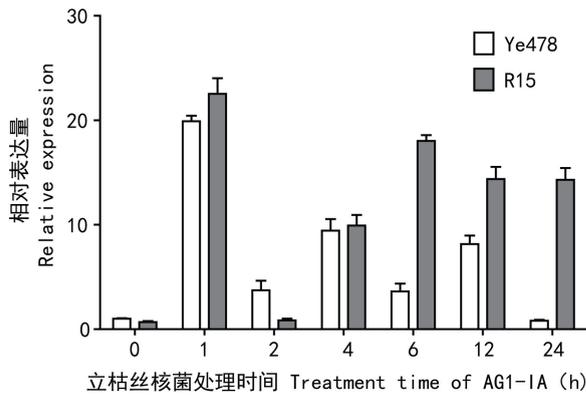


图 4 *WRKY76* 在立枯丝核菌胁迫下的表达模式分析
横坐标为处理时间; 纵坐标为 *WRKY76* 相对表达量。

Fig. 4 Expression profile of *WRKY76* under treatment of AGI-1A X axis represents the time of treatment, y axis represents relative expression of *WRKY76*.

可以增加植物的抗病性, 为了明确 *WRKY76* 基因是否受 SA 的激发, 用 SA 处理 R15 和掖 478 后, 进行实时荧光定量 PCR 分析。结果表明在感病材料掖 478 中, *WRKY76* 被诱导而显著的上调表达, 在处理后的 1 h 的相对表达量为对照的 33 倍; 2 h 时相对表达量达到最高的 46 倍, 随后开始下降, 12 h 时相对表达量与维持在对照的 2.5 倍水平; 在抗病材料中, 该基因被诱导表达的趋势与感病材料相似, 相对表达量峰值出现在胁迫后 4 h, 且相对表达量低于感病材料掖 478 (图 5)。在感病材料中 SA 能快速诱导 *WRKY76* 基因的表达。

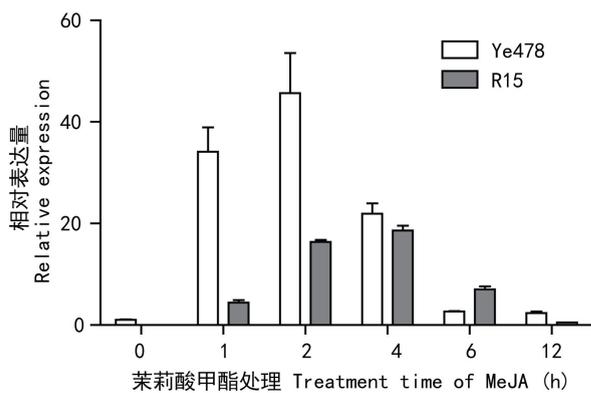


图 5 *WRKY76* 在水杨酸处理下的表达模式分析

Fig. 5 Expression profile of *WRKY76* under treatment of SA

2.2.3 MeJA 处理下 *WRKY76* 基因的差异表达 茉莉酸(jasmonic acid, JA)及其功能衍生物如茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)是高等植物中一种重要的信号分子, 在植物应对胁迫应答的信号转导中起

