

水稻 *OsWRKY89* 启动子紫外线-B 反应元件区的鉴定*

赵长江¹⁾ 郝中娜²⁾ 王海华³⁾ 陈旭君¹⁾ 郭泽建^{1)**}

(¹⁾ 中国农业大学农业部植物病理学重点开放实验室, 中国农业大学植物病理学系, 北京 100193;

²⁾ 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021; ³⁾ 湖南科技大学生命科学学院, 湘潭 411201)

摘要 植物需要利用太阳光能进行光合作用, 因而不可避免地受到紫外线-B(UV-B)辐射的影响. 为了鉴定水稻 *WRKY* 转录因子 *OsWRKY89* 基因启动子中的 UV-B 反应相关元件, 分析了转启动子不同缺失片段与 *gus* 融合基因的水稻幼苗, 发现在该启动子中存在 UV-B 反应元件, 位于基因翻译起始位点上游 -1 213~-1 188 之间的 25 bp 区域, 碱基序列为 AAGATCTACCATTGCTCTATAGCTT. 结合 *OsWRKY89* 和 UV-B 诱导上调表达基因启动子序列分析发现, 该元件区在水稻 UV-B 反应基因启动子上具有高度的保守性, 而且与已知保守的光反应元件位置邻近, 表明该区域在水稻 UV-B 反应的转录调控中可能具有重要功能.

关键词 水稻, 启动子, 紫外线-B, 反应元件

学科分类号 Q3, Q7, Q94

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00666

紫外线(UV)辐射是太阳光到达地表的一部分, UV 光谱区传统上可以分为三部分: UV-A(320~400 nm), UV-B(280~320 nm), UV-C(小于 280 nm). 在这三部分光谱中, 平流层臭氧吸收波长低于 290 nm 的 UV 辐射, 使 UV-C 无法到达地表, 所以只有 UV-A 和长波 UV-B 具有生物学重要性. 植物需要利用太阳光能进行光合作用, 因而不可避免地受到 UV-B 辐射的影响, UV-B 对植物的影响不仅取决于 UV-B 的剂量也取决于波长^[1-2], 且在一定程度上与其他环境因子协同影响植物^[3].

Safrany 等^[4]在拟南芥 *ANAC13* 转录因子启动子上鉴定出了一个新的 UV-B 作用元件 UVBox^{*AtANAC13*} (核心序列 CAAG), 并指出 MYB 识别元件 (MYB-recognition element, MRE)MRE^{*AtANAC13*} (核心序列 AACCTT)和 UVBox^{*AtANAC13*} 定位在 *ANAC13* 启动子 150 bp 的区域内, 两个元件的同时存在是 UV-B 诱导 *ANAC13* 最大表达量所需的. 光应答元件(light response element, LREs)在不同启动子上均有分布, 它们正调控或负调控光反应基因的表达, 但没有一个单独的光反应元件出现在所有的光反应基因启动子中, 表明光调控网络的复杂性, 同时也表明启动子上 LREs 是以组合的形式而不是单个元

件为单位调节基因的光反应^[5]. 植物光反应元件研究比较多的是查尔酮合成酶基因(*Chalcone synthase, CHS*), 该基因可以被 UV-B 和 UV-A/ 蓝光诱导表达, 且在不同物种中的同源基因启动子都存在光反应元件^[6-9]. 光诱导 *CHS* 基因转录是通过多个 LRUs (light response unit, LRUs)共同作用实现的, 主要包括两种不同类型的顺式调控元件: ACGT- 元件 (ACGT-containing element, ACE^{*CHS*}; 核心序列为 CACGT)和 MYB 识别元件(MRE^{*CHS*}; 核心序列为 ACCTA).

Wang 等^[10]指出, 水稻 *WRKY* 转录因子 *OsWRKY89* 可以被 UV-B 辐射诱导表达, 而且超表达该基因水稻增强了对 UV-B 辐射耐性和稻瘟菌的抗性, 郝中娜等^[11]指出 *OsWRKY89* 基因启动子具有 UV-B 诱导活性. 本研究以水稻 *OsWRKY89* 翻译起始位点上游 1 500 bp 的启动子为研究对象, 通过分析该启动子系列缺失载体转基因水稻在 UV-B

* 国家自然科学基金资助项目(30771393).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62733849, E-mail: guozj@cau.edu.cn

收稿日期: 2009-11-09, 接受日期: 2010-04-08

处理后的启动子活性, 明确了水稻 *OsWRKY89* 启动子 UV-B 反应元件区, 以及其在水稻 UV-B 应答基因启动子具有高度保守性.

