

五个 WRKY 转录因子在水稻叶片生长和抗病反应中的表达研究*

徐文静^{1)**} 缪刘杨^{1)**} 李莉云^{1)***} 刘 钊¹⁾ 刘雨萌¹⁾

江光怀²⁾ 杨凤环³⁾ 何晨阳³⁾ 刘国振^{1)***}

(¹⁾ 河北农业大学生命科学学院, 保定 071000; (²⁾ 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101;

(³⁾ 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

摘要 WRKY 是植物基因组中最大的转录因子家族之一, 它们在抗病及其他信号转导途径中发挥着重要的调控作用. 为了解水稻 WRKY 的功能, 我们选择了 5 个 WRKY 转录因子, 用免疫印迹技术调查了它们在水稻叶片生长和在 *Xa21* 介导的白叶枯病抗性反应中的表达丰度变化. 结果表明, *OsWRKY13*、23 和 71 在叶片中表达, 且随叶片生长而逐步增加, 至成熟期略有下降, 但在叶片中检测不到 *OsWRKY45* 和 *OsWRKY53* 的表达信号. 在 *Xa21* 介导的白叶枯病抗性反应中, *OsWRKY45*、53 和 71 均受诱导表达, 而 *OsWRKY13* 和 *OsWRKY23* 蛋白质的表达没有可见的变化. 进一步比较 *OsWRKY45*、*OsWRKY53* 和 *OsWRKY71* 在抗、感和对照(Mock)反应中的表达, 发现它们在抗、感反应中均发生相似变化. 上述结果说明, *OsWRKY13* 和 *OsWRKY23* 可能在叶片正常生长过程中发挥作用, *OsWRKY45* 和 *OsWRKY53* 可能在水稻-白叶枯病菌互作过程中发挥作用, 而 *OsWRKY71* 在二种条件下均有功能.

关键词 WRKY, 水稻, *Xa21*, 白叶枯病菌, 转录因子

学科分类号 Q945.8, S511, Q51, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00279

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上一半以上人口的主粮, 病害是影响水稻产量的主要因素, 白叶枯病是危害水稻最为严重的细菌性病害. 目前已克隆了 *Xa21*^[1]、*Xa1*^[2]、*Xa26*^[3]、*xa5*^[4]、*Xa27*^[5]和 *Xa13*^[6]等 6 个白叶枯病抗性基因. *Xa21* 是最早克隆的水稻白叶枯病抗性基因, 它编码类受体激酶蛋白质, 由 3 个典型的结构域组成, 即富含亮氨酸的区域(LRR 区)、跨膜区和激酶区, 并具有广谱抗性^[1]. 十几年来, 已经鉴定了多个 *Xa21* 抗病途径相关元件, 如编码 E3 泛素连接酶的 XB3^[7]、编码 WRKY 转录因子的 XB10^[8]、编码 PP2C 磷酸酶的 XB15^[9]、编码 ATPase 的 XB24^[10]和内质网伴侣蛋白 Bip3^[11]等, 这些元件的鉴定增进了对 *Xa21* 介导的抗病机理的了解, 但它们大多是 *Xa21* 抗病途径的负调控因子, 且改变其表达对 *Xa21* 介导的抗病性影响并不大, 所以进一步鉴定 *Xa21* 抗病途径元件仍然是十分重要的工作.

WRKY 是植物中最大的转录因子家族之一, 由于其 DNA 结合域含有高度保守的 WRKYGQK 七肽, 故被称为 WRKY^[12]. 据报道, WRKY 转录因子广泛参与生物或非生物胁迫的应答^[13]、信号分子的传递^[14-15]、衰老和器官发育^[16]等生理活动. 利用水稻全基因组芯片, 发现 *OsWRKY13* 的活化表达影响了 500 多个基因的转录, 涉及抗病、氧化还原平衡(redox homeostasis)、生物胁迫响应和生长发育等过程^[17]. *OsWRKY23* 在水稻根和衰老叶片中都可检测到转录表达^[18]. *OsWRKY51* 和 *OsWRKY71* 在胚和糊粉层细胞中表达, 并参与赤霉素(GA)的

* 国家自然科学基金资助项目(31171528).

** 共同第一作者

*** 通讯联系人. Tel: 0312-7528787

李莉云. E-mail: liliyun@hebau.edu.cn

刘国振. E-mail: gzhliu@genomics.org.cn

收稿日期: 2012-06-11, 接受日期: 2012-08-20

信号传导^[19]. 超表达 *OsWRKY89* 的转基因植株生长缓慢、节间长度变短且叶表的蜡质层增厚^[20]. 在白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, *Xoo*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)或纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn) 侵染水稻后, 发现 *OsWRKY23*^[18]、*OsWRKY45*^[21]、*OsWRKY53*^[22]、*OsWRKY55*^[23] 和 *OsWRKY82*^[24] 的转录水平增加, 另外发现 *OsWRKY62* 是水稻白叶枯病抗性的负调控因子^[8]. *OsWRKY03*^[25]、*OsWRKY13*^[26]、*OsWRKY23*^[18]、*OsWRKY53*^[27] 和 *OsWRKY82*^[24] 则受水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)、茉莉酸甲酯(methyljasmonate, MeJA)或苯并噻二唑(benzothiadiazole, BTH)的诱导上调. 在敲除和超表达 *OsWRKY45* 后, 水稻对稻瘟病和白叶枯病的抗性增强, 但减弱了对纹枯病的抗性^[28]; 超表达 *OsWRKY71* 的转基因水稻对白叶枯病的抗性增加^[29]; 超表达 *OsWRKY53*^[22] 和 *OsWRKY80*^[30-31] 的转基因植株对稻瘟病表现抗性.