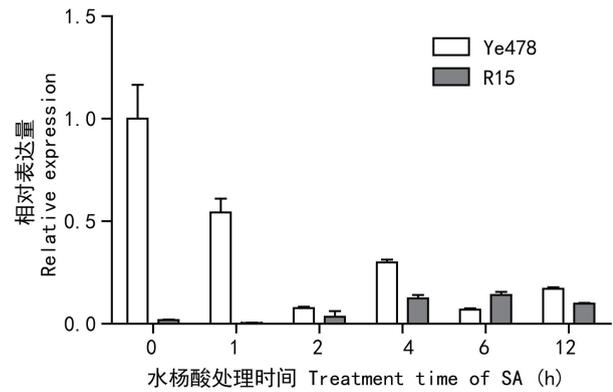


图 6 *WRKY76* 在茉莉酸甲酯处理下的表达模式分析

Fig. 6 Expression profile of *WRKY76* under treatment of MeJA

到重要的调控作用。一般认为茉莉酸(JA)在调控防御应答相关基因的表达时, 主要与真菌类激发子、虫害、干旱、伤害以及渗透等逆境胁迫的应激反应相关。在本研究中, 感病材料掖 478 经茉莉酸甲酯(MeJA)处理后, *WRKY76* 基因的表达都受到了抑制, *WRKY76* 基因在 1 h 表达量为对照的 0.6 倍, 其他调查时间点基本都在 0.1~0.3 之间, 在处理时间段内, 表达呈现下降趋势。而在抗病材料 R15 中, *WRKY76* 基因表达呈现上升趋势, 变化趋势不明显, 具体表现为处理 4~12 h 时间段内相对表达量维持在 1.8 倍左右(图 5)。综合分析表明, *WRKY76* 基因在茉莉酸参与的信号转导途径中是下调表达的。在 JA 途径中, JA 促进 MYC 表达, MYC 增强抗病基因 *VSP2* (vegetative storage protein 2) 表达却负调控 *WRKY76* 表达, 因此 *WRKY76* 基因受到抑制的效果更明显。

3 讨论与结论

WRKY 是一种受诱导表达的转录因子, 在高等植物应对生物与非生物胁迫反应的转录调控中有重要功能, 且具有快速、瞬时表达的特点 (Dong et al, 2003; Pandey & Somssich, 2009)。在病原物胁迫及防卫反应信号分子如水杨酸及茉莉酸处理下均能诱导 *WRKY* 的表达 (Park et al, 2006)。

WRKY76 在两个抗感自交系接种立枯丝核菌后均具有受诱导性及快速瞬时表达的特点, 在 1 h 的相对表达量达到顶峰, 抗性材料 R15 表达量升高的倍数高于感病材料掖 478, 这与诱导防卫应答过程中 *WRKY* 基因发挥的转录调控功能相似 (Dong et al,