1 材料与方法

1.1 水稻的种植及处理

供试水稻材料在温室自然光周期生长 21 天, 转移到光照培养箱平衡培养 2 天, 或是剪取 2 cm 左右水稻叶片置于 1/2 MS 培养基上平衡培养 24 h. 然后将水稻幼苗或离体叶片置于两侧灯为 UV-B 灯的操作台, 形成离植株约 0.5 m, 光强为 $1.28 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的处理装置^[10]. 水稻幼苗暴露在 UV-B 下 15 min 后, 分别于暗培养 6 h 和 18 h 取样, 液氮速冻.

1.2 *OsWRKY89* 启动子缺失载体构建

以水稻秀水 11(XS11)基因组 DNA 为模板, 采用引入 *Kpn* I 酶切位点引物 *OsW89Pf*(5' *caggtacc-tggagtacatccatccgagc* 3')和引入 *Bam*H I 位点引物 *OsW89Pr*(5' *atggatccatgccacgcagctccaccatg* 3')扩增 *OsWRKY89* 基因翻译起始位点 ATG 上游 1 470 bp 启动子序列(NCBI 数据库中水稻 AC123514 克隆上 60 753~62 253 的序列, 图 S1, 见网络版附录, http://www.pibb.ac.cn/cn/ch/common/view_abstract.aspx?file_no=20090666&flag=1). 纯化回收的 PCR 产物经 酶切后置换 pCambia1301 质粒载体上 *gus* 基因的 CaMV35S 启动子, 构建 *OsWRKY89* 启动子与 *gus* 基因融合的植物表达载体 pCambia1301-*OsW89PL1470*(简写 *OW89PL1470*, 表示 *OsWRKY89* 基因翻译起始位点上游 1 470 bp 启动子片段与 *gus* 融合的载体, 下同). 然后以 *OW89PL1470* 质粒为模板, 用正向引物 *OsW89Pf345*(5' *caggtaccgatgcag-gctctgacgtaagata* 3'), *OsW89Pf638*(5' *caggtaccctcttg-ggctgggtctgctgg* 3'), *OsW89Pf1093*(5' *caggtaccctcgat-*

ccagagtaccagataggtg 3'), *OsW89Pf1213*(5' *caggtacc-aagatctaccattgctctat* 3')和 *OsW89Pf1188*(5' *caggtacc-gattaaggttaattattggcac* 3')分别与反向引物 *OsW89Pr* 配对扩增 ATG 上游 345 bp, 638 bp, 1 093 bp, 1 213 bp 和 1188 bp 片段, 构建 *OW89PL345*, *OW89PL638*, *OW89PL1093*, *OW89PL1213* 和 *OW89PL1188* 载体(图 1a).

另外以 pCam-*OsW89P* 质粒为模板, 用引物 *OsW89Pf* 和 *OsW89Pr* 扩增全长启动子, 回收的 PCR 产物用 *Pst* I / *Bam*H I 酶切后(*Pst* I 为启动子内部酶切位点), 回收 120 bp 的启动子片段亚克隆到 pCambia1301 载体得到 *OW89PL119*(图 1a).

1.3 *OsWRKY89* 启动子 120 bp 区域缺失载体的构建

以 *OW89PL1470* 质粒为模板, 用正向引物 *1213Bamf*(5' *attggatcccaagatctaccattgctctat* 3')和反向引物 *1093Ecor*(5' *attgaattctggattattactagcttagtg* 3')扩增 *OsWRKY89* 启动子 ATG 上游-1 213 bp 至-1 093 bp 区间的 120 bp 片段, PCR 产物回收后用 *Eco*R I / *Bam*H I 酶切, 与 Cam-GBS-GUS(该载体在 GUS 基因与靶序列之间含有 CaMV35S mini promoter)载体连接, 构建 Cam-*OW89Pd120-mip-GUS* 载体(简称 *Pd0*). 然后以 *Pd0* 质粒为模板, 用反向引物 *1093Ecor1*(5' *attgaattcaatctgttggttaattcttgt* 3'), *1093Ecor2*(5' *attgaattccgagcaaacgtgcatattagc* 3'), *1093Ecor3*(5' *attgaattccttgattaattgtgccaatat* 3'), *1093Ecor4*(5' *attgaattctaactttaatcaagctataga* 3')分别与正向引物 *1213Bamf* 配对扩增, 构建 *Pd1*, *Pd2*, *Pd3* 和 *Pd4* 载体(图 1b), 获得 *OsWRKY89* 启动子 120 bp 片段的系列缺失载体, 即 *Pd1* 为-1 213 bp 至-1 113 bp, *Pd2* 为-1 213 bp 至-1 135 bp, *Pd3* 为-1 213 bp 至-1 158 bp 和 *Pd4* 为-1 213 bp 至-1 179 bp.

