

巴西橡胶树 *HbWRKY1* 基因的克隆及转化烟草的初步研究

张全琪^{1,2}, 倪燕妹¹, 朱家红², 黄志^{1*}

(1. 广东农垦热带作物科学研究所, 广东 茂名 525140; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海口 571101)

摘要: 利用 RACE 结合 RT-PCR 技术, 从巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)总 RNA 中扩增得到长度为 1234 bp 的 *WRKY* 基因 cDNA 全长编码序列。通过氨基酸同源性比对, 该序列推导的氨基酸序列与蓖麻、白杨的 *WRKY* 同源性分别为 79% 和 73%, 表明分离的 cDNA 序列为橡胶树 *WRKY* 基因, 命名为 *HbWRKY1*。通过构建 pCAMBIA1304-*HbWRKY1* 植物表达载体, 经农杆菌 GV3101 介导, 将 *HbWRKY1* 基因导入烟草(*Nicotiana tabacum*)中, 对所获得的潮霉素抗性烟草株系进行 PCR 鉴定。结果表明, *HbWRKY1* 基因已整合到 65 株转基因植株中。干旱胁迫试验表明, *HbWRKY1* 的过量表达可以明显提高转基因烟草对干旱胁迫的耐受能力。这说明 *WRKY* 基因与橡胶树抗旱能力之间存在一定的关系。

关键词: 巴西橡胶树; *HbWRKY1*; 基因克隆; 烟草; 耐旱性

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.04.006

Cloning of *HbWRKY1* Gene from *Hevea brasiliensis* and Its Transformation in *Nicotiana tabacum*

ZHANG Quan-qi^{1,2}, NI Yan-mei¹, ZHU Jia-hong², HUANG Zhi^{1*}

(1. Guangdong State Farms Tropical Crop Research Institute, Maoming 525140, China; 2. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Using RACE and RT-PCR techniques, a novel member of *WRKY* gene family, named as *HbWRKY1*, was isolated from *H. brasiliensis*. Bioinformatics analysis showed that the full length cDNA of *HbWRKY1* was 1234 bp, containing a 912 bp open reading frame and encoding 303 amino acids. The deduced amino acid sequence was highly homologous to *WRKY* proteins from *Ricinus communis* and *Populus tremula* × *P. alba* by 79% and 73%, respectively. The *HbWRKY1* was constructed into pCAMBIA1304 expression vector, and transformed into tobacco (*Nicotiana tabacum*) mediated by *Agrobacterium*. Sixty-five hygromycin B (*Hyg*) resistant regenerated plantlets of tobacco were selected. PCR detection indicated that all the *Hyg* resistant tobacco plants contained the alien *HbWRKY1* gene. It confirmed that the over-expression of *HbWRKY1* under drought stress could obviously enhanced drought-tolerance of transgenic tobacco plantlets. Therefore, it suggested that there were relationship between *WRKY* gene and drought tolerance of *Hevea brasiliensis*.

Key words: *Hevea brasiliensis*; *HbWRKY1*; Gene clone; *Nicotiana tabacum*; Drought resistance

植物为适应和抵御各种生物和非生物胁迫, 在长期的进化过程中形成了一整套复杂而有效的

适应性机制, 其中, 基因表达的转录调节在植物应答各种胁迫过程中起着十分重要的作用。转录因

收稿日期: 2011-09-08

接受日期: 2011-11-26

基金项目: 天然橡胶产业技术体系基金项目(CARS-34-ZD1); 国家自然科学基金项目(30760917)资助

作者简介: 张全琪, 硕士, 助理研究员, 主要从事橡胶树抗逆生理研究工作。E-mail: quanqizhang@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: gkrzshuangzhi@163.com

子是植物中最重要的一类调节因子。*WRKY* 是近年来报道的一类植物特有的新型转录调控因子, 因在其 N 端含有由 *WRKYGQK* 的 7 个氨基酸组成的高度保守序列而得名。自 1994 年 Ishiguro 和 Nakamura 从甘薯 (*Ipomoea batatas*) 中首次克隆得到第一个 *WRKY* 转录因子 SPF1 后, 人们相继在欧芹 (*Petroselinum sativum*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、烟草和水稻 (*Oryza sativa*) 等多种植物中分离得到 *WRKY* 基因^[1-4]。

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 是天然橡胶的主要来源, 在世界经济中一直占有重要的地位, 是一种非常重要的热带经济和能源作物^[5]。然而, 随着全球气候环境的日益恶化, 干旱、低温等极端天气对橡胶种植业的影响逐渐显现出来。乙烯利作为天然橡胶生产过程中频繁使用的一类生长调节剂, 在刺激橡胶树增产及应答各种生物和非生物胁迫信号过程中发挥重要作用。为了弄清乙烯利在刺激橡胶树增产及应答信号转导中的分子机制, 我们构建了乙烯利诱导下的胶乳抑制性削减文库, 并获得了一批差异表达的 EST 序列^[6], 其中 No. 125 EST 序列编码的蛋白和其他植物中的 *WRKY* 蛋白具有较高的同源性。已有的研究发现, *WRKY* 基因广泛参与植物的抗逆胁迫和衰老等生理生化过程, 干旱、病原菌侵染、机械伤害和植物激素类物质的刺激 (如乙烯利、茉莉酸、水杨酸) 等均能诱导 *WRKY* 基因的表达^[7-9]。这暗示着巴西橡胶树中相应基因的表达可能受到乙烯利的调控, 并可能参与了乙烯利刺激橡胶树增产过程及应答某种生物或非生物胁迫的分子调节。本研究用 RACE 结合 RT-PCR 技术从巴西橡胶树中克隆到 *HbWRKY1* 基因, 利用根癌农杆菌介导的叶盘法将 *HbWRKY1* 导入烟草, 探讨 *HbWRKY1* 基因的表达特性及其与橡胶树抗逆性的关系, 为进一步研究 *HbWRKY1* 基因功能及深入了解乙烯利刺激橡胶树增产的分子机制提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 植物材料

