

小麦转录因子 *TaWRKY74-c* 和 *TaWRKY74-d* 基因的克隆及基于生物信息学的功能分析

丁 博¹, 王俊斌², 李 明¹, 任宇鹏¹, 郭瑶琳¹, 黄国中¹, 傅 扬¹, 刘慧芬¹, 谢晓东¹

(¹天津农学院农学系, 天津 300384; ²天津农学院基础科学系, 天津 300384)

摘要: WRKY 基因是近年来研究较为广泛的植物转录因子, 目前许多物种中都克隆出 WRKY 基因。近年来, 小麦中也有 WRKY 基因被克隆, 但是由于对 WRKY 基因生物信息学分析不足, 导致研究带有一定的盲目性。本试验以小麦品种扬麦 158 叶片为材料, 分离了 2 个 WRKY 基因, 分别编码 344 个和 371 个氨基酸, 与 GenBank 数据库中的 *TaWRKY74* 基因高度同源, 命名为 *TaWRKY74-c* 和 *TaWRKY74-d*。蛋白质保守结构域分析表明, 2 个基因都含有 1 个 WRKY 保守结构域, 属于 III 类 WRKY 转录因子家族。定量 PCR 分析表明 *TaWRKY74-c* 和 *TaWRKY74-d* 在小麦的叶片、花和茎中均表达, 且在茎中的表达量最多, 在花中的表达量最少。采用 Genevestigator 转录组分析工具, 对基因在 331 种环境条件(如逆境、病害、激素等刺激)、10 个发育时期(如苗期、孕穗期等)和 21 种组织器官(如根、花、叶等)中的表达进行了分析, 结果表明, 该基因在小麦不同发育时期和组织器官中都有表达, 且在植物遭受低温、病原体侵染等环境因子处理下, 表达量发生显著改变, 预示可能参与到这些生物学过程中。采用 RT-PCR 的方法对上述分析结果进行验证, 结果表明生物学实验与生物信息学预测的结果一致。本研究将大量小麦转录组的数据应用到 WRKY 基因功能分析上, 深化了对小麦 WRKY 基因家族成员功能的认识, 为今后对该基因的表达分析和功能研究提供了重要线索和方向。

关键词: 小麦; *TaWRKY74*; 克隆; 生物信息学; 表达分析; 环境胁迫应答

Cloning and Functional Characterization of Wheat Transcription Factor *TaWRKY74-c* and *TaWRKY74-d* Genes Based on Bioinformatics Analysis

DING Bo¹, WANG Jun-bin², LI Ming¹, REN Yu-peng¹, GUO Yao-lin¹, HUANG Guo-zhong¹,
FU Yang¹, LIU Hui-fen¹, XIE Xiao-dong¹

(¹Department of Agronomy, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384;

²Department of Basic Sciences, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

Abstract: The WRKY genes are broadly investigated in plants and presently many members of this gene family have been identified and characterized. WRKY genes are also isolated from wheat, but functional characterization of these genes is largely restricted for the lack of bioinformatic analysis. In this study, we cloned the *TaWRKY74-c* and *TaWRKY74-d* genes, which shared high similarity with *TaWRKY74* genes in public GenBank database and encoded 344 and 371 amino acids, respectively. These proteins contained highly conserved WRKY domain and belonged to class III of WRKY transcription factors family. Real-time PCR indicated that target gene expressed in flower, leaves, and stem with the highest level in stem and the lowest in flower. Genevestigator tools were used to detect genes expression patterns under 331 environmental stimuli (stresses, diseases, hormones, etc.), 10 developmental stages (seedling stage, booting stage, etc.), and 21 tissues or organs (root, flower, leaf, etc.). Results showed that the gene played important roles throughout plant development stages and especially in plant responses to cold acclimation

收稿日期: 2013-06-28 修回日期: 2013-11-05 网络出版日期: 2014-01-24

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/10.13430/j.cnki.jpgr.2014.02.021.html>

基金项目: 国家“863”计划(2012AA10A309, 2011AA100104); 国家自然科学基金(31240024)

第一作者主要从事作物遗传育种与分子育种工作。E-mail: yuancircle@126.com

通信作者: 谢晓东, 主要从事植物抗逆机理研究。E-mail: xiexiaod@gmail.com

and pathogens, and the expression levels changed a lot. These indicated that *TaWRKY74* might involved in these biological processes. We then carried out RT-PCR to verify these results. The data indicated that the expression patterns of *TaWRKY74* gene under different conditions were highly consistent with bioinformatic predictions. In this study, plenty of wheat transcriptome data were used in WRKY gene functional analysis. These enriched our knowledge in the functions of wheat WRKY gene family and provided crucial clues and information for further clarification of the expression analysis and function studies of these genes.