为了探究 WRKY 蛋白在水稻正常生长和 *Xa21* 介导的白叶枯病抗性反应中的表达, 进而了解 WRKY 转录因子的功能和 *Xa21* 介导的抗病机理, 本研究选取了 5 个水稻 WRKY 转录因子, 制备了特异性抗体, 用免疫印迹(Western blotting, WB)分析了它们在叶片生长过程和 *Xa21* 介导的白叶枯病抗性反应中的表达丰度, 并进一步比较了在抗、感和对照(Mock)反应中的表达, 发现了 WRKY 与水稻白叶枯病抗性相关的蛋白质表达水平的证据.

1 材料与方法

1.1 水稻材料

叶片材料取自水稻品种 9311 幼苗期地上部(株高为 1、2、5、10 和 15 cm)和大田生长的分蘖期、孕穗期、开花期和成熟期的叶片. TP309 是不含 *Xa21* 基因的粳稻品种, 对白叶枯病菌 *Philippine Race 6* (PR6) 的野生型菌株(PXO99)表现亲和反应(S), 4021 是将 *Xa21* 基因转入 TP309 而获得的纯合株系^[7], 对白叶枯病菌 PXO99 表现抗病(R)^[32].

1.2 接种

白叶枯病菌菌株 PXO99 由中国科学院遗传与发育研究所朱立煌研究员提供, Δ raxST 质粒 DNA 由美国加州大学戴维斯分校 Ronald 教授提供, 将该质粒转化 PXO99 菌株后获得了 PXO99 Δ raxST 菌株, 该菌株表现为 *avr* 缺失的表型^[33]. 白叶枯病菌在 PSA 培养基中(0.5% 细菌蛋白胨, 2% 蔗糖,

0.05% 左旋谷氨酸) 30℃ 培养 48~72 h 后, 用水稀释至 10⁹ 个 /ml, 用灭菌剪刀蘸取菌液剪切叶片进行接种, 以灭菌蒸馏水作为对照(mock). 接种后分别于 0 h、2 h、8 h、1 天、2 天、3 天、5 天、7 天和 10 天采集接种部位叶片(约 1 cm), 液氮速冻后于 -70℃ 冰箱保存.

1.3 多克隆抗体制备

目标蛋白质序列来自水稻基因组数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu>). 利用 BEPITOPE 软件^[34] 预测抗原决定簇, 选择峰值较高的片段, 面向水稻全蛋白质组进行设计后用 BLASTP 软件对水稻蛋白质库(http://rice.plantbiology.msu.edu/analyses_search_blast.shtml)进行唯一性检测, 确定目标多肽片段. 以合成多肽作为免疫原, 多克隆抗体的制备由北京华大蛋白质研发中心有限公司完成.

1.4 斑点杂交 (dot blot)

双蒸水溶解多肽, 用 10 μ l 点样枪将溶解的多肽点在 NC 膜(1 cm $\times$ 5 cm)上, 点样体积为 2 μ l, 同时点 BSA 作为对照. 37℃ 干燥后, 用含 5% BSA 的 TBS-T(20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) 室温封闭 1 h, 然后分别将 NC 膜与 WRKY 抗体(1:1 000 稀释)孵育 30 min, 用 TBS-T 溶液漂洗 3 次(3 $\times$ 5 min), 用辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗孵育 30 min, 用 TBS-T 溶液漂洗 3 次(3 $\times$ 5 min), 再用 TBS 洗 1 次(5 min), 加入 ECL 显色试剂, 用保鲜膜包好后在暗室中用 X 光片检测.

1.5 水稻蛋白质提取

将 -70℃ 冻存的水稻叶片在液氮中充分研磨, 加入蛋白质提取液(62.5 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 10% 甘油, 0.1% SDS, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 5% β - 巯基乙醇), 混匀冰上放置 10 min, 然后 12 000 r/min 4℃ 离心 20 min, 取上清即为总蛋白质.

1.6 免疫印迹 (WB) 分析和信号采集

WB 分析方法参见本实验室以前的报道^[35], 实验至少重复 3 次, 使用 HSP 蛋白进行检测作为等量加样的内参^[36]. 用 Gel-pro analyzer 软件扫描 X 光片上的 WB 条带信号, 计算 3 次 WB 信号的平均值及方差, 比较其信号的相对强度.

1.7 WRKY 编码基因的转录分析

从水稻 MPSS (massively parallel signature sequencing) 网站(<http://mpss.udel.edu/rice/>)^[37] 下载数据, 统计目标基因的转录信息, 按每千万条 MPSS

标签的基因转录次数绘制柱形图。

2 结果与分析

2.1 目标 WRKY 基因的选择

本研究选取了 5 个有报道与水稻抗病相关的 WRKY 基因, 即超表达可提高水稻白叶枯病和稻

瘟病抗性的 *OsWRKY13*^[26]和 *OsWRKY45*^[28]、超表达后提高水稻对白叶枯病抗性的 *OsWRKY71*^[29]、超表达后提高水稻稻瘟病抗性的 *OsWRKY53*^[22]和稻瘟病菌处理后可被诱导表达的 *OsWRKY23*^[18]。具体 WRKY 基因的座位号、所属类别、分子质量和多肽免疫原序列列于表 1。