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 无性系 RRIM600 种植在中国热带农业科学院实验农场, 选取 6 年树龄的未开割树采集胶乳并迅速置于液氮中冷冻, -70°C 下保存。胶乳总 RNA 的提取参照张治礼等^[10]的方法进行。

1.2 *HbWRKY1* 基因的克隆

应用抑制性消减杂交技术, 我们成功构建了乙烯利刺激下巴西橡胶树胶乳与未处理胶乳差异表达的 cDNA 消减文库, 根据在筛选削减文库时获得的 No. 125 EST 序列设计两个 5'RACE 特异性引物 GSP1: 5'-ATCCGCAACCTTAACCGGTTTC-3'、GSP2: 5'-TGGAGGCTGAGGAAATCGACG-3', 分别与通用引物 UPM: 5'-CTAATACGACTC-ACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGC-AGAGT-3' 配对组成两对巢式引物进行 5' 端的克隆。设计 3'RACE 特异性引物 GSP3: 5'-TCTGATGAAGCGTCCACAATTTCATGG-3' 进行 3' 端的克隆。具体操作参照 CLOTECH 公司的 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行。将扩增出的 DNA 连接到 pGEM-T 载体上进行序列测定。将所获得的序列和已有的 EST 序列进行拼接, 为了保证分离出的片段来自同一个基因, 分别在 5' 端起始密码子的上游和 3' 端终止密码子的下游设计特异引物 F1: 5'-ATGACATGCAATACCTGC-3', F2: 5'-CTAATTACTCTGGGCATTACC-3' 进行全长 cDNA 的扩增, 然后将扩增的 DNA 片段连接到 pGEM-T 载体上进行测序, 将测序结果与拼接结果进行比较, 利用网上数据库进行 BLAST 分析, 用 DNAMAN 软件进行序列比对, 将测序正确的 *WRKY*-cDNA 序列命名为 *HbWRKY1*。

1.3 *HbWRKY1* 的生物信息学分析

蛋白质特性分析 利用 ProtParam 软件 (<http://us.expasy.org/tools/ProtParam.html>) 对推导的 *HbWRKY1* 氨基酸序列进行理化特性分析, 同时利用 NCBI CD-Search service 工具和 Expasy 软件 (<http://us.expasy.org/prosite/>) 对 *HbWRKY1* 的结构域分析。

系统进化树分析 将巴西橡胶树 *HbWRKY1* 与其他植物的 *WRKY* 转录因子进行氨基酸水平的聚类分析。系统进化树包括 18 个 *WRKY* 蛋白, 分别为巴西橡胶树的 GU372969; 拟南芥的 AF331713、AF224698、AF418309、AF509499、AF426253、AF224700 和 AF421157; 水稻的 DQ298180、BK005035、DQ298181、DQ298182、DQ298183、DQ298184、DQ298185、DQ298186 和 AF193802 以及欧芹 (*Petroselinum sativum*) 的 U48831。

亚细胞定位及功能分类 用 Psort 软件 (<http://www.psort.org>) 分析 HbWRKY1 转录因子的亚细胞定位。用 Protfun 在线工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>) 预测 HbWRKY1 蛋白的功能分类。

1.4 根癌农杆菌介导 HbWRKY1 转化烟草

植物表达载体的构建 根据 HbWRKY1 基因的编码区序列设计引物 EWRKYa: 5'-ATCCATGGGCTATGGAAGGGAAAGAAGAGGT-3' (含酶切位点 NcoI) 和 EWRKYb: 5'-CGACTAGT-TCTACTCCTCGTTTAGCATATGGGA-3' (含酶切位点 SpeI), 将扩增的 HbWRKY1 基因 ORF 片段经 NcoI、SpeI 双酶切后连入载体 pCAMBIA1304, 构建植物表达载体 pCAMBIA1304-HbWRKY1, 取适量 pCAMBIA1304-HbWRKY1 质粒导入根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 感受态细胞, 获得工程农杆菌 GV3101 (pCAMBIA1304-HbWRKY1)。

转 HbWRKY1 基因烟草的获得 农杆菌 GV3101 (pCAMBIA1304-HbWRKY1) 在附加利福平 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、卡那霉素 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的 YEB 液体培养基中常规活化, 培养至 OD_{600} 约为 0.6~0.8。将烟草 (*Nicotiana tabacum*) 无菌苗叶片的边缘和叶脉剪去, 切成 $0.4 \text{ cm} \times 0.6 \text{ cm}$ 大小, 在准备好的农杆菌菌液中浸泡 5 min。用无菌滤纸吸干植物材料表面的菌液, 转入表面铺一层滤纸的 MS 固体培养基上, 于 28°C 下暗培养, 以转化空载体作为对照。3 d 后将叶片转到附加 20 mg L^{-1} 潮霉素、 300 mg L^{-1} 头孢霉素的 MS 分化培养基上, 进行光照培养, 每 3 周继代培养 1 次。约 1~2 月后, 将约 2 cm 高的幼苗转到 1/2MS 生根培养基上生根。待根系发育良好后, 移栽到土壤中。

转基因烟草 PCR 检测 采用 SDS 法^[11-12] 提取转基因烟草的基因组 DNA, 按照 pCAMBIA1304 载体上连接目的基因位点两侧的序列合成 PR-F 和 PR-R 引物, 并以 pCAMBIA1304-HbWRKY1 质粒 DNA 为阳性对照, 以野生型烟草植株为阴性对照, 进行 PCR 扩增, 检测转基因烟草中的 HbWRKY1 基因。