Key words: wheat; *TaWRKY74*; gene cloning; bioinformatics; expression analysis; responses to environmental stimuli

WRKY 基因首先克隆于甘薯 (*Impoea batatas*)^[1], 随后在约 20 多种植物中证实存在 WRKY 蛋白, 并阐明了相应的分子生物学功能。这些蛋白共同的特征是拥有一个高度保守的 WRKYGQK 核心序列, 称为 WRKY 域, 在高等植物中形成了一个基因超家族 (gene super-family)^[2]。许多植物逆境胁迫诱导基因的表达都在转录水平上受转录因子和顺式作用成分的调控, 因此转录因子也在植物逆境信号传递过程中起着中心调节的作用。

根据 WRKY 结构域的数目和其中锌指基序的特征可将 WRKY 转录因子成员分为 3 类: I 类含有 2 个 WRKY 结构域, II 类与 III 类都只含有 1 个 WRKY 结构域。II 类锌指基序与 I 类相同, 都为 C₂H₂ 型, 而 III 类锌指基序为 C₂HC 型。WRKY 结构域是一个 DNA 结合结构域。该域是一个包含 60 个氨基酸的区域, 是由保守的氨基酸序列 WRKYGQK 在其 N-末端再加上一个锌指基序。其特异性结合的 DNA 序列为 (T) (T) TGAC (C/T), 其中 TGAC 是该序列的核心保守序列, 被称为 W 盒。

WRKY 类转录因子虽然在结构上具有一些共同的特征, 但由于转录因子的结构、顺式作用元件周围的序列及其他辅助作用因子等因素存在差异, 导致其成员在生物活性和作用的目标基因上存在很大的差异, 使得该家族在多种组织中广泛存在, 参与植物损伤^[3-5]、衰老^[6-8]、生长发育^[9]等众多代谢过程的调控。此外, WRKY 转录因子还参与糖、淀粉、碳水化合物等代谢过程。最早克隆的 SPF1 就在蔗糖或多聚半乳糖苷酸诱导贮藏蛋白和淀粉酶基因的表达中起作用^[10]。

大量的研究证明, 植物 WRKY 基因的主要生物学功能包括对生物逆境和非生物逆境的应答反应, 其中主要的生物逆境是调控其抗病反应, 包括对细菌^[11-13]、真菌^[12]、卵菌^[14]、病毒^[15-16]的胁迫响应。WRKY 基因家族在非生物逆境调控网络之中也起着十分重要的作用, 许多 WRKY 基因的表达受干旱、高温、冷害及伤害等逆境因子诱导表达。例如, 参与伤

害诱导表达的烟草 WIZZ 基因^[17]和拟南芥 7 个 WRKY 基因 (*AtWRKY40*、*AtWRKK33*、*AtWRKY53*、*AtWRKY22*、*AtWRKY11*、*AtWRKY15* 和 *AtWRKY60*)^[18]; 参与植物的抗旱性建立的水稻 *OsWRKY45*^[19]、沙漠豆科植物 *Retama raetam* 的 WRKY 基因^[20]、灌丛的 *LtWRKY21*^[21]、大麦 *HvWRKY38* 基因^[22]; 参与植物在冷害中调控的包括水稻 *OsWRKY13*^[23]、大麦 *HvWRKY38* 和灌丛的 *LtWRKY21* 基因。

WRKY 基因在植物体内并非组成型表达。已识别和克隆的 WRKY 基因的表达受各种环境条件 (如病原体、真菌诱导子、防卫信号分子水杨酸及其功能类似物、植物不同发育阶段、干旱、低温、创伤、机械胁迫等) 的诱导^[24]。目前, 已经报道的有关拟南芥和水稻中 WRKY 基因家族的研究已经比较丰富, 但是有关小麦中 WRKY 的研究资料非常有限。H. L. Wu 等^[24]克隆了 *TaWRKY74-a* 和 *TaWRKY74-b* 基因, 发现其可能参与了植物的低温胁迫应答。C. F. Niu 等^[25]研究发现在拟南芥中超量表达 *TaWRKY2* 和 *TaWRKY19*, 可显著提高植物耐受非生物逆境的能力。这些研究表明, 小麦 WRKY 基因在耐受非生物逆境方面发挥重要作用, 但是由于一个基因常参与多个生物学过程, 即一因多效, 因此有必要对基因进行生物信息学分析, 系统筛查基因可能参与的生物学过程, 找寻重要线索, 最后进行实验验证。

本研究通过电子克隆的方法, 运用 RT-PCR, 从小麦中扩增了转录因子 *TaWRKY74* 基因, 用其蛋白质序列搜索 CDD、Prosite 和 Pfam 数据库, 鉴定保守基序序列, 通过 DELTA-BLAST 比对同源基因, CO-BALT 进行多重比对, 采用 Bioedit 软件绘制进化图, 通过 Genevestigator 在线生物信息学工具, 分析其表达模式及可能参与的生物学过程, 为实验鉴定其生物学功能提供关键的线索和方向。同时, 本试验中采用的生物信息学研究策略, 对进行植物基因的表达和功能研究, 有很好的借鉴作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 普通小麦品系扬麦 158 用于基因克隆和不同逆境胁迫下的表达分析。小麦种子播种于营养土中,人工气候室的气候条件为 26 ℃ (16 h)/20 ℃ (8 h) (日夜交替),相对空气湿度为 75%。取处于 3 叶期的幼苗,分别进行低温(3 ℃)培养^[24]、以及脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON, 2 mg/L)和农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 (OD = 0.8) 涂刷处理,处理方法参照 Genevestigator 中 Perturbations 部分的相关研究进行。叶片材料收集后用液氮速冻,并保存于 -80 ℃ 备用。