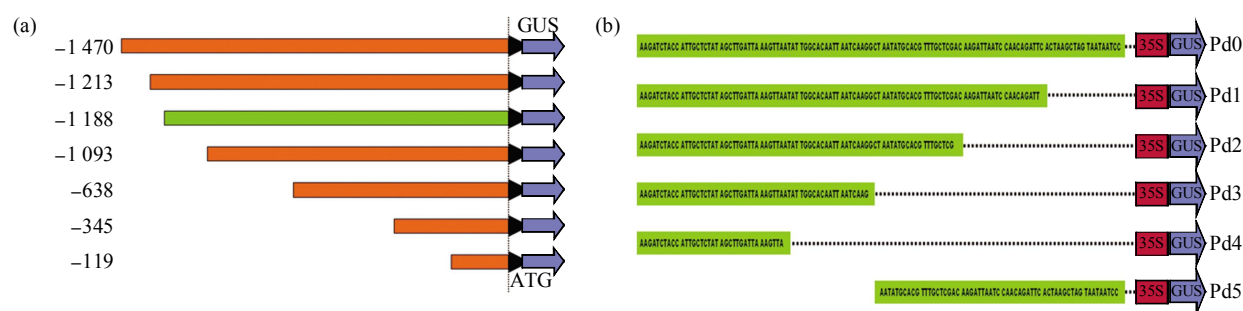


Fig. 1 Diagram of rice *OsWRKY89* promoter constructs

There were two groups of *OsWRKY89* promoter vectors. (a) Series deletion of the 5' ends of *OsWRKY89* promoter and each fused with *gus* reporter gene. (b) Deletions of the 120 bp fragment of *OsWRKY89* promoter and each fused with 35S mini promoter driven *gus* gene.

同时, 以 Pd0 质粒为模板用正向引物 1153Bamf (5' attggatccaatatgcacgtttgctcgac 3') 和反向引物 1093Ecor 扩增 *OsWRKY89* 启动子 ATG 上游 -1 153 bp 至 -1 093 bp 区间 60 bp 片段, 构建 Pd5(图 1b).

1.4 *OsWRKY89* 启动子缺失载体转化水稻

水稻 *OsWRKY89* 启动子系列缺失载体参照 Hiei 等^[12]的方法进行水稻转化. 其中 OW89PL119, OW89PL345, OW89PL638, OW89PL1093, OW89PL1213 和 OW89PL1470 转化水稻秀水 11 (SX11); OW89PL1188, Pd0, Pd1, Pd2, Pd3, Pd4 和 Pd5 转化水稻中花 17(ZH17).

1.5 β 葡糖苷酸酶检测与蛋白质测定

水稻 β 葡糖苷酸酶(beta-glucuronidase, GUS) 组织化学分析和活性的荧光测定参照 Jefferson 等^[13]的方法, 蛋白质浓度的测定参照 Bradford 方法^[14].

1.6 UV-B 处理水稻芯片分析

自然光周期生长 3 周龄的野生型 ZH17 苗, UV-B 处理 15 min(相应白光处理作为对照)后暗培养 6 h 取样, 进行 3 次生物学重复. 用 Triazol (Invitrogen 公司)提取总 RNA, 再用 RNeasy Protect Kit(QIAGEN 公司)纯化总 RNA. 以 HPLC 纯的 T7-(dT)24 Primer(购自 GENSET 公司)作为逆转录引物合成 cDNA, 使用 RNA Transcript Labeling Kit (Affymetrix 公司)以体外转录(IVT)的方式扩增并标记 cRNA 探针. 标记好的探针与 Affymetrix 公司的水稻全基因组寡核苷酸芯片 (GeneChip Rice Genome Array)进行杂交, 芯片扫描检测采用 GSI Lumonics 公司 ScanArray 系列. 选取 3 次生物学重复中 $P < 0.002$ 且实验组样品相对于对照组样品同向变化上调表达 4 倍以上(Signal Log Ratio ≥ 2)的基因启动子进行下一步分析. 利用 Affymetrix 公司网站进行基因的功能注释.

1.7 序列分析

通过 NCBI 数据库 BLASTn 获得 UV-B 诱导表达基因 ATG 上游 1 500 bp 的启动子序列, 并在 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 和 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行光反应元件分析, 在 MEME (http://meme.nbcr.net/meme4_1/cgi-bin/meme.cgi)进行共有元件分析.

2 结果与分析

2.1 *OsWRKY89* 基因 120 bp 启动子区域具有 UV-B 诱导活性

通过农杆菌介导的方法, 获得 *OsWRKY89* 基因启动子 5' 端系列缺失载体转化水稻 XS11 的转基因材料, 对 21 天的 T2 代纯合株系水稻幼苗进行 UV-B 处理, 分析了处理后暗修复 6 h 样品启动子活性. 通过对 OW89PL119, OW89PL345, OW89PL638, OW89PL1093, OW89PL1213 和 OW89PL1470 等 6 个载体转基因水稻的分析发现, OW89PL1213 和 OW89PL1470 启动子片段不仅具有一定的组成型活性, 还具有 2 倍以上的 UV-B 诱导活性, 然而 OW89PL119, OW89PL345, OW89PL638 和 OW89PL1093 载体的转基因水稻具有极低的组成型活性, 而且几乎没有 UV-B 诱导的 GUS 活性(图 2, 结果未完全显示). 所以认为水稻 *OsWRKY89* 基因启动子 ATG 上游 -1 213 ~ -1 093 bp 之间的 120 bp 区域存在 UV-B 诱导相关的顺式作用元件.