干旱胁迫实验 将经 PCR 检测筛选出的阳性转基因植株移栽至装有旱地耕作层干土的盆中, 缓苗 10 d 左右植株进入正常生长期后即可进行干旱胁迫实验, 胁迫实验开始前 1 d 每盆植株浇透水,

使土壤含水量达到田间持水量水平, 次日开始胁迫实验后停止供水使其自然下降, 当达到预定的胁迫强度下限后, 每天称重浇水使其土壤含水量维持在胁迫水平, 于植株干旱胁迫 15 d 后复水, 观察处理植株恢复情况。

2 结果和分析

2.1 巴西橡胶树 WRKY 基因的克隆

通过对巴西橡胶树已有的 No. 125 EST 序列进行分析, 结果表明, 该序列与其他植物中的 WRKY 一致性较高, 表明该 EST 序列可能为巴西橡胶树胶乳 WRKY 基因片段。在此基础上设计 5' RACE 和 3' RACE 引物对其 5' 和 3' 端进行扩增, 结果获得了约 480 bp 的 5' 端片段和 300 bp 的 3' 端片段。经回收、克隆和测序后证实, 5' 端片段有 479 bp, 3' 端片段有 296 bp。利用 DNAMAN 软件, 将 3'、5' 端序列与同 HbEST 125 序列进行拼接, 得到了一条长度为 1234 bp 的 cDNA 序列。根据拼接好的序列设计引物 EWRKY1 和 EWRKY2 对 HbWRKY1 编码区进行扩增, 得到一条约 900 bp 的特异带, 与预期结果一致。回收目的条带, 插入 pMD18-T 克隆载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 获得阳性重组质粒, 经 BamHI、XhoI 双酶切鉴定, 与扩增特异条带大小一致。测序结果表明该编码区序列长 912 bp, 与拼接结果序列完全一致, 证明了克隆的 3 个片段确实来自于同一个基因。用 ORF finder 软件分析表明, 该基因 cDNA 全长为 1234 bp, 包含 1 个 912 bp 的完整开放阅读框序列 (ORF), 编码 1 个含有 303 个氨基酸残基的多肽; 以及 178 bp 的 5' 非编码区和 145 bp 的 3' 非编码区; 用巴西橡胶树基因组 DNA 为模板进行扩增, 结果表明该基因含有两个内含子 (图 1)。在 NCBI 网站进行序列比对, 该 cDNA 序列与其他植物的 WRKY 基因具有较高的相似性, 与蓖麻 (*Ricinus communis*)、杨树 [(*Populus tomentosa* \times *P. bolleana*) \times *P. tomentosa*] 和大豆 (*Glycine max*) WRKY 基因 (EEF47235、GQ377433 和 ABC26920) 的核苷酸序列相似性分别达 81%、78% 和 75%, 氨基酸序列相似性分别达 79%、73% 和 59%。这表明, 我们分离的 cDNA 序列为橡胶树 WRKY 基因, 将其命名为 HbWRKY1, 这是首次公开报道从热带产胶植物巴西橡胶树中克隆获得 WRKY 基因, GenBank 登录号为 GU372969。

```

ATGGAAGGGAAAGAGAGGTAAAGATTGACAATATTGTGGATCGTCAACATTTTOCTGATAATACTCAGAGCAGT 75
M E G K E E V K I D N I V G S S T F P D N T Q S S
TATOC TTTOCAGGGTGATTGATTCTGTGAAGGAGATAAGAGCTCGTTAGGGTTTATGGAGCTACTGGGTA TG 150
Y P F Q G V F D F C E G D K S S L G F M E L L G M
CAGGACTTCAGTGTCTOOGTGTGATATGCTTCAGGTACCATCTGTGGTGCAACCTGCAGCTTCTAATCCTG TA 225
Q D F S A S V F D M L Q V P S V V Q P A A S N P V
GCAACAAAGA TGAATOGCCAGAGGTGTTG AATCAGCTGCAACTOCTAATCTTTCGTCGATTTCTCAGCTOC 300
A T K M E S P E V L N Q P A T P N S S S I S S A S
AGTGATGCTT TAAATGATGAACOGGTTAAGGTTGOGGATAATGAGGAAGAAGAGCAGCAGAAGACCAGGAAAGAG 375
S D A L N D E P V K V A D N E E E E Q Q K T R K E
GTGAGTTTCAATGCTATTTTTCCTTTAATTTTAAAGTTTAAAGTTAAACCCACTTGAGAAAAACATGGGGCATTTC 450
ACTTTTGGT TTGOGTTGGTG TAAAGCTTGGGATOCCCATTCGACGAGTAATTAAGAAGAACAGAAAGGTC TA 525
TTTGT TATAAGATTTGAACCTGAAGATTGATGGTTTTTGTGCTTGTTC TAGTTGAAGCCCAAGAAGACAAAT 600
L K P K K T N
CAGAAGAGACAGAGAGAGCCGAGATTCGCATTCATGACGAAAGAGCGAAGTTGATCATCTGGAAGATGGGTACAGA 675
Q K R Q R E P R F A F M T K S E V D H L E D G Y R
TGAGAAAGTACGGCCAGAAAGCTGTGAAAAATAGCOOCTTTOCTTAGTACTAATTCATGTTAACCAATTGC 750
W R K Y G Q R A V K N S P F P
AGTTC TTTCATTATGCGGTAATTTT TAGTTTCATATTTGTTTATATTTTGGTCCAAATATTGATAGGTTGGCT 825
TGTTTGGCTTTTGATTTAGGAGTTACTATCGTTGCACCCAGTGCCTCTGTAATGTGAAGAAGAGAGTAGAGAGA 900
R S Y Y R C T S A S C N V K K R V E R
TCTTTCAGTGATCCAAGCATAGTTGTAACCACTATGAAGGCCAACATACCCATCTAGCGCTGTCATGGCCCGT 975
S F S D P S I V V T T Y E G Q H T H P S A V M A R
CCAAGCTTTACTGGAGCTGCATCAGAGTCTGGTTCTCTACTCTGCTTTTGCCATGCAATGCAAAAGAGATTG 1050
P S F T G A A S E S G F S T S A F A M P M Q R R L
TCACACTTTCAGCAGCAGCAACCAACCTTTCTCAATAGCTTCACAGCTTTGGGTTTGGTTATAAAGGAAACAG 1125
S H F Q Q Q Q P F L N S F T A L G F G Y K G N T
AATGCTACTTTCTACATGAGAGGCGCTTTTGCACCCAGGGCTGATTGCTTGAAGATCATGGGCTTCTT 1200
N A T F L H E R R F C T S P G S D L L E D H G L L
CAAGACATG TOCCTTCCATATGCTAAACGAGGAGTAG 1239
Q D I V P S H M L N E E *
    
```