1.1.2 菌株 *E. coli* DH5 α

1.1.3 主要试剂 植物总 RNA 提取试剂盒(购自 TIANGEN 公司); SuperScript III 反转录酶(购自 Invitrogen 公司);琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒(购自大连宝生物公司);Phusion 超保真 DNA 聚合酶(购自 NEB 公司);pGEM-T Easy 载体(购自 Promega 公司);PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;DNA 测序由北京博迈德科技发展有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 小麦 RNA 的提取、纯化和 cDNA 第一链的合成 使用植物总 RNA 提取试剂盒将经过干旱处理的小麦新鲜叶片提取总 RNA,反转录得到 cDNA,检测反转录产物。小麦 β -actin 引物序列为 β -actin-F: 5'-ACGGCCTGGATGGCGACGTACATG-3'; β -actin-R: 5'-GCAGAAGGACGCCTACGTTGGTGAC-3' (GenBank accession No. X79378)。PCR 扩增程序:94 ℃ 预变性 4 min;95 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,40 个循环,72 ℃ 延伸 30 s,最后 72 ℃ 延伸 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.2.2 *TaWRKY74-c* 和 *TaWRKY74-d* 基因的 PCR 扩增 PCR 扩增引物采用 Primer 5.0 软件进行设计,引物序列为 *TaWRKY74-c*-F: 5'-AGAAGCTCCGAG-CAGAGAGAGATGG-3'; *TaWRKY74-c*-R: 5'-TCAGAC-CTGCACTGAGGAAGAACTG-3'; *TaWRKY74-d*-F: 5'-CGATTTCTCTCTTCCACACACAC-3'; *TaWRKY74-d*-R: 5'-TGGCGTGTCTTCCCTCTCT-3'。以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系为:反转录产物 1.0 μ L, 5 $\times$ phusion HF buffer 4 μ L, 10 mmol/L dNTPs 0.4 μ L, 10 mmol/L 基因特异引物 2.0 μ L, phusion DNA 聚合酶 0.2 μ L, DMSO 0.6 μ L, ddH₂O

补足 20 μ L。PCR 扩增程序:98 ℃ 预变性 1 min; 98 ℃ 变性 20 s,61 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 1 min 40 s,35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,采用琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒纯化回收目的条带。

1.2.3 重组质粒 pGEM-T Easy-74-c 和 pGEM-T Easy-74-d 的获得 将回收片段加 A 与 Promega 公司的 pGEM-T Easy Vector 连接、转化。将鉴定出的阳性克隆进行测序,确定序列正确后将质粒和菌液保存。

1.2.4 半定量 RT-PCR 分析 半定量 RT-PCR 反应以单链反转录产物为模板,总体积为 20 μ L,引物为小麦 WRKY 基因特异引物。PCR 扩增程序为 98 ℃ 预变性 1 min,98 ℃ 变性 1 min,60 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 40 s,35 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。内参为 β -actin 基因。为准确反应出这些基因的表达情况,对每个基因都进行 3 次独立重复实验。

1.2.5 荧光定量 PCR 分析 荧光定量 PCR 采用 ABI 7500 Real Time PCR System,软件系统为 7500 System Software Version (Applied Biosystems, Foster City, CA)。试验试剂为康为世纪公司的 Ultra SYBR Mixture 试剂盒(CW0956),荧光染料为 SYBR GreenI。相对基因表达分析采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} (Livak) 法^[11-12],参照基因为小麦 β -actin 基因。反应程序:95 ℃ 预变性 10 min,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 1 min,40 个循环,熔点曲线程序为:95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 30 s,60 ℃ 15 s。反应体系为:2 $\times$ Ultra SYBR Mixture (With ROX) 10 μ L; 10 μ mol/L Forward Primer 0.4 μ L; 10 μ mol/L Reverse Primer 0.4 μ L; Template DNA(稀释 50 倍)2 μ L; RNase-Free Water 7.2 μ L。

1.2.6 生物信息学分析 本研究使用生物信息学软件 Bioedit 对测序得到的 *TaWRKY74-c* 和 *TaWRKY74-d* 基因编码区核苷酸序列进行组成和特征分析。采用 PredictProtein 数据库 (<http://www.predictprotein.org/>) 对 *TaWRKY74-c* 和 *TaWRKY74-d* 蛋白进行二级结构预测。使用 NCBI 数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 新的比对工具 DELTA-BLAST 进行同源基因的搜索。选取搜索到的来自单子叶植物小麦、水稻、玉米、大麦、葡萄和短柄草的 8 条序列,利用 COBALT 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>) 进行多重比对,利用 Bioedit 软件进行系统进化树构建。在分析目的基因的生物学功能时,采用 Genevestigator 数据库 (<https://genevestiga->

tor.com/gv/plant.jsp) 界面中的 Affymetrix 基因表达芯片数据。该数据库采用严格的算法对不同来源的数据进行归一化,保证了数据的可比性。