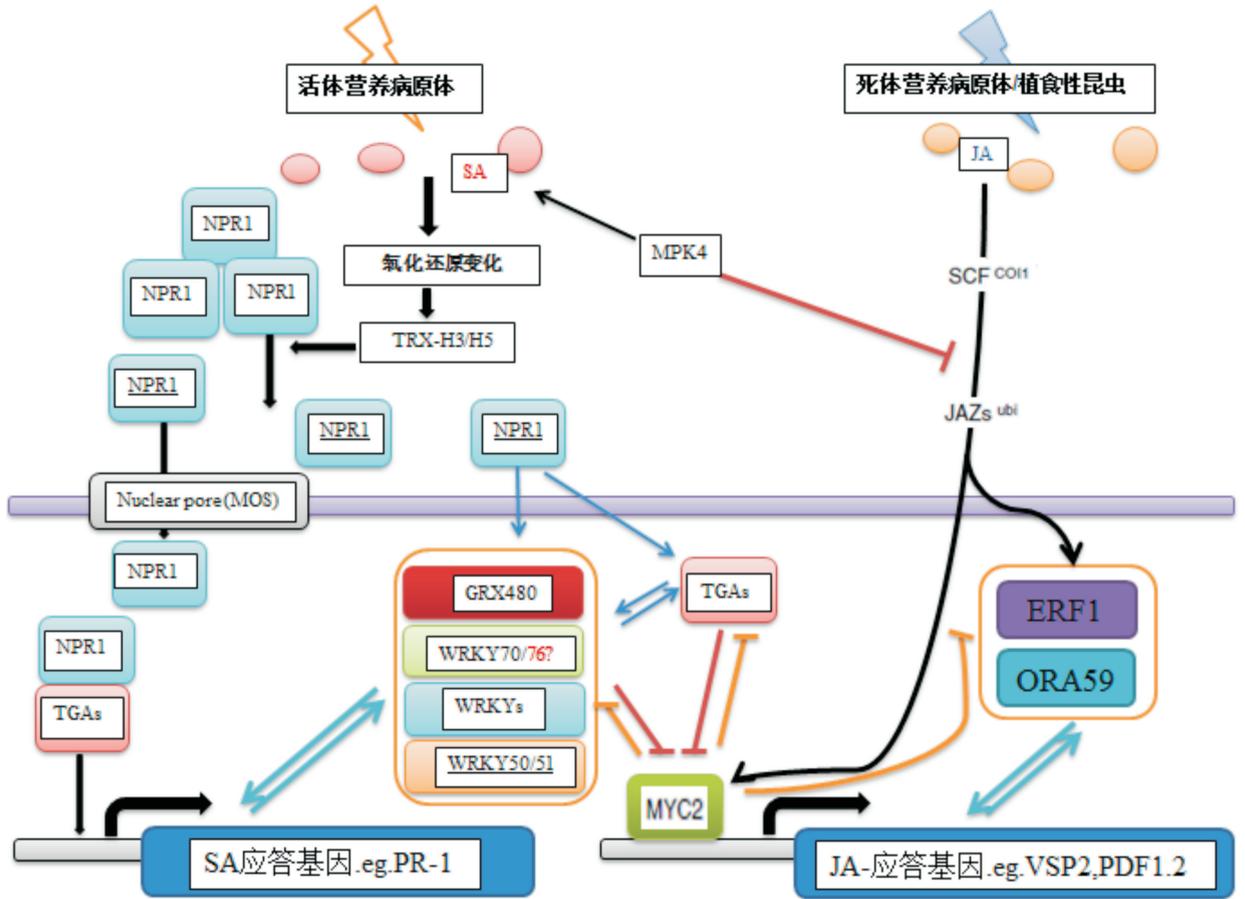


图7 *WRKY76* 在 SA 及 JA 途径中的调控作用 箭头代表正调控作用; T 代表抑制作用。

Fig. 7 Regulatory effects of *WRKY76* in the SA and JA pathways Arrows represent a positive regulation role; T represent inhibitory effect.

2003)。在接菌 6、12、24 h 这三个关键时期的高表达且相对表达量存在显著差异,即抗病材料高于感病材料,这与 *VpWRKY1* 和 *VpWRKY2* 受白粉菌诱导表达相似(李慧娥, 2010)。

水杨酸(SA)信号分子与植物病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)激发的免疫反应(PAMP-triggered immunity, PTI)和效应子激发的免疫反应(effector-triggered immunity, ETI)(Katagiri & Tsuda, 2010)存在着紧密联系(Ryals et al, 1996; Bostock, 2005)。当受到病原菌侵入时,植物会产生移动免疫信号分子(MeJA、壬二酸、磷酸甘油脱氢酶)和脂质转移蛋白(defective in induced resistance 1, DIR1; azelaic acid induced 1, AZI1),通过维管组织运输到整个植物体中,使得植物未被侵染部位产生抗病性,阻止病害进一步蔓延(Spoel & Dong, 2012)。本研究中,玉米经信号分子 SA 处理后, *WRKY76* 基因都迅速而强烈的上调表

达,证实其在转录水平上参与调控植物抗纹枯病防卫应答(Dong et al, 2003),同时这与拟南芥中大多数 *WRKY* 基因都受 SA 的诱导而上调表达结果相符(Eulgem et al, 2000)。表明该基因可能作为 SA 信号传导的重要成员,同时该基因的表达与 SA 信号分子的积累有直接联系,它可能通过调控下游的 NPR1(non-expressor of pathogenesis-related gene 1),使其从胞内向核内移动, NPR1 激活细胞核内 *WRKY* 的表达而启动植物的免疫反应(Ülker & Somssich, 2004; Eulgem & Somssich, 2007; Rushton et al, 2010; Spoel & Dong, 2012),参与玉米与 AG1-IA 的互作,指导植物做出抗病反应。

JA 信号转导也是植物抗性反应的重要途径,主要参与伤害引起的信号转导(Katagiri et al, 2010)。用 MeJA 处理玉米后 *WRKY76* 基因的表达明显受到抑制。JA 信号转导能负调控依赖 SA 信号分子的防卫基因的表达(Petersen et al, 2000; Kachroo et al,

2001), *AtWRKY70* 则在激活 SA 诱导基因表达的同时, 抑制 JA 诱导基因的表达 (Li et al, 2004)。*WRKY76* 所具有的 SA 诱导上调和 JA 诱导下调特性, 推测可能在 SA 和 JA 信号转导中具有与 *AtWRKY70* 相似的功能, 即 *WRKY76* 具有负调控茉莉酸 JA 响应基因 *VSP2* 及 *PDF1.2* (plantdefensin1.2) 的表达 (Hu et al, 2012)。

随着近年来深入和广泛的研究, 越来越多的 WRKY 家族成员被证明参与了植物的病原相关反应。在我们的研究中, MeJA、SA、病原菌均能诱导 *WRKY76* 转录因子表达。玉米 R15 和掖 478 在接种立枯丝核菌后, 目的基因先上调表达并且反应非常迅速, 证实 WRKY 转录因子参与抗纹枯病调控途径。接种 1 h 后, *WRKY76* 的相对表达量达到最高, 而此时 AG1-IA 的孢子刚刚侵染玉米叶鞘的表皮层, 暗示 *WRKY76* 可能参与了玉米病原菌侵染早期的防卫反应。