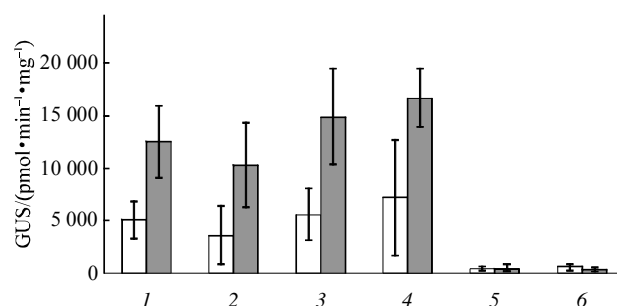


Fig. 2 Response of series deleted *OsWRKY89* promoters to UV-B treatment

Transgenic rice seedlings of *OsWRKY89* promoter with different deletions were treated with UV-B for 15 min. GUS activity of the promoter-gus fused gene was examined 6 h post the treatment. Two representative transgenic lines for each construct were shown. 1: OW89PL1470-1; 2: OW89PL1470-2; 3: OW89PL1213-1; 4: OW89PL1213-2; 5: OW89PL1093-1; 6: OW89PL1093-2. □: CK; ■: U6h.

2.2 *OsWRKY89* 启动子 120 bp 序列分析

在 PlantCARE 数据库进行光反应元件搜索, 获得 210 个匹配的结果, 涉及 50 多个不同类型作用元件, 包括光反应元件和部分光反应元件, 其中 G-box (CACGTG)、GT1-motif (GGTTAA)、GATA-motif/I-box (GATAG/AG) 等元件比较保守. 因为

OsWRKY89 启动子 120 bp 序列区域具有 UV-B 诱导活性, 故通过 PlantCARE 和 PLACE 网站分析 120 bp 区域内已知的光反应相关元件的分布情况. 在 120 bp 区域内, PlantCARE 软件发现 5 类作用元件, 其中 G-box 为光反应元件, Box-4 部分参与光反应; PLACE 软件共发现了 19 类元件, 其中 2 个元件参与光反应包括 ACE^{*OsWRKY89*}(T/GBOXATPIN2, AACGTG) 和 MRE^{*OsWRKY89*}(RBCSCONSENSUS,

AATCCAA), 1 个可能参与光反应的元件 MYBCORE(CNGTTR). 值得注意的是拟南芥转录因子 *ANAC13* 启动子上 UV-B 作用元件 UVBox^{*ANAC13*} (核心序列 CAAG)^[4]也在 *OsWRKY89* 启动子 120 bp 序列区域重复出现 2 次. 根据序列分析结果(图 3), *OsWRKY89* 启动子 120 bp 序列区域光反应元件密集, 很可能与 UV-B 等光反应调控相关.

1 AAGATCTACC ATTGCTCTAT AGCTTGATTA AAGTTAATAT TGGCACAATT AATCAAGGCT
61 AATATGCACG TTIGCTCGAC AAGATTATC CAAAGATTG ACTAAGCTAG TAATAATCC

Fig. 3 Analysis of *cis*-elements in the 120 bp fragment of *OsWRKY89* promoter

The results were obtained from PLACE, PlantCARE and MEME web sites. "CACGTT" framed presents ACE^{*OsWRKY89*}(G-box (ZM)/ACE-box); ATCCAA framed presents MRE^{*OsWRKY89*}(RBCSCONSENSUS/MRE-box); Italic "CAAG" shows UV-B box (AT); Shade box "AATTAAT" shows Box4 (PC); Letter underlined presents the conserved sequences from the promoters of UV-B induced genes by MEME with parameters of maximum motif width: 50.

2.3 *OsWRKY89* 的 120 bp 启动子缺失转基因水稻的 UV-B 诱导活性

鉴于 *OsWRKY89* 基因启动子 ATG 上游 -1 213~-1 093 bp 之间的 120 bp 区域存在 UV-B 诱导元件, 对该片段进一步缺失并构建了与 CaMV35S 微启动子驱动的 *gus* 基因融合载体, 并转化水稻 ZH17. 通过 PCR 扩增 Pd0, Pd1, Pd2, Pd3, Pd4 和 Pd5 转基因当代水稻叶片基因组的潮霉素和启动子片段, 发现所有供试的水稻材料都具有潮霉素抗性基因, 同时也能扩增出目的片段, 说明外源启动子片段已成功转化水稻(结果未显示). 对转基因水稻离体叶片进行 UV-B 处理 15 min 后,