2 结果与分析

2.1 小麦 *TaWRKY74-c* 和 *TaWRKY74-d* 基因的克隆

以小麦新鲜叶片为材料,提取总 RNA,经 cDNA 第一链的合成和 PCR 扩增,获得 2 条长度有异的 DNA 片段,将目的片段克隆到 pGEM-T Easy 载体上,获得阳性克隆并测序。*TaWRKY74-c* 基因编码区长度为 1035 bp,编码 344 个氨基酸;*TaWRKY74-d* 基因编码区长度为 1116 bp,编码 371 个氨基酸;蛋白质保守结构域分析表明,2 个基因都含有 1 个 WRKY 保守结构域,依照 WRKY 家族分类标准,

这 2 个基因的锌指基序的序列特征为 C-X₇-C-X₂₃-HXC,属于Ⅲ类 WRKY 转录因子家族。

2.2 小麦 *TaWRKY74* 基因的序列比较

本研究中克隆的 2 个基因彼此同源性很高,相同碱基率达到了 98%,利用 NCBI 的 Blast 软件,搜索到与本研究克隆基因相似度达到 99% 的 *TaWRKY74-a* (EF368359) 和 *TaWRKY74-b* (EF397615) 基因(图 1、图 2),因此推测本研究克隆的基因为 *TaWRKY74-a* 和 *TaWRKY74-b* 的新同源基因,命名为 *TaWRKY74-c* 与 *TaWRKY74-d*。序列分析显示, *TaWRKY74-c* 和 *TaWRKY74-d* 的 cDNA 编码区序列大小分别为 1035 bp、1116 bp。DNA 分子的 G + C 含量分别为 67.54%、65.77%。分子量(双链)分别为 632 kD、681 kD(表 1)。