Table 1 List of WRKY proteins and related information

Gene name	Locus No.	Group	M/ku	Peptide sequence
<i>WRKY13</i>	Os01g54600	II	34	ENESSASAELEVP
<i>WRKY23</i>	Os01g53260	II	27	AGNKEKQVMAKG
<i>WRKY45</i>	Os05g25770	III	34	SSDQEEVLSSLTPG
<i>WRKY53</i>	Os05g27730	I a	51	AATPENSSVTFGDD
<i>WRKY71</i>	Os02g08440	II	37	VEEDFFHQQLKKDP

2.2 抗体制备与特异性鉴定

为了保证抗体的特异性, 用 BEPITOPE 软件预测靶蛋白的抗原决定簇, 具体序列见表 1。为了检验这些多肽在水稻全基因组序列中的唯一性, 又采用 BLASTP 软件对水稻蛋白质库 (http://rice.plantbiology.msu.edu/analyses_search_blast.shtml) 进行分析, 结果表明, 表 1 中多肽序列均是靶蛋白特异的(数据未附)。为了进一步鉴定抗体的特异性, 将多肽点在 NC 膜上, 用 WRKY 抗体进行 Dot blot 检测, 由图 1 可见, 所制备的抗体仅特异识别相应的多肽, 与其他多肽间没有交叉反应。

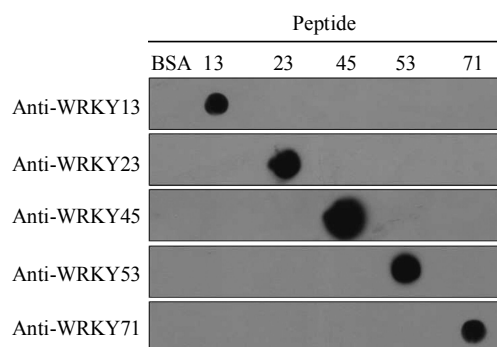


Fig. 1 Validation of antibody specificity by dot blot

Peptides were dissolved in ddH₂O, spot 2 μ l of peptides samples onto the NC membrane at the specified position. Incubate with antiserum as indicated at the left each panel (1 : 1 000 dilution) in BSA/TBS-T for 30 min at RT. Incubate with ECL reagent for 1 min and detected by image station. BSA was used as negative control and the peptides used for detection are indicated at the top.

2.3 WRKY 蛋白在水稻叶片生长过程中的表达分析

取水稻苗期(1、2、5、10 和 15 cm)地上部和分蘖期、孕穗期、开花期和成熟期展开叶片, 提取总蛋白质, 用 WRKY 蛋白特异的抗体进行 WB 检测, 结果如图 2 所示。OsWRKY13、OsWRKY23 和 OsWRKY71 的 WB 结果均呈现出单一条带或清晰的主带, 其表达丰度特征主要表现为在苗期较低, 随叶片的生长 WRKY 蛋白质的丰度也逐步增多, 一般在生长盛期最高, 在成熟期叶片中略有下降。OsWRKY13 有 3 条明显的条带, 表观分子质量分别为 60、40 和 30 ku 左右, OsWRKY23 有 2 个条带, 分子质量分别为 60 和 50 ku 左右, OsWRKY71 的条带约为 60 ku。这些蛋白质均有高于理论值的条带出现, 出现这种现象的原因可能是由于水稻体内的蛋白质以修饰或聚合体的形式存在。在叶片生长各时期均未检测到 OsWRKY45 和 OsWRKY53 蛋白的表达(数据未附)。

2.4 WRKY 基因在水稻叶片中的转录

从水稻 MPSS 网站下载苗期叶片和分蘖期叶片的数据, 按每千万条标签中含 WRKY 基因的数目作图, 进行基因转录相对强度的比较(图 3)。从图 3 中可以看出, 在苗期和分蘖期叶片中, *OsWRKY53* 和 *OsWRKY71* 的相对转录水平较高, *OsWRKY13*、*OsWRKY23* 和 *OsWRKY45* 的转录水平较低或检测不到。比较两个时期的转录水平, 均为苗期的转录低于分蘖期, 即随着叶片的生长其 WRKY 的转录水平也有所提高, 这种模式与上述叶片中的蛋白质表达逐步上升比较符合。