图1 *HbWRKY1* 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列。划线部分为两个内含子,阴影部分为 WRKY 家族 7 个绝对保守的氨基酸残基及 C2H2 锌指结构。

Fig. 1 Nucleotide sequence of *HbWRKY1* and deduced amino acid sequence. Two introns are signaled by underline, a conserved WRKYGQR amino acids sequences and a C2H2 zinc finger domain are shaded in gray.

2.2 *HbWRKY1*的生物信息学分析

利用 ProtParam 软件对推导的 *HbWRKY1* 氨基酸序列进行理化特性分析,结果表明, *HbWRKY1* 的分子量为 33.87 kD,理论等电点为 5.87。其中极性氨基酸(W, Y, S, C, M, N, E, T, D, Q, K, R, H)占 61.7%,极性氨基酸的带电氨基酸(D, E, H, K, R)占 25.8%;酸性氨基酸(D, E)占 12.6%,碱性氨基酸(H, K, R)占 13.2%;疏水性氨基酸(A, F, I, L, M, P, V, W, Y)占 39%。蛋白质不稳定指数估算值为 59.33,属于不稳定蛋白质。

利用 NCBI CD-Search service 工具和 ExPasy 软件对 *HbWRKY1* 的结构域进行分析表明, *HbWRKY1* 含有 1 个 WRKY 结构域和 1 个 FLYWCH 锌指结构域(图 2)。应用 DNAMAN 5.2 软件将 *HbWRKY1* 与其他植物已知的 WRKY 蛋白进行多序列比较,结果表明, *HbWRKY1* 与拟南芥(NP_182248)、大豆(ABC26920)、蓖麻(EEF47235)和马铃薯(*Solanum tuberosum*, ABU49723)的 WRKY 蛋白具有较高的同源性,都具有一个典型的 WRKY 结构域和一个 FLYWCH 锌指结构域(图 3)。