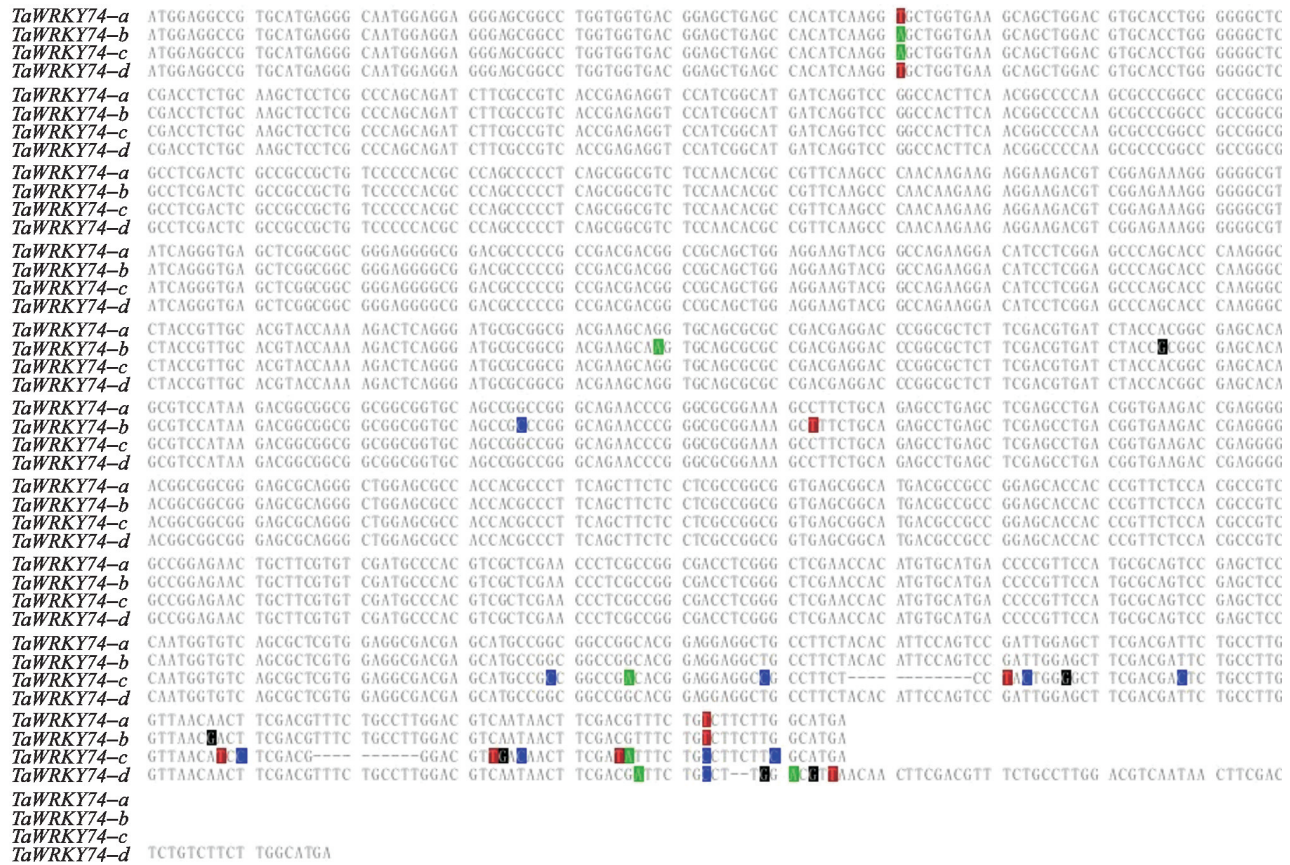


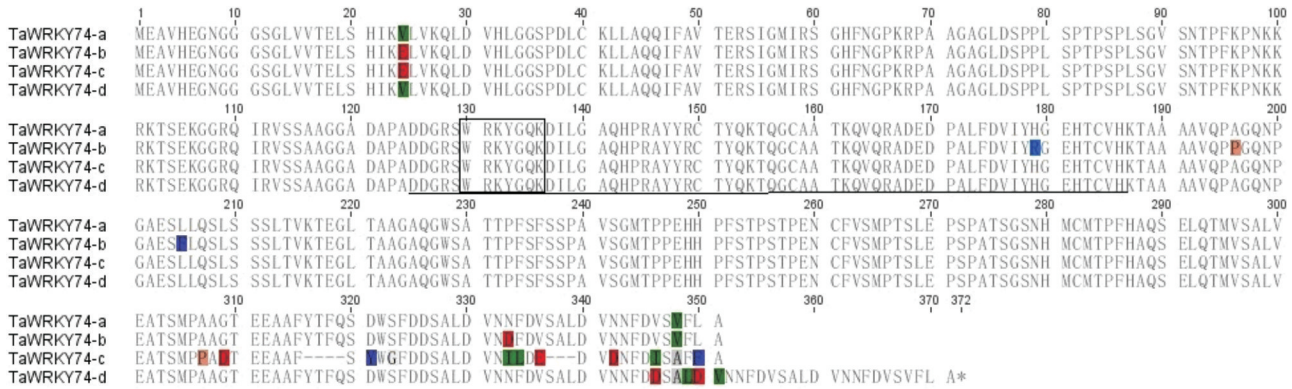
图 1 *TaWRKY74* 基因 DNA 序列比对图

Fig. 1 Alignment of coding sequences of *TaWRKY74* genes

2.3 *TaWRKY74-c* 和 *TaWRKY74-d* 蛋白二级结构分析

以在线 PredictProtein 数据库对蛋白质进行二级结构预测,根据 H(helix,α-螺旋)、E(extended,β-折叠)、L(loop,无规则卷曲或其他)等二级结构的序列

长度在全序列中所占比例不同而定义二级结构类型。二级结构分析表明,*TaWRKY74-c* 蛋白中 α 螺旋占 13.66%,β 折叠占 8.43%,无规卷曲占 77.91%。*TaWRKY74-d* 蛋白中 α 螺旋占 12.67%,β 折叠占 8.36%,无规卷曲占 78.98%。



图中下划线标注为锌指基序结构的序列

The underlined sequence in the figure indicates the zinc-finger motif

图 2 TaWRKY74 蛋白质序列比对图

Fig. 2 Sequence alignments of TaWRKY74 proteins

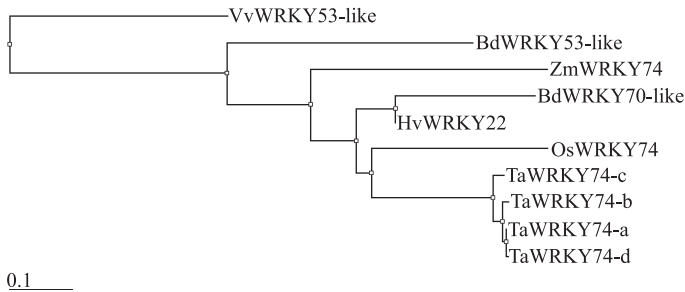
表 1 TaWRKY74-c 与 TaWRKY74-d 序列比较分析

Table 1 Comparison of TaWRKY74-c and TaWRKY74-d sequences		
基因 Gene	TaWRKY74-c	TaWRKY74-d
片段长度(bp) Fragment size	1035	1116
分子量(单链)(D) Molecular weight(single stranded)	317004	341357
分子量(双链)(D) Molecular weight(double stranded)	632298	681444
G + C 含量(%) G + C content	67. 54	65. 77
A + T 含量(%) A + T content	32. 46	34. 23

2. 4 不同物种 WRKY 转录因子的同源分析

通过 DELTA-BLAST 查询,获得 TaWRKY74 基

因的同源基因。本研究只选取其中比对得分大于 140 且已经证实并明确给出相应基因命名的小麦 (*Triticum aestivum*)、大麦 (*Hordeum vulgare*)、二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*)、水稻 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 等植物的 7 条序列,通过 COBALT 多重比对,采用 Bioedit 软件将比对结果绘制成分子系统发育树(图 3)。结果表明,TaWRKY74-c 和 TaWRKY74-d 与水稻、大麦、短柄草、葡萄和玉米中 WRKY 转录因子序列同源性较高。TaWRKY74-d 与同一进化分支的 TaWRKY74-a 高度同源。TaWRKY74 的 4 个同源等位基因与水稻 OsWRKY74 的同源性较高。



GenBank accession number: ABN43180. 1 (TaWRKY74-a), ABO15544. 1 (TaWRKY74-b), XP_003576431. 1 (BdWRKY70-like), DAA05139. 1 (OsWRKY74), ABI13388. 1 (HvWRKY22), DAA61079. 1 (ZmWRKY74), XP_003574419. 1 (BdWRKY53-like), XP_002267793. 2 (VvWRKY53-like)