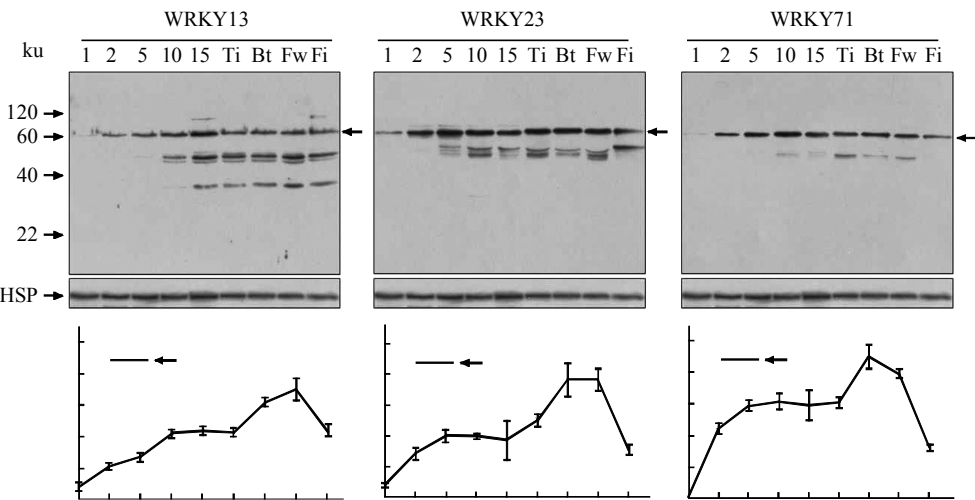


Fig. 2 The expression profiling of the WRKY proteins at different developmental stages of rice leaves
Total proteins were isolated from rice leaves at different developmental stages. 1, 2, 5, 10, 15 are from shoots at seedling stage of 1, 2, 5, 10 and 15 cm, respectively. Ti is leaves at tillering stage, Bt is leaves at booting stage, Fw is leaves at flowering stage, Fi is leaves at filling stage.

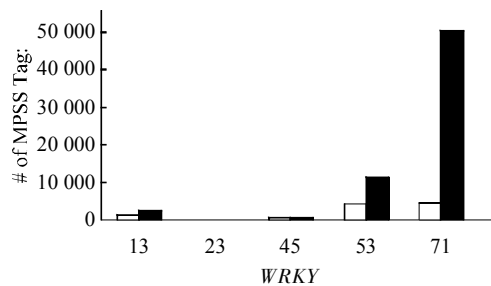


Fig. 3 Transcriptional analysis of WRKY genes in rice leaves
of MPSS Tag: Number of MPSS Tags per 10 million tags for each gene collected from rice MPSS database (<http://mpss.udel.edu/rice/>). □: Seedling stage; ■: Tillering stage.

2.5 水稻与白叶枯病菌的互作

在水稻分蘖期接种白叶枯病菌 15 天后，拍照比较病斑长度(图 4)。结果表明，4021 接种 PXO99 后呈典型的抗病反应，病斑长度小于 1.5 cm，TP309 接种 PXO99 和 4021 接种 PXO99ΔraxST 后均呈现典型的感病反应，病斑长度均超过 10 cm，Mock(4021-H₂O)反应没有明显的病斑。



Fig. 4 Photograph of rice leaves taken at 15 days after inoculation with *Xoo*
R: 4021-PXO99; S1: TP309-PXO99; S2: 4021-PXO99ΔraxST; Mock: 4021-H₂O.

2.6 WRKY 蛋白质在水稻抗白叶枯病反应中的表达

为了解目标蛋白在 *Xa21* 介导的水稻 - 白叶枯病菌抗性反应中的表达，用 WB 技术检测了在抗病反应不同时间点 WRKY 蛋白的表达丰度(图 5)。图 5 结果显示 OsWRKY13 和 OsWRKY23 蛋白表

达丰度在接种后不同时间点没有可见的变化, 而 OsWRKY45、OsWRKY53 和 OsWRKY71 蛋白在接种后期均有明显的诱导条带出现, 这些蛋白质的表达丰度随接种时间延长有所增加. OsWRKY45 出现 2 条带, 其中一条和预测分子质量(34 ku)相符, 另一条带分子质量略大. OsWRKY53 的诱导条带出现在 22 ku 处, 比预测分子质量(51 ku)要小. 因为在叶片中检测不到 2 个蛋白质的表达, 所以说 OsWRKY45 和 OsWRKY53 的表达是受白叶

枯病菌诱导的. OsWRKY71 的诱导条带出现在 60 ku 左右, 均比预测分子质量(37 ku)大, 与叶片中的表达相比, 可以得知 60 ku 条带是在正常生长过程中需要的, 而 60 ku 上下的诱导条带可能与抗病相关. 此外, OsWRKY13、OsWRKY23 和 OsWRKY71 属于 II 类 WRKY 家族成员, OsWRKY53 属 I a 类, OsWRKY45 属 III 类(表 1), 从本研究结果中未发现蛋白质表达与所属类别的相关性.

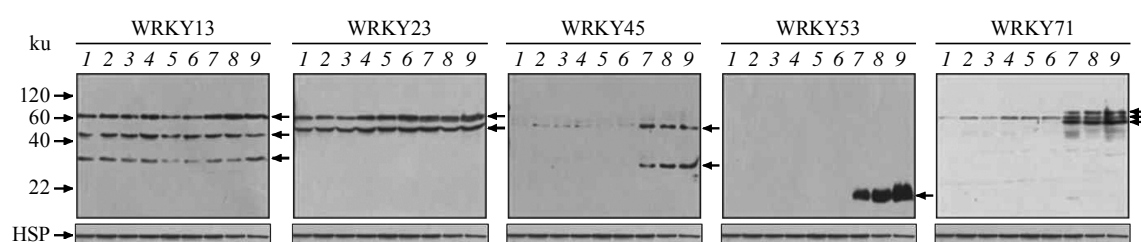


Fig. 5 The expression profiling of WRKY proteins in the incompatible interactions between rice and *Xoo*

Rice leaf samples were collected at several time points after inoculation of *Xoo*. 1~9: 0 h, 2 h, 8 h, 1 d, 2 d, 3 d, 5 d, 7 d and 10 d, respectively.