于暗培养 6 h 和 18 h 后取样测定 GUS 活性. 每个载体的转基因水稻分别取 10 个株系进行 GUS 活性趋势分析(除 Pd3 仅有 4 个株系), 选择每个载体 2 个代表性株系作图(图 4). 结果表明, Pd0, Pd1, Pd2, Pd3 和 Pd4 的转基因水稻具有一定的组成型活性, 且都具有至少 2 倍的 UV-B 诱导活性; 尽管 Pd5 转基因水稻表现出一定的组成型活性, 但不具有 UV-B 诱导活性, 可能与该区域具有已知的光反应元件有关. 故 UV-B 诱导元件存在于 Pd4 启动子 36 bp 片段区域(AAGATCTACCATTGCTCTATAGCTTGATTAAAGTTA).

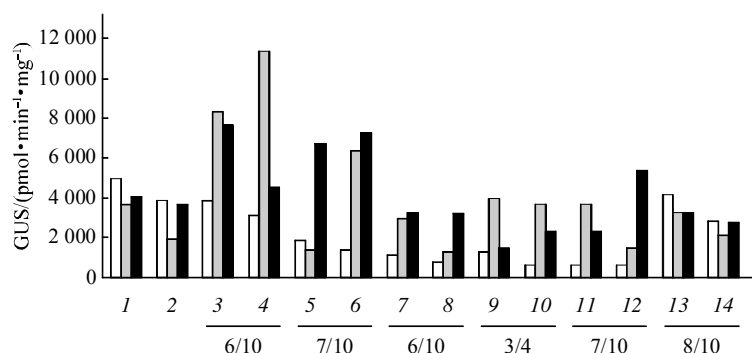


Fig. 4 Responses of *OsWRKY89* promoter fragments to UV-B treatment

Leaves 2 cm in length from different transgenic lines were placed onto 1/2 MS culture medium for 24 h under white light and irradiated with UV-B for 15 min. The treated leaves were kept in the dark, then harvested 6 h or 18 h later for GUS activity assay. GUS activities of two representative transgenic lines for each construct were shown. CK means control without treatment; U6h and U18h for the samples collected 6 h or 18 h after UV-B treatment. In addition, the ratio number below the construct means the amount of transgenic lines with similar trend under UV-B radiation. 1: OW89PL1188-1; 2: OW89PL1188-2; 3: Pd0-1; 4: Pd0-2; 5: Pd1-1; 6: Pd1-2; 7: Pd2-1; 8: Pd2-2; 9: Pd3-1; 10: Pd3-2; 11: Pd4-1; 12: Pd4-2; 13: Pd5-1; 14: Pd5-2; □: CK; ■: U6h; ■: U18h.

又通过分析 *OsWRKY89* 转基因 T1 代水稻于 UV-B 处理后 6 h 和 18 h 的启动子活性, 发现 *OsWRKY89* 基因启动子 ATG 上游 1 188 bp 区域内并不具有 UV-B 的诱导活性(图 4), 所以进一步将 *OsWRKY89* 基因启动子的 UV-B 诱导区缩小至 -1 213 bp~-1 188 bp 之间的 25 bp 区域(AAGATC-TACCATTGCTCTATAGCTT).

2.4 水稻的 UV-B 应答基因启动子分析

选取 UV-B 处理水稻转录组芯片中, 3 张同向增强表达 4 倍以上的基因 28 个(表 S1, 见网络版附录, http://www.pibb.ac.cn/cn/ch/common/view_abstract.aspx?file_no=20090666&flag=1), 通过 NCBI 获得这 28 个基因翻译起始位点 ATG 上游 1 500 bp 的启动子序列. 将 28 个 UV-B 诱导表达基因启动子与 *OsWRKY89* 的 120 bp 启动子序列

提交 MEME 网站, 参数设置分别为 minimum motif width: 6, maximum motif width: 50, 和 number of different motifs: 50. 分析结果发现这些基因启动子分享 5 个相对比较保守($E\text{-value} \leq E+20$)的区域. 其中 E 值最低的 2 个元件区域见图 5. M1 (7.00E-10) 的序列为 [TA][AG]CTTG[GTC][TCA][CTG][TG][CG]CA[AC]G, 对应 *OsWRKY89* 的 120 bp 启动子 68 至 82 的区域, 该区域涵盖多个物种中都比较保守的光应答元件 G 盒(CACGTT)和拟南芥 UV-B 反应元件 UV-B 盒(CAAG); M2 (2.40E+06) 的序列为 CT[TC][CT]TT[CG]C[CA][CT]T[TC][TC][CT]C 对应 *OsWRKY89* 的 120 bp 启动子 2 至 16 的区域(图 5), 值得关注的是该区域恰好与上述的 25 bp 水稻 *OsWRKY89* 基因启动子 UV-B 反应区相重叠.