图 3 TaWRKY74 蛋白的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of TaWRKY74 proteins from various species

2. 5 TaWRKY74 基因的表达与功能分析

将本研究中 4 个 TaWRKY74 基因的编码区分别在 PLEXdb Blast 中进行比对,得出相同的等位基因探针,编号为 Ta. 16082. 1. A1_at (分值 96. 5%)。将此探针编号作为查询项,放入 Genevestigator 基因表

达芯片数据库中,分别采用 Development tool、Anatomy tool 和 Perturbation tool 搜索小麦基因组阵列信号结果(表 2)。该网站可以提供特定探针在不同环境条件、发育时期、组织器官下的基因表达情况。结果表明,Ta. 16082. 1. A1_at 探针在

小麦生长发育的各个时期表达量较为均衡,基本处于中等水平。

Perturbation 搜索是针对高达数千种不同的条件(如逆境、病害、激素等)进行概要,应用 *P* 值或表达倍数找到最相关的条件。表达量是在各个试验中与对照比值的对数值。选择表达倍数差异绝对值大于等于 4 且 *P* 值小于等于 0.05 的试验数据。该探针

在不同的生物和非生物逆境处理中显示表达量变化最为显著的是在低温和病原体侵染上,表达量出现显著变化(表 2)。在小麦癭蚊幼虫滋生的叶鞘上表达量升至 4.04 倍;在小麦黄斑叶枯病菌毒素 B 处理时,该探针表达量显著升高,达到 5.39 倍。在低温处理时,表达量明显降低,处理 14 d 时最低可降至 -18.36 倍。

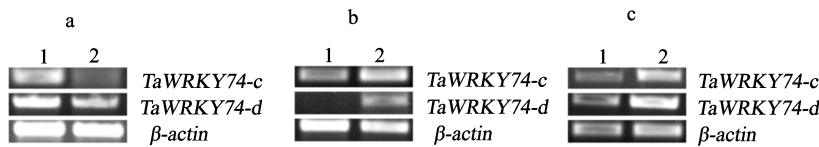
表 2 不同处理的小麦基因组阵列信号强度分析

Table 2 Signal strength analysis of arrays in wheat genome under different conditions

分类	处理	时间	植物组织	小麦品种	log ₂ 比值	表达量改变倍数	<i>P</i> 值
Classification	Stress	Time	Tissue	Wheat cultivar	log ₂ -value	Fold-change of expression level	<i>P</i> -value
生物逆境	小麦癭蚊幼虫滋生	6 h	叶鞘	Molly	2.07	4.04	0.002
Abiotic stress	(10/25 的卵孵化幼虫后)						
激发	小麦黄斑叶枯病菌毒素 B	24 h	叶片	Katepwa	2.50	5.39	0.002
Excitation	(<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> toxin B)						
非生物逆境	6 ℃	14 d	冠、苗端	Spring Manitou	-2.16	-4.83	0.010
Biotic stress		14 d		Winter Norstar	-3.68	-18.36	0.012
		21 d		Winter Norstar	-2.95	-10.74	0.028
		35 d		Spring Manitou	-2.55	-6.33	0.006
		35 d		Winter Norstar	-3.16	-11.77	0.029
		42 d		Winter Norstar	-2.73	-9.48	0.032
		56 d		Spring Manitou	-1.91	-4.12	0.012

根据生物信息学分析结果,研究了 *TaWRKY74* 基因对不同逆境因子响应的表达模式包括在低温(3 ℃)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇溶液(2 mg/L)、根瘤农杆菌株 EHA105 处理后的表达数据(图 4)。在低

温下 *TaWRKY74* 的表达量下调,在脱氧雪腐镰刀菌烯醇溶液和根瘤农杆菌菌株 EHA105 处理后的表达量上调,与生物信息学分析结果一致。



a:低温(3 ℃)处理,1、2 泳道依次代表 0 h、24 h b:脱氧雪腐镰刀菌烯醇溶液(2 mg/L)处理,1、2 泳道依次代表 0 h、6 h
c:根瘤农杆菌株 EHA105 处理,1、2 泳道依次代表 0 h、24 h

a: Cold stress(3 ℃), 1 and 2 lanes refer to 0 and 24 hours treatments, respectively
b: Deoxynivalenol solution(2 mg/L), 1 and 2 lanes refer to 0 and 6 hours treatments, respectively
c: *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105, 1 and 2 lanes refer to 0 and 24 hours treatments, respectively

图 4 *TaWRKY74* 基因对 3 种逆境胁迫因子的响应

Fig. 4 Expression of *TaWRKY74* in responses to different environmental stresses

定量分析显示(图 5), *TaWRKY74-c* 和 *TaWRKY74-d* 在小麦的叶片、花和茎中均表达,且在茎中的表达量最多,在花中的表达量最少。生物信息学分析 Ta.16082.1.A1_at 探针在小麦各个时期表达量较为均衡,信号强度基本处于中等水平,在小麦叶片中的信