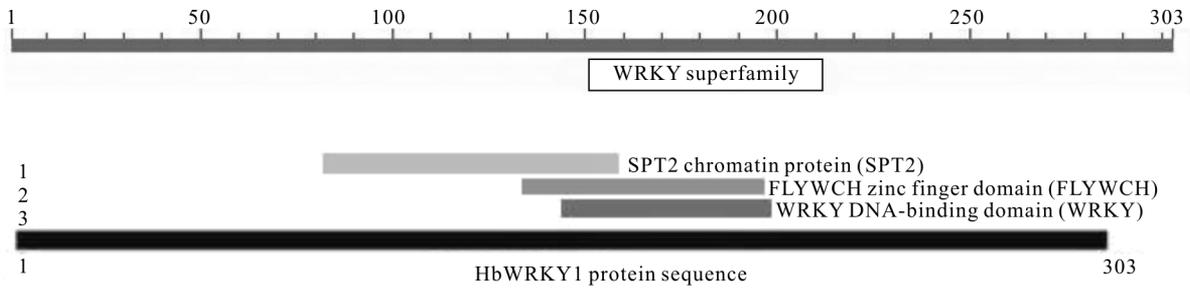


图2 巴西橡胶树 HbWRKY1 转录因子结构图

Fig. 2 Sketch map of HbWRKY1 transcription factor domain

HBWRKY1	MEGKE.EVVIDNIVGSS.....TFPDNTQS...SYPFQGVFD.FCEGDKSSLGFME LLGMQD..FS.AS	56
ATWRKY	MEFTDFSKTSFYYPSSQ...SVWDFGDLAAAERHSLGFME LLSSQQHQDFATVSPHSFLLQTS..QPQTQ	65
GMWRKY	MEKKEMAVKTEDAVGSS.....SFPNYNSN..LYPFSNAFD.FSEVEKSSLGFME LLGVQD..YS..P	57
RCWRKY	MEGTE.AVKIENIVGSSPPPTTAFPDLLYG...SYPLQSVFDNFYGGDKSSLGFLE LLGVQD..FTSPS	64
STWRKY	ME SYK.DIKMEDHHPMY.....FIDNNMFG....VTNHS LIS.DYNINTSSLGFME LLGFHQDFYSSAS	58
SPT2		
HBWRKY1	VFDMLQVP..SVVQPAASNP....VATKMESEV L N.QPATPNSSS ISSAS SDALNDE.....PVKVA	112
ATWRKY	TQPSAKLSSSI IQAPPSEQLVTSKVESLCS DHLLIN.PPATPNSSS ISSAS SEALNEEKPKTED.NEEEG	133
GMWRKY	LLELPQLSTVSVQSHHSTVTV.P.SDNKGECEV L NHQPATPNSSS ISSAS TDAVNDEQKKTLDQAEEDD	126
RCWRKY	VFDTLQLPSTTMQPPATMNSPAVVTKMESEVFN.QPATPNSSS ISSAS SEALNDEA.....PIKAV	127
STWRKY	VFELPKENYCPAVCVSEEEV K.PSSVAPESQIIS.SATVATGNV L NTPSTPNCS S ISSEGHGDADGEV	126
chromatin protein		
WRKY DNA		
FLYWCH zinc		
HBWRKY1	DNEEEEQQRTRKELKPKKIN.CKRQREPRFAFM TKSEVDHLEDGYRWRKYGQKAVKNSPFPRSYRCTSA	181
ATWRKY	GEDQQEKSHTKKQLKAKKNN.CKRQREPRFAFM TKSEVDHLEDGYRWRKYGQKAVKNSPFPRSYRCTTA	202
GMWRKY	DDDDEGRHRTKKQLKPKKIN.CKRQREPRFAFM TKSEVDHLEDGYRWRKYGQKAVKNSPFPRSYRCTSV	195
RCWRKY	DNEEEEQQRTRKELKPKKIN.HKRQREPRFAFM TKSEVDHLEDGYRWRKYGQKAVKNSPFPRSYRCTTA	196
STWRKY	ENHEQQNTKTRKQLKAKKIVSQKKQKPRFAFM TKSEVDFLEDGYRWRKYGQKAVKNSPFPRSYRCTNA	196
binding domain		
finger domain		
HBWRKY1	SCNVKKRVERSFSDPSIVVTTYEGQHTHPSAVMARPSFTGAASE..SGFSTSA...FAMPQRRLSHFQC	246
ATWRKY	SCNVKKRVERSFSDPSIVVTTYEGQHTHPSPLTSRPISTGGFFGSSGAASSLGNGCFGFPIDGSTLISPC	272
GMWRKY	SCNVKKRVERSFSDPSIVVTTYEGQHTHPSVMPRPSVSSGYANNFASVPLPG...NYLSQYQQQHHHC	262
RCWRKY	SCNVKKRVERSFSDPSIVVTTYEGQHTHPSVMPRPSVFGAASE..SGFSATN...FAMPQRRLSLYQC	261
STWRKY	TCNVKKRVERCFSDPSIVVTTYEGKHTHPSMNMMSRP.....NCYPIN...PLLSPGAF T LPMQ	255
HBWRKY1	QQQPF LNSFTALGFYKGN T...NATFLHERRFCTSPGS.....DLLEDHGL.LQDIVPSHMLNEE..	303
ATWRKY	FQQLVQYHHQQQQLM SCFGGVNEYLNSHANEYGDNRVKKSRVLVKDMGL.LQDVVPSHMLKEE..	337
GMWRKY	QOKLLVNTLSSLGFYNDSSPKNAVF IQERRLC SNQGTN....AFLRDHGL.LQDVVPSHMLKEE..	323
RCWRKY	PQQPFNSFPLGFGYNSTT...NASLLHEKRFCTAPGA.....ALLEDHGL.LQDIVPSHMLKEE..	317
STWRKY	FNINQSFNYLAMNQLDH.....AAFVAQGRRFCSNTEM.....LGDEHGLDQLDLP S AVLKHEYN	311

图3 植物 WRKY 基因编码的氨基酸序列比较

Fig. 3 Comparison of deduced amino acid sequences of WRKY among plants

将巴西橡胶树 HbWRKY1 与其他植物的 WRKY 转录因子进行氨基酸水平的聚类分析 (图 4), 结果表明, 巴西橡胶树 HbWRKY1 与属于 WRKY 家族中第 II 类的 AtWRKY6、AtWRKY18、OsWRKY62、OsWRKY76、OsWRKY32 的亲缘关系相近, 说明 HbWRKY1 也属于 WRKY 家族中的

第 II 类, 它们具有类似的功能与结构。

用 Psort 软件 (<http://www.psort.org>) 对 HbWRKY1 转录因子进行亚细胞定位, 结果表明, 该蛋白最终定位于细胞核的可能性最大, 为 30%。用 Protfun 在线工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>) 预测 HbWRKY1 蛋白的功能分类, 结果表明该蛋白