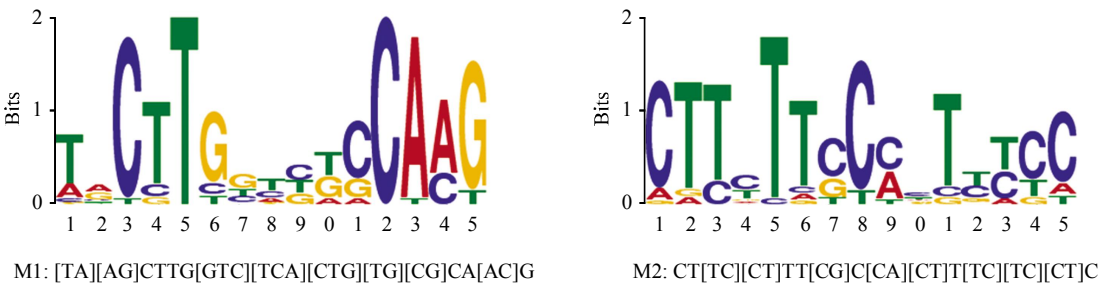


Fig. 5 Analyses of cis-elements existed in the promoters of genes up-regulated by UV-B treatment
The Logo resulted from MEME software presents the frequency of nucleotides in the 120 bp of *OsWRKY89* promoter and the promoters (1.5 kb in length for each) of 28 rice genes up-regulated more than 4 folds by UV-B irradiation.

3 讨 论

平流层臭氧是降低地球表面 UV-B 辐射的关键因子, 随着工业化进程的加快, 臭氧层正在变薄, 导致到达地球表面的 UV-B 辐射增强. UV-B 辐射影响植物的生长发育、生理和形态, 甚至整个地球生态系统^[15-16]. 植物对 UV-B 辐射的感知和信号转导机制还鲜为人知, 这些反应是独立于任何已知的光受体的, 而且不涉及 DNA 损伤信号途径. 所以研究 UV-B 辐射或是增强的辐射对植物的影响具有重要的意义.

通过对水稻 *OsWRKY89* 基因 120 bp 启动子区域与拟南芥 *AtANAC13* 启动子的 UV-B 反应区^[4]进行比较分析, 水稻 *OsWRKY89* 基因 120 bp 启动子区域包含 *AtANAC13* 启动子的 UV-B 等光反应元

件. 拟南芥 $MRE^{AtANAC13}$ 和 $UVBox^{AtANAC13}$ 两个元件位置靠近, 仅间隔 3 个碱基, 二者的同时存在是 UV-B 诱导 *ANAC13* 最大表达量所需的. 在 *OsWRKY89* 基因 120 bp 启动子中 $MRE^{OsWRKY89}$ 和 $UVBox^{ANAC13}$ 之间也只间隔 4 个碱基, 不过拟南芥 *AtANAC13* 启动子 $UVBox^{AtANAC13}$ 位于 $MRE^{AtANAC13}$ 和 $ACE^{AtANAC13}$ 的同侧, *OsWRKY89* 启动子 $UVBox^{ANAC13}$ 位于 $MRE^{OsWRKY89}$ 和 $ACE^{OsWRKY89}$ 之间. 值得一提的是, 尽管 $UVBox^{AtANAC13}$ 元件在水稻 *OsWRKY89* 启动子中重复出现, 但该元件在水稻 *OsWRKY89* 基因应答 UV-B 辐射中的作用还有待研究.

光应答元件在光调控基因的启动子普遍存在, 对于光调控的转录活性是必需的. 在 PlantCARE 数据库存在 50 多个不同类型光反应相关元件, 包括光反应元件和部分光反应元件, 其中 G-box

(CACGTG)、GT1-motif (GGTTAA)、GATA-motif/I-box (GATAG/AG)等元件比较保守, 而Z-box和H-box等不同物种来源序列变异较大。在拟南芥大量早期低剂量UV-B反应基因中有30%转录因子^[1], 表明转录调控在植物的UV-B反应中发挥重要的作用。除拟南芥HY5, 已报道UV-B反应的转录因子还有拟南芥ANAC13^[4], AtMYB4^[17]和水稻OsWRKY89^[10], 其中转录因子AtANAC13启动子存在UV-B特异诱导元件UVBox^{ANAC13} (CAAG)^[4]。本实验从UV-B诱导OsWRKY89基因启动子入手, 通过启动子5'端大片缺失转基因水稻进行研究, 发现水稻OsWRKY89基因启动子ATG上游-1 213~-1 093 bp之间的120 bp区域存在UV-B诱导或相关的顺式作用元件。又通过分析这120 bp片段的系列缺失转基因水稻材料, 发现OsWRKY89基因启动子的UV-B诱导区位于-1 213~-1 188 bp之间的25 bp区域(AAGAT-CTACCATTGCTCTATA GCTT), 该区域没有发现已报道的任何光反应元件, 包括拟南芥AtANAC13启动子的UV-B特异元件(CAAG)。所以水稻OsWRKY89基因启动子上UV-B反应区的应答元件为一个新的UV-B反应元件。