号强度也是处于中等水平。

3 讨论

生物信息学是以计算机及互联网为主要工具,通过开发各种程序,对大量核酸和蛋白质序列等分

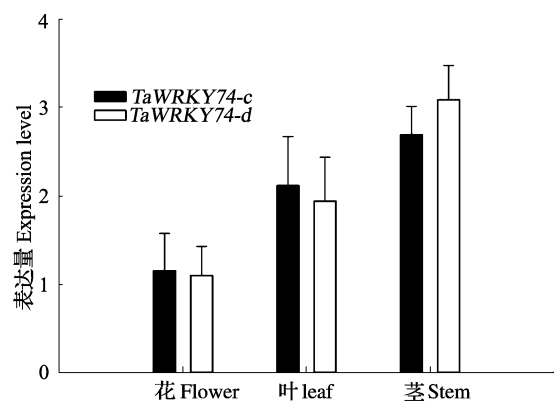


图 5 *TaWRKY74* 基因在小麦不同组织中的表达量
Fig. 5 Expression levels of *TaWRKY74* in different wheat tissues

子生物学数据进行收集、储存、整理、分析和可视化,进而揭示生物学规律的学科。作为一门新的学科领域,把核酸和蛋白质序列信息分析作为源头,进行序列比对、蛋白质空间结构模拟和预测,如各种亚细胞的定位信号、翻译后的修饰位点、功能域等,此外对蛋白质的理化性质包括等电点、分子质量、半衰期、疏水性、稳定性等的分析,以及其空间结构的预测,有助于采取合理的克隆和表达策略,选用适合的表达载体,获得有活性的重组蛋白,是研究蛋白质功能的基础,依据特定蛋白质的功能进行必要的设计,避免实验的盲目性^[26-31]。大量研究针对基因启动子分析,都提出了相关基因的功能预测。通过对辣椒 *CaWRKY5* 启动子诱导活性的分析,发现该基因可能参与了植物的生物逆境胁迫反应^[32]。在分析水稻 WRKY 基因家族的同时也对该家族基因的启动子进行了生物信息学的相关分析,发现水稻 *OsWRKY19* 基因的启动子含有最多的 W 盒^[33]。在 *BcWRKY1* 启动子序列中除了一般启动子序列中常见的 TATA-BOX、CAAT-BOX 等元件以外,分布着许多与干旱诱导表达相关的元件^[34]。

WRKY 基因家族各成员基因参与并调控植物生长发育、形态建成、代谢调控和抗逆信号转导途径。随着对小麦中 WRKY 基因的研究开展,具有不同生物学功能的 WRKY 基因会逐渐被分离和鉴定。H. L. Wu 等^[24]克隆了 15 个小麦 WRKY 基因,并对基因的功能进行了初步鉴定,与本研究结果一致。C. F. Niu 等^[25]研究的小麦 *TaWRKY2* 和 *TaWRKY19* 转录因子参与到植物干旱和盐胁迫的过程中。X. L. Zhu 等^[35]报道了 *TaWRKY7*、*TaWRKY20*、*TaWRKY12* 和 *TaWRKY34* 在盐胁迫时表达量明显上升。本实验

室的研究结果表明,*TaWRKY10-1* 负调控植物盐胁迫和渗透胁迫反应^[36]。本研究中对 *TaWRKY74* 基因的生物信息学分析和试验结果均表明,该基因在植物应答低温、病原体侵染等方面可能发挥重要作用。

本研究克隆的 *TaWRKY74-c* 和 *TaWRKY74-d* 基因,均属于第Ⅲ类 WRKY 基因。第Ⅲ类基因形成在单子叶植物与双子叶植物分化之后,是一类在进化上较新的 WRKY 基因^[37]。本研究中通过进化树分析方法,找到了该基因在其他多个单子叶植物的 WRKY 同源基因。由于相似的序列蛋白质可能有相似的生物学功能,因而可以由同源基因的功能对所研究基因的功能进行预测。但本研究中,与 *TaWRKY74* 同源性较高的其他物种的基因研究资料匮乏,因此没有获得有价值的同源基因的功能数据。

本研究克隆了小麦 *TaWRKY74* 的新同源基因,并采用最新的生物信息学工具,分析了基因在多种环境条件、发育时期和组织器官下的表达模式,对基因的生物学功能进行了全面的预测,充分显示生物信息学的强大功能。对于小麦等缺少基因组序列数据和转基因效率较低的物种,相关的研究方法可充分解析所研究基因或其同源基因的生物学数据,为今后的生物学实验提供线索和方向,大大提高基因功能鉴定的准确性和针对性。

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 52 upstream regions of genes coding for sporamin and β amylase from sweet potato [J]. Mol Gen Genet, 1994, 244 (6) : 563-571

[2] Wuk L, Guoz J, Wangh H, et al. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins [J]. DNA Res, 2005, 12 (1) : 9-26

[3] Seo S, Sano H, Ohash I Y. Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen activated protein kinase [J]. Plant Cell, 1999, 11 (2) : 289-298

[4] Robatzek S, Somssichi E. A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, *AtWRKY6*, is associated with both senescence and defense related processes [J]. Plant J, 2001, 28 (2) : 123-133

[5] Skibbe M, Qu N, Galis I, et al. Induced plant defenses in the natural environment: *Nicotiana attenuate* WRKY3 and WRKY6 coordinate responses to herbivory [J]. Plant Cell, 2008, 20 (7) : 1984-2000