植物在受到外界环境影响后, 体内伴随着一系列防御反应信号途径的激活, 其中最主要的是水杨酸信号转导途径和茉莉酸信号转导途径。利用实时荧光定量 PCR 发现 *WRKY76* 具有受 SA 诱导上调表达和 JA 诱导下调表达特性。在 SA 途径中, SA 信号增强 *WRKY76* 表达从而促进 SA 响应基因的表达使得植物的抗病性增强。在 JA 途径中, JA 信号增强 *MYC2* 的表达, 而 *MYC2* 转录因子却抑制 *WRKY76* 的表达。这些与拟南芥 *WRKY70* 调控功能相似。

参考文献:

BALDONI E, MATTANA M, LOCATELLI F, et al, 2013. Analysis of transcript and metabolite levels in Italian rice (*Oryza sativa* L.) cultivars subjected to osmotic stress or benzothiadiazole treatment [J]. *Plant Physiol Biochem*, 70:492-503.

BOSTOCK RM, 2005. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit [J]. *Ann Rev Phytopathol*, 43:545-580.

DONG J, CHEN C, CHEN Z, 2003. Expression profiles of the *Arabidopsis WRKY* gene superfamily during plant defense response [J]. *Plant Mol Biol*, 51(1):21-37.

EULGEM T, RUSHTON PJ, ROBATZEK S, et al, 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. *Trends 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(4):366-371.

HU Y, DONG Q, YU D, 2012. *Arabidopsis WRKY46* coordinates with *WRKY70* and *WRKY53* in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae* [J]. *Plant Sci*, 185-186:288-297.

KACHROO P, SHANKLIN J, SHAH J, et al, 2001. A fatty acid de-

saturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 98(16):9448-9453.

KATAGIRI F, TSUDA K, 2010. Understanding the plant immune system [J]. *Mol Plant-micr Inter*, 23(12):1531-1536.

LI HE, 2010. Chinese wild east grape powdery mildew resistant lines of Baihe-35-1 transcription factor gene (*WRKY*) expression and function analysis [D]. Northwest Agriculture and Forestry University:37-49. [李慧娥, 2010. 中国野生华东葡萄抗白粉病株系白河-35-1 转录因子基因 (*WRKY*) 表达与功能研究 [D]. 西北农林科技大学:37-49.]

LI J, BRADER G, 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.

LI JB, LUAN YS, JIN H, 2012. The tomato *SlWRKY* gene plays an important role in the regulation of defense responses in tobacco [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 427(3):671-676.

MAO P, DUAN M, WEI C, et al, 2007. *WRKY62* transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression [J]. *Plant Cell Physiol*, 48(6):833-842.

PANDEY SP, SOMSSICH IE, 2009. The role of WRKY transcription factors in plant immunity [J]. *Plant physiol*, 150(4):1648-1655.

PARK CJ, SHIN YC, LEE BJ, et al, 2006. A hot pepper gene encoding WRKY transcription factor is induced during hypersensitive response to tobacco mosaic virus and *Xanthomonas campestris* [J]. *Planta*, 223(2):168-179.

PENG Y, BARTLEY LE, CANLAS P, et al, 2010. OsWRKY IIa transcription factors modulate rice innate immunity [J]. *Rice*, 3(1):36-42.

PETERSEN M, BRODERSEN P, NAESTED H, et al, 2000. Arabidopsis MAP Kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance [J]. *Cell*, 103(7):1111-1120.

QIN Z, LÜ H, ZHU X, MENG C, et al, 2013. Ectopic expression of a wheat WRKY transcription factor gene TaWRKY71-1 results in hyponastic leaves in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS ONE*, 8(5):e63033.

REN CM, ZHU Q, GAO BD, KE SY, et al, 2008. Transcription factor WRKY70 displays important but no indispensable roles in jasmonate and salicylic acid signaling [J]. *J Integr Plant Biol*, 50(5):630-637.

RUSHTON PJ, SOMSSICH IE, RINGLER P, et al, 2010. WRKY transcription factors [J]. *Trends Plant Sci*, 15(5):247-258.

RYALS JA, NEUENSCHWANDER UH, WILLITS MG, et al, 1996. Systemic acquired resistance [J]. *Plant Cell*, 8(10):1809-1819.

SPOEL SH, DONG X, 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells [J]. *Nat Rev Imm*, 12:89-100.

SUN J, AN H, SHI W, GUO X, 2012. Molecular cloning and characterization of GhWRKY11, a gene implicated in pathogen responses from cotton [J]. *S Afr J Bot*, 81:113-123.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 28(10):2731-2739.

(下转第 272 页 Continue on page 272)