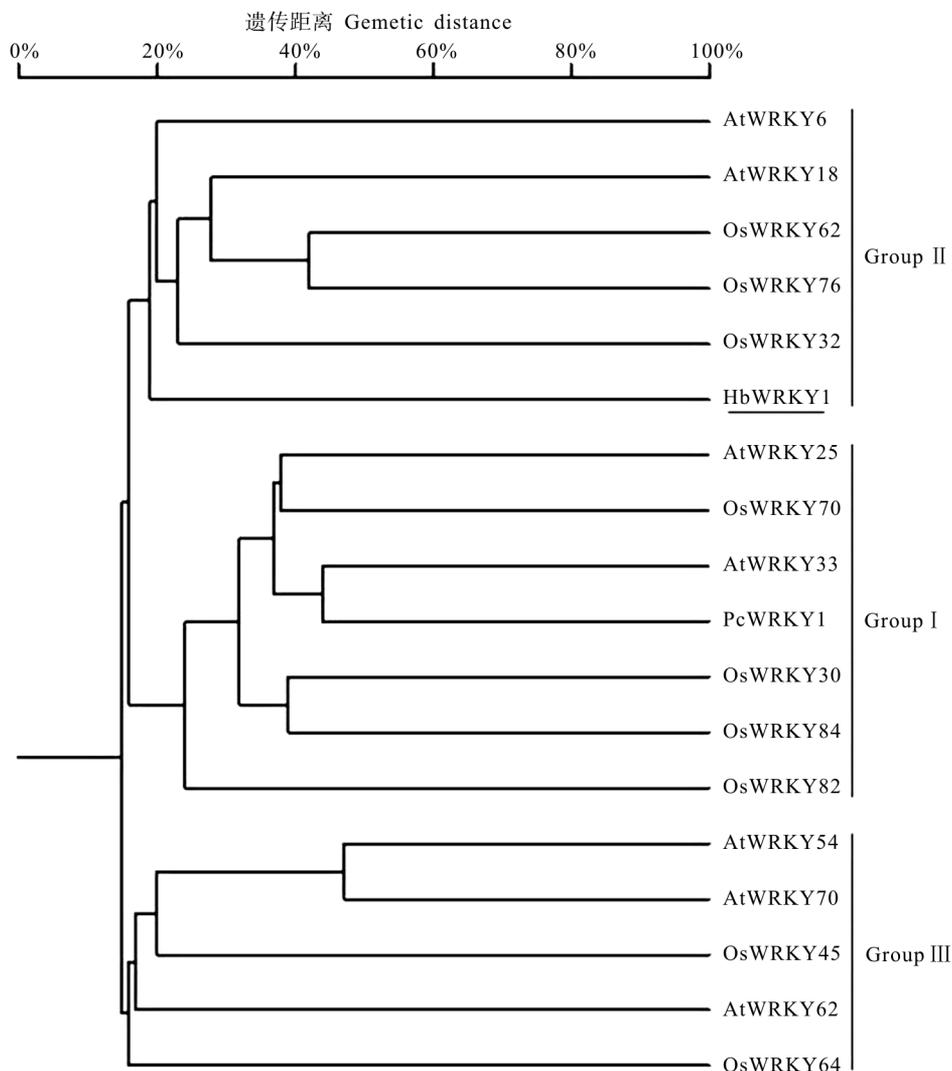


图4 WRKY蛋白的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of WRKY

具有转录、转录调控、信号传导和逆境应答的可能性分别达到0.537、0.363、0.064和0.025,其可能性远高于其他功能。植物WRKY转录因子在转录、转录调控、信号传导和逆境应答中的功能已经得到证实,因此推测HbWRKY1蛋白在橡胶树中可能具有转录、转录调控、信号传导和逆境应答的功能。

2.3 *HbWRKY1*的遗传转化

应用根癌农杆菌GV3101 (pCAMBIA1304-*HbWRKY1*)植物转化系统对烟草进行遗传转化,初步获得了65株潮霉素抗性烟草再生株系(图5)。

转基因烟草植株PCR检测 以野生型植株及转基因苗的基因组DNA为模板,按照pCAMBIA1304载体上连接的目的基因两侧的序列分别合成PR-F和PR-R引物,并以pCAMBIA1304-

*HbWRKY1*质粒DNA为阳性对照,以野生型烟草植株为阴性对照,进行PCR扩增。结果表明,野生型植株基因组没有出现扩增信号,在72株含*HbWRKY1*基因的抗性烟草植株中,有65株的基因组DNA可以扩增出与pCAMBIA1304-*HbWRKY1*质粒扩增产物大小一致的特异条带,阳性率为90.3%(图6),证明这些植株为转*HbWRKY1*基因的烟草植株。由于PCR高敏感性导致的高污染率,其阳性结果并不能完全说明目的基因已转化进入受体中,因此还需要进一步验证。

*HbWRKY1*过量表达对干旱胁迫的响应

利用RT-PCR技术对*HbWRKY1*的表达特性进行分析,结果表明,ABA和PEG6000处理能够诱导*HbWRKY1*基因表达(数据未发表)。ABA作为一种重要的植物激素,在植物对干旱、高盐等胁迫反应