致谢 感谢中国农业大学植物病理学系彭友良教授和赵文生副教授在启动子活性实验中给予的支持和帮助。

参 考 文 献

- [1] Ulm R, Baumann A, Oravecz A, *et al.* Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(5): 1397-1402
- [2] Shinkle J R, Derickson D L, Barnes P W. Comparative photobiology of growth responses to two UV-B wavebands and UV-C in dim-red-light- and white-light-grown cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings: Physiological evidence for photoreactivation. *Photochem Photobiol*, 2005, **81**(5): 1069-1074
- [3] Caldwell M M, Bornman J F, Ballare' C L, *et al.* Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochem Photobiol Sci*, 2007, **6**(3): 252-266
- [4] Safrany J, Haasz V, Mate Z, *et al.* Identification of a novel *cis*-regulatory element for UV-B-induced transcription in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2008, **54**(3): 402-414
- [5] Jiao Y, Lau O S, Deng X W. Light regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet*, 2007, **8**(3): 217-230
- [6] Schulze-Lefert P, Becker-Andre M, Schulz W, *et al.* Functional architecture of the light-responsive chalcone synthase promoter from parsley. *Plant Cell*, 1989, **1**(7): 707-714
- [7] Kaiser T, Emmeler K, Kretsch T, *et al.* Promoter elements of the mustard *CHS1* gene are sufficient for light regulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol*, 1995, **28**(2): 219-229
- [8] Hartmann U, Valentine W J, Christie J M, *et al.* Identification of UV/blue light-response elements in the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase promoter using a homologous protoplast transient expression system. *Plant Mol Biol*, 1998, **36**(5): 741-754
- [9] Hartmann U, Sagasser M, Mehrtens F, *et al.* Differential combinatorial interactions of *cis*-acting elements recognized by R2R3-MYB, bZIP and bHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Mol Biol*, 2005, **57**(2): 155-171
- [10] Wang H H, Hao J J, Chen X J, *et al.* Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. *Plant Mol Biol*, 2008, **65**(6): 799-815
- [11] 郝中娜, 王海华, 郭泽建. 水稻OsWRKY89基因启动子的表达特性. *中国水稻科学*, 2006, **20**(2): 125-130
- [12] Hao Z, Wang H, Guo Z. *Chin J Rice Sci*, 2006, **20**(2): 125-130
- [13] Hiei Y, Ohta S T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, **6**(2): 271-282
- [14] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, **6**(13): 3901-3907
- [15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**(1-2): 248-254
- [16] Hollosy F. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, 2002, **33**(2): 179-197
- [17] Kliebenstein D J, Lim J E, Landry L G, *et al.* *Arabidopsis* UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatin condensation 1. *Plant Physiol*, 2002, **130**(1): 234-243
- [18] Jin H, Cominelli E, Bailey P, *et al.* Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 2000, **19**(22): 6150-6161

Identification of a Novel *cis*-Regulatory Element Region Responded to UV-B in Rice *WRKY89* Promoter*

ZHAO Chang-Jiang¹⁾, HAO Zhong-Na²⁾, WANG Hai-Hua³⁾, CHEN Xu-Jun¹⁾, GUO Ze-Jian^{1)**}

¹⁾ Key Laboratory of Plant Pathology, Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

²⁾ Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China;

³⁾ School of Life Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China)

Abstract *OsWRKY89*, a rice WRKY transcription factor gene, is induced by UV-B radiation. To identify the *cis*-elements in the *OsWRKY89* promoter related to UV-B response, the promoter and its deleted fragments were each fused with *gus* reporter gene and transformed into rice calli. The transgenic plants regenerated were used to analyze their responses to UV-B irradiation. Finally, an UV-B response *cis*-regulatory element was narrowed to the region of 25 bp between -1 188 and -1 213 upstream the translation start site of *OsWRKY89* gene, including nucleotide sequence of AAGATCTACCATGTGCTCTATAGCTT. Through analysis of the promoter of *OsWRKY89* and 28 genes up-regulated by UV-B treatment, two relatively conserved UV-B response elements in the 1 500 bp promoter region studied were located. Coincidental, the 25 bp of *OsWRKY89* promoter contains one of the conserved elements. Furthermore, several conserved light-response elements including ACE^{*OsWRKY89*}, MRE^{*OsWRKY89*} and UVBox^{*AtANAC13*} were also found to adjoin to the 25 bp UV-B response region in the *OsWRKY89* promoter, suggesting they together play roles in regulating the light responses of the gene.