2.7 WRKY 蛋白在不同水稻-*Xoo* 互作反应中的表达

为了解 WRKY 蛋白在水稻 - 白叶枯病菌 互作中的表达, 我们对 3 个在抗性反应中发生诱导变化的 WRKY 蛋白做了进一步分析, 比较了它们在抗病 (R: 4021-PXO99)、感病 1 (S1: TP309-

PXO99)、感病 2 (S2: 4021- PXO99 Δ raxST) 和对照 (M: 4021-H₂O) 反应 3 个时间点 (0 h, 3 天和 5 天) 的表达丰度变化 (图 6). 从图 6 可以看出, 水稻接种后, 在 3 天和 5 天的材料中, 与对照相比 OsWRKY45、OsWRKY53 和 OsWRKY71 蛋白在抗、感反应中均发生了明显可见的诱导表达. 有意

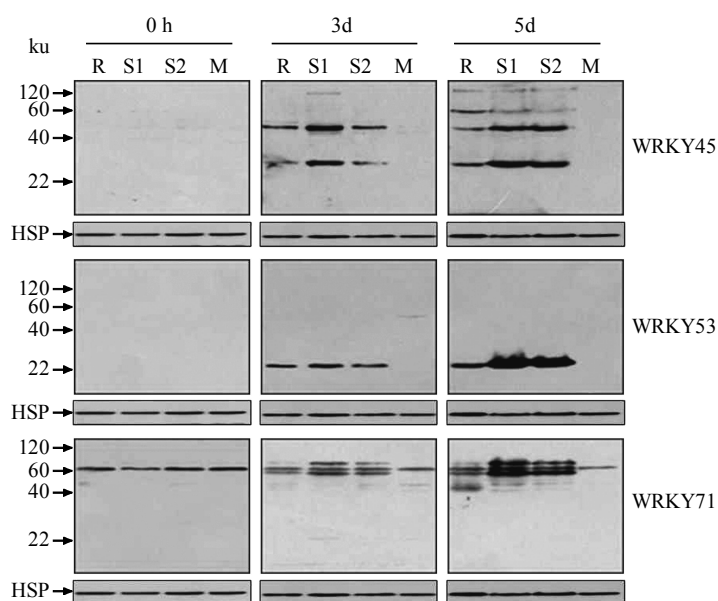


Fig. 6 Comparison analysis of WRKY protein expression among incompatible, compatible and mock treatments

WB analyses were carried out for leaf proteins isolated from four different interactions between rice and *Xoo* at three time points (0 h, 3 d and 5 d) using anti-WRKY protein-specific antibodies. Lane R, S1, S2, M indicate interactions 4021-PXO99, TP309- PXO99, 4021- PXO99 Δ raxST and 4021-H₂O.

思的是, 抗病和感病反应间蛋白质的变化有一定一致性, 甚至在感病反应中有些蛋白质表达的变化幅度还大于抗病反应, 说明这些 WRKY 蛋白的变化并不是抗病特异的, 而是抗感共有的, 这个结果提供了抗感反应间有平行性的分子证据. 两个感病反应间相比没有发现明显的区别.

2.8 水稻-Xoo 互作过程中 WRKY 基因的转录分析

从水稻 MPSS 网站下载了水稻与 Xoo 互作过程中的转录数据, 按每千万条标签中编码 WRKY 基因的数目作图(图 7), 进行基因转录相对强度的比较. 由图 7 可见, 与正常生长水稻叶片中的转录类似(图 3), *OsWRKY53* 和 *OsWRKY71* 的相对转录强度较高, *OsWRKY13* 和 *OsWRKY45* 也有较低水

平的转录, 但 *OsWRKY23* 的转录几乎检测不到. 比较抗、感和对照 3 种互作条件下在 3 个时间点的转录情况, 可以看出 *OsWRKY53* 在 3 h 和 48 h 时间点的抗、感反应中转录丰度高于对照, 在 12 h 时间点的抗、感反应中的转录略低于对照. 随接种时间延长 *OsWRKY71* 在抗、感互作中的转录呈下降趋势. 对 *WRKY53* 和 *WRKY71* 在水稻-Xoo 互作过程中的转录与蛋白质表达信息进行比较, 没有发现它们之间存在明确的关联, 暗示转录和翻译水平的调控很可能是独立的. 其他 3 个基因(*OsWRKY13*、*OsWRKY23* 和 *OsWRKY45*)转录信号较低, 难以比较互作过程间的转录区别.

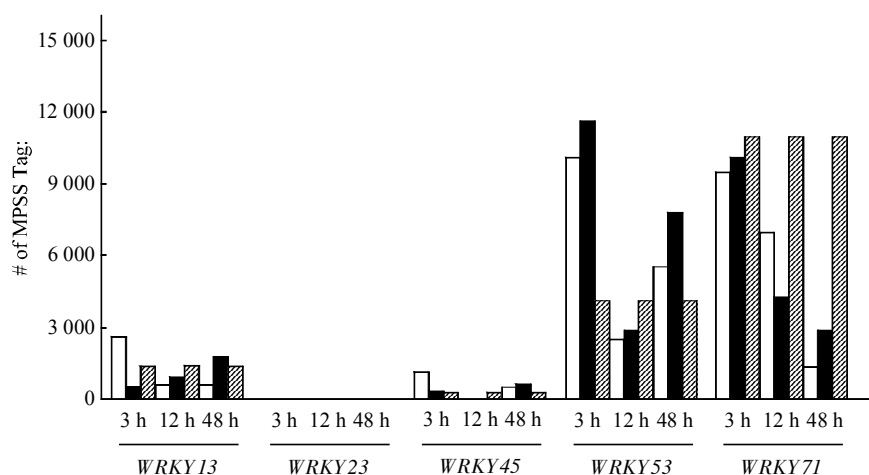


Fig. 7 Transcriptional analysis of WRKY genes among incompatible, compatible and mock treatments interactions between rice and Xoo

of MPSS Tag: Number of MPSS Tags per 10 million tags for each gene collected from rice MPSS database (<http://mpss.udel.edu/rice/>). □: R; ■: S; ▨: M.