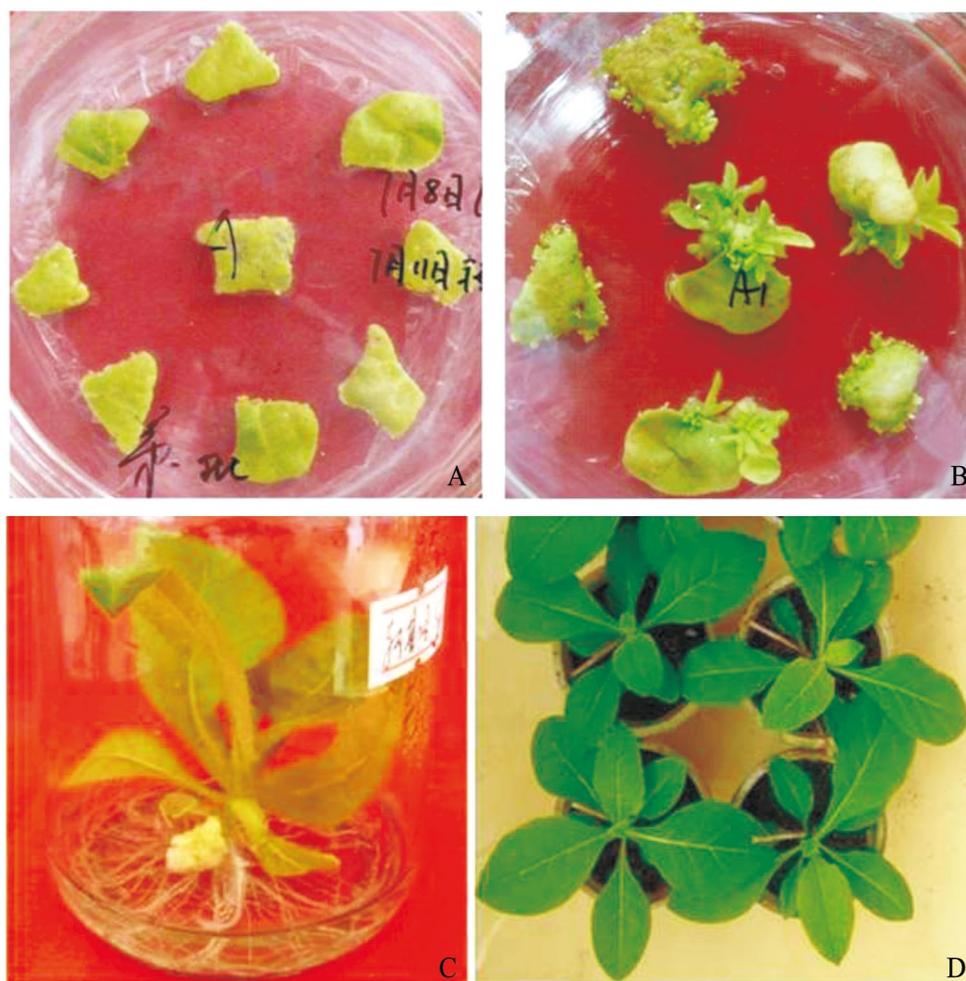


图5 转基因烟草再生植株。A,B: 转基因组织的抗性筛选; C,D: 转化植株培养。

Fig. 5 Transgenic tobacco plantlets. A,B. Hyg-resistant selection of transgenic callus and buds; C,D. Culture of transgenic plantlets.

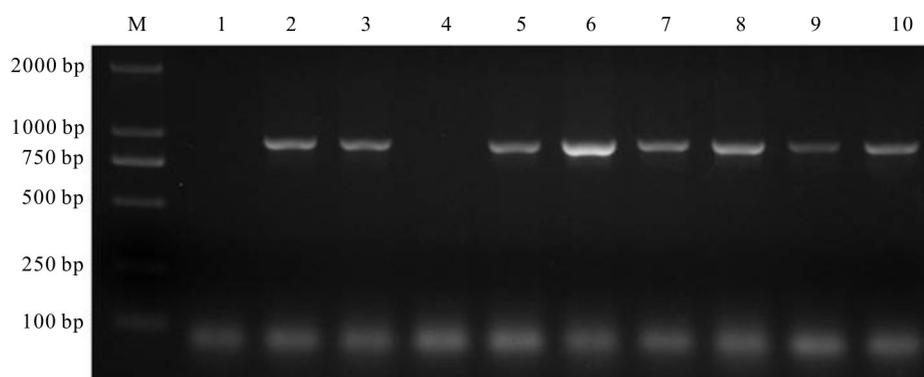


图6 转 *HbWRKY1* 基因烟草植株的 PCR 检测。M. Marker 2000; 1. 阴性对照; 2. 阳性对照; 3~10: 转化植株。

Fig. 6 PCR identification of transgenic *HbWRKY1* tobacco plantlets. M. Marker 2000; 1. Negative control; 2. Positive control; 3-10. Transgenic plants.

中起重要作用。本研究设计了干旱胁迫实验,分析 *HbWRKY1* 过量表达对于干旱胁迫的反应。干旱实验结果表明,干旱处理 15 d 后, *HbWRKY1* 过量表达植株的生长基本正常,而对照植株则大部分萎焉

(图 7a);恢复浇水 20 d 后, *HbWRKY1* 过量表达植株生长更加茁壮,对照植株虽然也恢复了生长,但其长势较弱,且老叶边缘枯黄(图 7b)。这些实验结果表明, *HbWRKY1* 过量表达能够增强烟草对于干旱

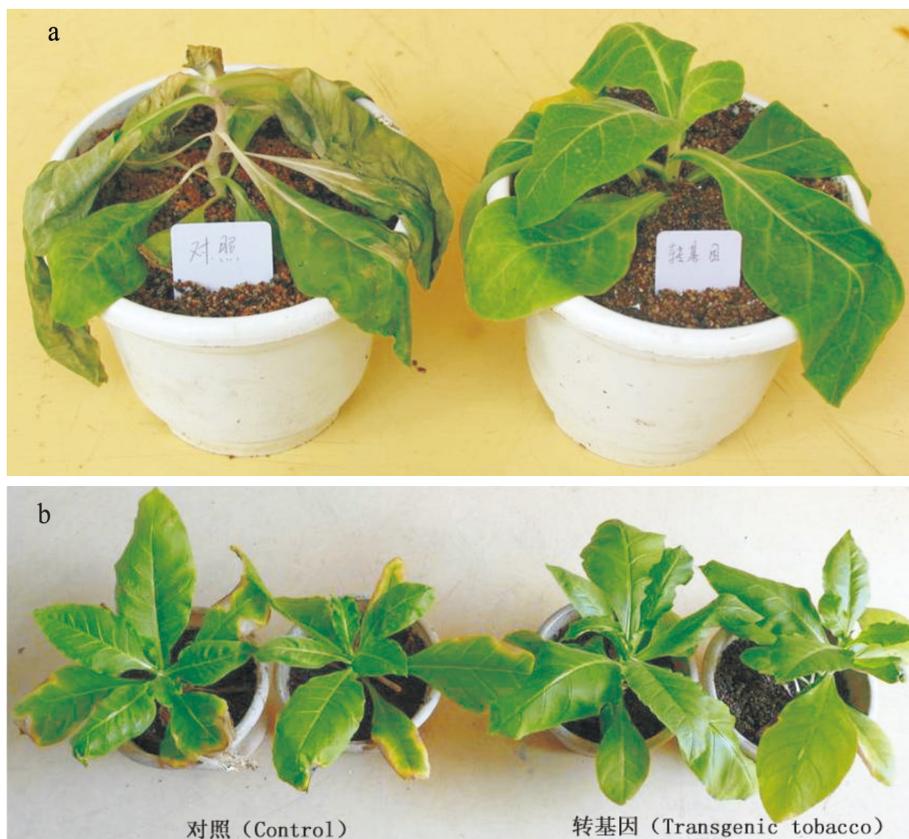


图7 干旱胁迫对 *HbWRKY1* 过表达烟草的影响。a: 干旱处理 15 d; b: 恢复浇水 20 d。

Fig. 7 Effect of drought stress on over-expression of *HbWRKY1* tobacco plants. a. Drought stress for 15 days; b. After re-water 20 days.