[6] Robatzek S, Somssichi E. Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense [J]. Gene Dev, 2002, 16 (9) : 1139-1149

[7] Guo Y, Cai Z, Gan S. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence [J]. Plant Cell Environ, 2004, 27 : 521-549

[8] Kimd J, Smiths M, Leaver C J. A cDNA encoding a putative SPF1 type DNA binding protein from cucumber [J]. Gene, 1997, 185 (2) : 265-269

[9] Pnueli L, Hallakherr E, Rozenberg M, et al. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought toler-

- ance in the desert legume *Retama raetam* [J]. Plant J, 2002, 31 (3): 319-330
- [10] Zhang L, Xie Z, Zou X, 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
- [11] Du L, Chen Z X. Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen-and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2000, 24: 837-847
- [12] Chen C H, Chen Z X. Isolation and characterization of two pathogen-and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA binding proteins from tobacco [J]. Plant Mol Biol, 2000, 42: 387-396
- [13] Deslandes L, Olivier J, Theuillères F, et al. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 2404-2409
- [14] Beyer K, Binder A, Boller T, et al. Identification of potato genes induced during colonization by *Phytophthora infestans* [J]. Mol Plant Pathol, 2001, 2: 125-134
- [15] Wang Z, Yang P, Fan B, et al. An oligo selection procedure for identification of sequence-specific DNA-binding activities associated with the plant defence response [J]. Plant J, 1998, 16: 515-522
- [16] Yang P, Chen C, Wang Z, et al. A pathogen-and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter [J]. Plant J, 1999, 18: 141-149
- [17] Hara K, Yagi M, Kusano T, et al. Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding [J]. Mol Gen Genet, 2000, 263: 30-37
- [18] Dong J, Chen C, Chen Z. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response [J]. Plant Mol Biol, 2002, 51: 21-37
- [19] Qiu Y P, Yu D Q. Over-expression of the stress-induced *OsWRKY45* enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. Environ Exp Bot, 2009, 65: 35-47
- [20] Peneli L, Hallak-Herr E, Rozenberg M, et al. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam* [J]. Plant J, 2002, 31: 319-330
- [21] Zou X L, Shen Q J X, Neuman D. An ABA inducible WRKY gene integrates responses of creosote bush *Larrea tridentata* to elevated CO₂ and abiotic stresses [J]. Plant Sci, 2007, 172: 997-1004
- [22] Xie Z, Zhang Z L, Hanzlik S, et al. Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene [J]. Plant Mol Biol, 2007, 64: 293-303
- [23] Qiu D Y, Xiao J, Xie W B, et al. Rice gene network inferred from expression profiling of plants overexpressing *OsWRKY13*, a positive regulator of disease resistance [J]. Mol Plant, 2008: 1538-1551
- [24] Wu H L, Ni Z F, Yao Y Y, et al. Cloning and expression profiles of 15 genes encoding WRKY transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Nat Sci, 2008, 18: 697-705
- [25] Niu C F, Wei W, Zhou Q Y, et al. Wheat WRKY genes *TaWRKY2* and *TaWRKY19* regulate abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. Plant Cell Environ, 2012, 35 (6): 1156-1170
- [26] 殷志祥. 蛋白质结构预测方法的研究进展 [J]. 计算机工程与应用, 2004, 40(20): 54-57
- [27] Baker D. Protein structure prediction and structural genomics [J]. Science, 2001, 294: 93-96
- [28] Pearson W R. Searching protein sequence libraries; comparison of the sensitivity and selectivity of the Smith-Waterman and FASTA algorithms [J]. Genomics, 1991, 11: 635-650
- [29] Pazos F, Stemberg J. Automated prediction of protein function and detection of functional sites from structure [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 14754-14759
- [30] Siew N, Fischer D. Convergent evolutions of protein structure prediction and computer chess tournaments: CASP, Kasparov and CAFASP [J]. IBM Syst J, 2001, 40: 410-425
- [31] Benson D A, Karsch-mizrachi I, Lipman D J, et al. GenBank [J]. Nucl Acids Res, 2003, 31(1): 23-27
- [32] 刘志钦, 杨晟, 蔡金森, 等. 辣椒 *CaWRKY5* 启动子的分离及其调控元件分析 [J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(3): 389-394
- [33] Wu K L, Guo Z J, Wang H H, et al. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins [J]. DNA Res, 2005, 12: 9-26
- [34] 赵锋, 胡鸾雷, 祝建波, 等. 厚叶悬菟苣苔 *BcWRKY1* 基因启动子克隆及功能元件分析 [J]. 生物技术通报, 2007(2): 128-131
- [35] Zhu X L, Liu S W, Meng C, et al. WRKY transcription factors in wheat and their induction by biotic and abiotic stress [J]. Plant Mol Biol Rep, 2013, 31(5): 1053-1067
- [36] Li M, Ding B, Wang J B, et al. Wheat *TaWRKY10-1* is involved in biological responses to the salinity and osmotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. Aust J Crop Sci, 2013, 7(6): 723-729
- [37] 张颖, 蒋卫杰, 凌键, 等. WRKY 转录因子表达谱的研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(4): 803-808