3 讨 论

蛋白质是基因功能的直接体现者, 因此了解蛋白质的表达特征对阐明蛋白质功能具有重要意义. 本研究选择了 5 个水稻 WRKY 转录因子, 制备了抗体并对抗体特异性进行了鉴定. 用 WB 分析了 WRKY 蛋白在水稻叶片生长以及与白叶枯病菌互作过程中的表达丰度变化. 结果表明, *OsWRKY13*、*OsWRKY23* 和 *OsWRKY71* 在叶片中表达, 且随叶片生长表达丰度逐步提高, 在开花期叶片中达到高峰, 而 *OsWRKY45* 和 *OsWRKY53* 在叶片中未见表达. 在水稻-Xoo 互作过程中,

OsWRKY45、*OsWRKY53* 和 *OsWRKY71* 蛋白表达发生了变化, 其变化类型包括信号强度的增加、修饰或降解条带的出现等. 本实验结果说明, *OsWRKY13* 和 *OsWRKY23* 可能在叶片正常生长过程中发挥作用, *OsWRKY45* 和 *OsWRKY53* 可能在水稻-白叶枯病菌互作过程中发挥作用, 而 *OsWRKY71* 在二种条件下均有功能. 本实验结果对了解 WRKY 转录因子的功能积累了重要数据.

有许多数据表明 WRKY 转录因子在水稻对病原物的应答中发挥作用. 在已经鉴定的 *Xa21* 介导的抗病途径元件中, *XB10* 就编码 WRKY 转录因子^[7-10]. 在水稻受真菌 *M. grisea* 侵染后, 45 个受检

测的 *WRKY* 基因中有 15 个基因的转录发生显著变化, 其中 12 个 *WRKY* 基因的转录也不同程度地受到白叶枯病菌 *Xoo* 的诱导^[21]. 敲除 4 个 II a 类 *WRKY* 亚家族成员 (*OsWRKY62*, *OsWRKY28*, *OsWRKY71*, *OsWRKY76*) 可诱导 *PR10* 基因的表达上调^[38]. 在白叶枯病菌和稻瘟病菌侵染水稻的过程中, *OsWRKY13* 被诱导转录, 并可以调控部分水杨酸信号途径的基因^[29], 而 *OsWRKY23* 在水稻稻瘟病菌 *Pyricularia oryzae* Cav 以及 SA 处理后, 可被诱导转录, 超表达 *OsWRKY23* 的拟南芥植株中 *PR* 基因转录增加, 并提高了对病原细菌 *Pseudomonas syringe* pv. *tomato* 的抗性^[18]. 超表达 *OsWRKY71* 的转基因水稻对白叶枯病的抗性增加, 而且抗病相关基因 *OsNH1* 和 *OsPR1* 的表达量也在转基因水稻中显著增强^[29, 39]. *OsWRKY53* 受 SA、MeJA 和稻瘟病菌诱导, 且超表达转基因植株内 *PBZ1*、*PR14*、*Chitinase1*、*PR5* 和 *Chitinase2* 的表达量也显著增强, 并表现出对稻瘟病的抗性^[22]. 本实验用蛋白质表达丰度的变化结果为 *OsWRKY45*、*OsWRKY53* 和 *OsWRKY71* 蛋白参与 *Xa21* 介导的抗病途径提供了进一步的证据, 为鉴定 *Xa21* 相关的新的抗病元件提供了线索. 没有发现 *OsWRKY13* 和 *OsWRKY23* 蛋白在抗、感反应中的表达丰度变化, 不支持但也不能排除它们参与 *Xa21* 抗病反应的可能性, 因为其调控方式可能是发生在翻译后修饰水平.

在抗病反应中 *WRKY* 蛋白的表达丰度增高是比较容易理解的, 但在感病反应也发生了与抗病反应中一致的变化, 甚至感病反应中的变化幅度有时还大于抗病反应, 这与我们对 *PR* 蛋白检测中观察到的现象类似^[40]. 对此我们提出的解释是, 在发生抗病反应的水稻叶片中, 包括 *WRKY* 蛋白表达在内的各种因素协同作用, 抑制了病原物的生长, 导致病原物数量较少, 作用于单位病原物的 *WRKY* 蛋白量相对较高, 而在发生感病反应的叶片中, 病原物数量较大, 平均作用于单位病原物的 *WRKY* 蛋白相对较低. 因此我们推测感病反应中 *WRKY* 蛋白的表达丰度升高应该是由病原物较多引起的, 这是感病的结果, 而不是原因. 抗病和感病反应中蛋白质表达特征的平行性也说明二者间共享一些信号传导途径.