胁迫的抗性。

3 讨论

通过 RACE 技术,利用巴西橡胶树 SSH 文库,克隆得到 1 个编码 WRKY 转录因子的基因,该基因编码的氨基酸序列与蓖麻、杨树的相应氨基酸序列具有较高的相似性。同时,该蛋白包含 1 个 WRKY 家族特有的 WRKY 结构域及 1 个 C2H2 类型的锌指结构,这是首次公开报道从热带产胶植物巴西橡胶树中克隆到 WRKY 基因,故将其命名为 *HbWRKY1*。本研究利用农杆菌介导的叶圆盘法将克隆到的 *HbWRKY1* 基因导入烟草,经 PCR 检测表明有 65 株转基因烟草中 *HbWRKY1* 基因已经成功整合到烟草基因组中。还有 7 株为假阳性植株,这可能是外植体在筛选过程中,选择压加得太迟或加得太少,致使未转化细胞能正常分裂分化,或者外植体的某些表层细胞稳定表达外源抗性基因,降低了其周围培养基中的 Kan 浓度,而一些非转化细胞在较低的选择压力下继续分化。另外, T-DNA 进入细胞后并没有整合到受体基因组中,而是以游离

状态存在,这也将导致 PCR 的结果呈阳性。

植物在漫长的进化史中,形成了一套有效的防御系统来抵御各种外界伤害,其中通过乙烯、茉莉酸和水杨酸等信号分子激活植物体内一系列防御基因的表达,从而使植物表现出对生物胁迫的抗性反应是植物应答各种伤害的主要途径之一。WRKY 转录因子基因受各种生物和非生物胁迫诱导,在植物遭受各种胁迫时,WRKY 基因能迅速表达,通过与下游靶基因启动子中的顺式作用元件特异性结合,从而调控基因的转录和表达,最终开启植物自身防御系统进行防卫应答^[3]。本研究利用乙烯利刺激条件下处理与未处理胶乳差异表达构建的 cDNA 消减文库克隆得到 *HbWRKY1* 基因,推测该基因可能参与了橡胶树乙烯信号的传递过程,其表达受乙烯诱导,通过利用乙烯信号转导途径调节自身转录水平,从而对巴西橡胶树防御反应的激活起着重要作用。另外,我们对筛选出的阳性植株进行干旱胁迫处理,结果表明转基因植株与野生型植株相比,表现出较明显的耐旱性,初步说明 *HbWRKY1* 过量表达能够增强烟草对干旱胁迫的抗性,暗示

HbWRKY1 基因可能在橡胶树适应干旱胁迫的过程中扮演至关重要的角色。

目前,对 *WRKY* 转录因子的功能还了解得不很透彻,如对其表达特性进行分析及下游靶基因的筛选与功能鉴定等,还需要进行更加深入的研究。此外,对转基因株系进行深入的生理实验也是必须的,尤其是抗逆、抗病相关的生理实验,这将为橡胶树抗逆机理的研究提供科学依据。

参考文献

- [1] Ishiguro S, Nakamura K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 59 upstream regions of genes coding for sporamin and α -amylase from sweet potato [J]. *Mol Gen Genet*, 1994, 244(6): 563–571.
- [2] Sun C X, Palmqvist S, Olsson H, et al. A novel *WRKY* transcription factor, *SUSIBA2*, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(9): 2076–2092.
- [3] Zhang Z L, Xie Z, Zou X L, et al. A rice *WRKY* gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(4): 1500–1513.
- [4] Qiu D Y, Xiao J, Ding X H, et al. *OsWRKY13* mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2007, 20(4): 492–499.
- [5] Kush A. Isoprenoid biosynthesis: The *Hevea* factory [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1994, 32(8): 761–767.
- [6] Liu K C, Yang Y, Zhao L H, et al. Primary analysis and construction of ethephon-induced latex SSH cDNA library from *Hevea brasiliensis* [J]. *Chin J Trop Crops*, 2007, 28(3): 1–4. (in Chinese)
- 刘宽灿, 杨云, 赵丽红, 等. 乙烯利诱导橡胶树胶乳cDNA消减文库的构建 [J]. *热带作物学报*, 2007, 28(3): 1–4.
- [7] Proietti S, Bertini L, van der Ent S, et al. Cross activity of orthologous *WRKY* transcription factors in wheat and *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(6): 1975–1990.
- [8] Yang B, Jiang Y Q, Rahman M H, et al. Identification and expression analysis of *WRKY* transcription factor genes in canola (*Brassica napus* L.) in response to fungal pathogens and hormone treatments [J/OL]. *BMC Plant Biol*, 2009, 9: 68. doi:10.1186/1471-2229-9-68
- [9] Ülker B, Mukhtar M S, Somssich I E. The *WRKY70* transcription factor of *Arabidopsis* influences both the plant senescence and defense signaling pathways [J]. *Planta*, 2007, 226(1): 125–137.
- [10] Zhang Z L, Yang Y, Liu K C, et al. A rapid and efficient protocol for total RNA isolation from latex of *Hevea brasiliensis* [J]. *Chin Bull Bot*, 2007, 24(4): 516–520.
张治礼, 杨云, 刘宽灿, 等. 一种快速、高效的橡胶树胶乳总RNA提取方法 [J]. *植物学通报*, 2007, 24(4): 516–520.
- [11] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA miniprep: Version II [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1983, 1(4): 19–21.
- [12] Pich U, Schubert I. Miniprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenolics [J]. *Nucl Acid Res*, 1993, 1(14): 3328–3332.
- [13] Pandey S P, Somssich I E. The role of *WRKY* transcription factors in plant immunity [J]. *Plant Physiol*, 2009, 150(4): 1648–1655.