本研究为比较 *WRKY* 的转录和翻译信号的相关性提供了一个机会, 在叶片生长过程中, 可检测到 3 个蛋白质 (*OsWRKY13*、*OsWRKY23* 和

OsWRKY71) 的表达在前期随生长过程而增加, 但用 MPSS 检测到 *OsWRKY13* 和 *OsWRKY23* 的转录水平很低, *OsWRKY71* 的转录丰度在苗期随生长过程而提高, 与蛋白质表达丰度的趋势相符合. 在抗病反应中, 我们检测到 3 个 *WRKY* 的蛋白质 (*OsWRKY45*、*OsWRKY53* 和 *OsWRKY71*) 表达水平发生上调变化, 但其 MPSS 数据显示, *OsWRKY45* 的转录水平很低, 而 *OsWRKY53* 和 *OsWRKY71* 的转录丰度呈下调趋势. 总体而言, 转录和翻译信号变化趋势有明显的不一致现象. 提示我们在关注相关基因转录的同时, 还要具体了解蛋白质的表达. 实际上, 有报道表明转录和翻译之间的一致是普遍的现象^[41].

WRKY 转录因子是一类重要的功能蛋白质, 本研究通过系统调查 5 个 *WRKY* 蛋白在叶片生长和抗病中的表达, 鉴定了它们受诱导表达变化的起始时间点、持续时间、变化程度以及修饰条带的出现等特征, 为了解其功能提供了线索, 蛋白质的不同表达特征可能反映了它们的功能区别. 在此基础上, 可以进一步调控 *WRKY* 蛋白的表达, 深入开展功能研究.

参 考 文 献

- [1] Song W Y, Wang G L, Chen L L, *et al.* A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 1995, **270**(5243): 1804-1806
- [2] Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, *et al.* Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(4): 1663-1668
- [3] Sun X, Cao Y, Yang Z, *et al.* *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *Plant J*, 2004, **37**(4): 517-527
- [4] Jiang G H, Xia Z H, Zhou Y L, *et al.* Testifying the rice bacterial blight resistance gene *xa5* by genetic complementation and further analyzing *xa5* (*Xa5*) in comparison with its homolog *TFIIAgamma1*. *Mol Genet Genomics*, 2006, **275**(4): 354-366
- [5] Gu K, Yang B, Tian D, *et al.* R gene expression induced by a type- III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, 2005, **435**(7045): 1122-1125
- [6] Chu Z, Fu B, Yang H, *et al.* Targeting *xa13*, a recessive gene for bacterial blight resistance in rice. *Theor Appl Genet*, 2006, **112**(3): 455-461
- [7] Wang Y S, Pi L Y, Chen X, *et al.* Rice *XA21* binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full *Xa21*-mediated disease resistance. *Plant Cell*, 2006, **18**(12): 3635-3646
- [8] Peng Y, Bartley L E, Chen X, *et al.* *OsWRKY62* is a negative regulator of basal and *Xa21*-mediated defense against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Mol Plant*, 2008, **1**(3): 446-458

- [9] Park C J, Peng Y, Chen X, *et al.* Rice XB15, a protein phosphatase 2C, negatively regulates cell death and XA21-mediated innate immunity. *PLoS Biol*, 2008, **6**(9): 1910–1926
- [10] Chen X, Chern M, Canlas P E, *et al.* An ATPase promotes autophosphorylation of the pattern recognition receptor XA21 and inhibits XA21-mediated immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(17): 8029–8034
- [11] Park C J, Bart R, Chern M, *et al.* Overexpression of the endoplasmic reticulum chaperone BiP3 regulates XA21-mediated innate immunity in rice. *PLoS One*, 2010, **5**(2): e9262
- [12] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, *et al.* The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2000, **5**(5): 199–206
- [13] Ulker B, Somssich I E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, **7**(5): 491–498
- [14] Sun C, 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. *Plant Cell*, 2003, **15**(9): 2076–2092
- [15] Zhang Z L, Xie Z, Zou X, *et al.* A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiol*, 2004, **134**(4): 1500–1513
- [16] Johnson C S, Kolevski B, Smyth D R. TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell*, 2002, **14**(6): 1359–1375
- [17] Qiu D, Xiao J, Xie W, *et al.* Exploring transcriptional signalling mediated by OsWRKY13, a potential regulator of multiple physiological processes in rice. *BMC Plant Biol*, 2009, **9**: 74 (DOI: 10.1186/1471-2229-9-74)
- [18] Jing S, Zhou X, Song Y, *et al.* Heterologous expression of OsWRKY23 gene enhances pathogen defense and dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul*, 2009, **58**: 181–190
- [19] Xie Z, Zhang Z L, Zou X, *et al.* Interactions of two abscisic-acid induced WRKY genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells. *Plant J*, 2006, **46**(2): 231–242
- [20] Wang H, Hao J, Chen X, *et al.* Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. *Plant Mol Biol*, 2007, **65**(6): 799–815
- [21] Ryu H S, Han M, Lee S K, *et al.* A comprehensive expression analysis of the WRKY gene superfamily in rice plants during defense response. *Plant Cell Rep*, 2006, **25**(8): 836–847
- [22] Chujo T, Takai R, Akimoto-Tomiya C, *et al.* Involvement of the elicitor-induced gene OsWRKY53 in the expression of defense-related genes in rice. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1769**(7–8): 497–505
- [23] Zhang J, Peng Y, Guo Z. Constitutive expression of pathogen-inducible OsWRKY31 enhances disease resistance and affects root growth and auxin response in transgenic rice plants. *Cell Res*, 2008, **18**(4): 508–521
- [24] Peng X X, Tang X K, Zhou P L, *et al.* Isolation and expression patterns of rice WRKY82 transcription factor gene responsive to both biotic and abiotic stresses. *Agricultural Sciences in China* 2011, **10**(6): 893–901
- [25] Liu X Q, Bai X Q, Qian Q, *et al.* OsWRKY03, a rice transcriptional activator that functions in defense signaling pathway upstream of OsNPR1. *Cell Res*, 2005, **15**(8): 593–603
- [26] Qiu D, Xiao J, Ding X, *et al.* OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling. *Mol Plant Microbe Interact*, 2007, **20**(5): 492–499
- [27] Shang J, Xi D H, Xu F, *et al.* A broad-spectrum, efficient and nontransgenic approach to control plant viruses by application of salicylic acid and jasmonic acid. *Planta*, 2011, **233**(2): 299–308
- [28] Shimono M, Koga H, Akagi A, *et al.* Rice WRKY45 plays important roles in fungal and bacterial disease resistance. *Mol Plant Pathol*, 2012, **13**(1): 83–94
- [29] Liu X, Bai X, Wang X, *et al.* OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response. *J Plant Physiol*, 2007, **164**(8): 969–979
- [30] 李南羿, 柴荣耀, 郭泽建. OsWRKY80 基因参与调控水稻抗病反应研究. *上海农业学报*, 2009, **25**(3): 14–18
- Li N Y, Chai R Y, Guo Z J. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2009, **25**(3): 14–18
- [31] Guo Z J, Kan Y C, Chen X J, *et al.* Characterization of a rice WRKY gene whose expression is induced upon pathogen attack and mechanical wounding. *Acta Botanica Sinica*, 2004, **46**(8): 955–964
- [32] Lee S W, Han S W, Sriyanum M, *et al.* A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. *Science*, 2009, **326**(5954): 850–853
- [33] da Silva F G, Shen Y, Dardick C, *et al.* Bacterial genes involved in type I secretion and sulfation are required to elicit the rice Xa21-mediated innate immune response. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, **17**(6): 593–601
- [34] Odorico M, Pellequer J L. BEPITOPE: predicting the location of continuous epitopes and patterns in proteins. *J Mol Recognit*, 2003, **16**(1): 20–22
- [35] 陈浩, 李莉云, 白辉, 等. 水稻 U-Box 蛋白质在不同发育时期的表达分析. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(09): 1208–1214
- Chen H, Li L Y, Bai H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(09): 1208–1214
- [36] Li X, Bai H, Wang X, *et al.* Identification and validation of rice reference proteins for Western blotting. *J Exper Botany*, 2011, **62**(14): 4763–4772
- [37] Nakano M, Nobuta K, Vemaraju K, *et al.* Plant MPSS databases: signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA. *Nucl Acid Res*, 2006, **34**(Database issue): D731–735
- [38] Peng Y, Bartley L E, Canlas P, *et al.* OsWRKY II a transcription factors modulate rice innate immunity. *Rice (N Y)*, 2010, **3**(1): 36–42
- [39] Chujo T, Kato T, Yamada K, *et al.* Characterization of an elicitor-induced rice WRKY gene, OsWRKY71. *Biosci Biotechnol*

- Biochem, 2008, **72**(1): 240–245
- [40] Hou M, Xu W, Bai H, *et al.* Characteristic expression of rice pathogenesis-related proteins in rice leaves during interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Plant Cell Rep, 2012, **31**(5): 895–904
- [41] Li G W, Xie X S. Central dogma at the single-molecule level in living cells. Nature, 2011, **475**(7356): 308–315

Characteristic Expression Analysis of Five WRKY Transcriptional Factors in Rice Leaf Growth and Disease Resistance Reaction*

XU Wen-Jing^{1)**}, MIAO Liu-Yang^{1)**}, LI Li-Yun^{1)***}, LIU Zhao¹⁾, LIU Yu-Meng¹⁾, JIANG Guang-Huai²⁾, YANG Feng-Huan³⁾, HE Chen-Yang³⁾, LIU Guo-Zhen^{1)***}

⁽¹⁾ College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

⁽²⁾ Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽³⁾ Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract WRKY transcription factors, one of the largest gene families in rice genome, are reported to play important roles during disease resistance and other signaling pathways. We chose five WRKY proteins to survey their expression profiles in the process of leaf growth and the *Xa21*-mediated *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) resistance responses by Western blotting. The results indicated that OsWRKY13, OsWRKY23 and OsWRKY71 were expressed increasingly with leaf growth till the flowering stage and their expression were declined slightly at filling stage. However, the expression of OsWRKY45 and OsWRKY53 were not detected. In the *Xa21*-mediated resistance response, OsWRKY45, OsWRKY53 and OsWRKY71 proteins were induced, while the expression of OsWRKY13 and OsWRKY23 proteins were stable. Comparison among the resistance reaction, susceptible reaction and mock treatment revealed that the expression of OsWRKY45, OsWRKY53 and OsWRKY71 proteins had a similar pattern between resistance and susceptible reactions. This result suggested that OsWRKY13 and OsWRKY23 may play roles in rice leaf growth, OsWRKY45 and OsWRKY53 may play roles in rice-*Xoo* interactions and OsWRKY71 is functioning in both situations.

Key words WRKY, rice, *Xa21*, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, transcription factor

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00279

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31171528).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-312-7528787

LI Li-Yun. E-mail: liliyun@hebau.edu.cn

LIU Guo-Zhen. E-mail: gzhliu@genomics.org.cn

Received: June 11, 2012 Accepted: August 20, 2012