Key words rice, promoter, UV-B, *cis*-regulatory element

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00666

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30771393).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62733849, E-mail: guozj@cau.edu.cn

Received: November 9, 2009 Accepted: April 8, 2010

附 录

```

-1 500  CACAACAGCG AACTAAAAAC GACACAGTAC TGGAGTACAT CCATCCGAGC TGCTGTCAAA
-1 441  ATGAACAGAA GGGCTGTATT CCTTCTTGAC TCGCACGGTC ACGCCGTGTT TTCGATGGAG
-1 381  TAAAACATCC CAGTTACTAC ATTCAAAGAA GCAAAAGATA TTGTTACTAT AATTTATTAC
-1 321  AAGTTCCATA CAAGAAGAAT AGCAAAAAGA TAAAGCCATA GCTGGATTGA ATTTCCCCTT
-1 261  TTATCTTTTT TCCCCTTAG ATGGTTGGCT TGGACAGATA TTACGAGAAG ATCTACCATT
-1 201  GCTCTATAGC TTGATTAAAG TTAATATTGG CACAATTAAT CAAGGCTAAT ATGCACGTTT
-1 141  GCTCGACAAG ATTAATCCAA CAGATTCACT AAGCTAGTAA TAATCCACTC GATCCAGAGT
-1 081  ACCAGATAGG TGTTTTAATT GGAAACAAGA AACATGCTTG AGTTAAACTA AAAATTAACC
-1 021  TGCCGGCCAG CCGATTGGAA CAATTGATTG CGTTCATTG GAGTCAAAGC AAGCATGTCC
-961   CTATTCAGGG ACCAGTAACG AGGGACAATT TGTGCTCTCC ATATATCTTC TCTCTACAAC
-901   CACCAGAAAA CCAGAGCAAT TTTTGCATC CACATATGAT GTGGAATGAA GCAGCTGCTC
-841   GCACATTTAT ATTATGGTAA CTAGGTCTGT CAGCCAACAA TCACAGGAAT CATTCTAGC
-781   CACAAGTGAC CCCATCCATA TCCTCCTGAT CATCAAGTAC AAACAGAAAC GTTTTTCAAC
-721   TATCAGTTAT GGTGGATGT TGTAATTCA TACACAGATA TTTTTTAAT GATATGCTCA
-661   GGTATTGAT AAATCGCTTT TTTTCTGGG CTGGGCTGTC TGGGATTAT GTTTACAATT
-601   GTTATATAC ACCTCTTAC AGTGATAATA TGATAAATAC TCCATAGAAG AAAAGATAAT
-541   ATACATGCAA TCTCAATGGG ATTATAGTCA CCAATATAC AAAACAAATT TTCTTTGTTC
-481   CGGAAAAGGG AAATTGTGTT GTTCCTCTAC TCGATTACGA TGTTCCTGGA GTAAATTTCT
-421   CCAAACTTCT TTTAGGATGA AGTTCTGAGC AAAAACTTAA CCTTTTAGGT ACTTTCACATA
-361   ATAAAAGAAA AACTGATGC AGGCTCTGAC GTAAGATATA TGTAATCAG GAGAGACATC
-301   CTAGAATAGA ACCCATTTTT GCAATTTTT AGAGTTACAT CTGGCTCTCA GTCATAAAAT
-241   TGTACTGGTA TTTGATAATG ACCTCACTTC GCTAGACTTT TGTGTGAGA ACATTTGAAC
-181   AATCTCAATT CCTCCCATCA TGGTGCTGCT GCTTGCTACC GGTATAAATA TATGCCTAAA
-121   GCTGCAGTTA GCTAACACCT TCTGCCCTGA CTATCATAGC CACATCTCTA TAATAGACAA
-61   ACTCATAAGA TGAATTTCT CGAATCTTTT GGTATAGTG ACTGTCAAGT AGTGATCAAC
+1     ATGATAGAGCACAAAAGGCTCTCATGGTGGAGCTGCGTGGCATGGTCATG
      M I E H Q K A L M V E L R G M V M

```

Fig. S1 Promoter sequence of rice *OsWRKY89* gene

The promoter sequence of *OsWRKY89* genes with 1.5 kb upstream of the predicted translation start site ATG was located between 60753 and 62253 in clone number AC123514 in NCBI database. The underlined sequences are partial coding region of *OsWRKY89* gene. The shading region shows promoter region (120 bp, -1 213 to -1 093) induced by UV-B radiation.

Table S1 Genes up-regulated by UV-B treatment from Affymetrix chip analysis

TIGR	Function	Average Log Ratio	EX1	EX2	EX3
LOC_Os01g50110	Myb-related protein Hv33	7.1	9.6	7.6	4.2
LOC_Os09g27930	UBiQuitin family member	5.8	6.3	6.1	5.1
LOC_Os04g53606	Hypothetical protein	5.6	6.6	4.9	5.4
LOC_Os10g38340	Glutathione S-transferase GSTU6	5.6	8.8	3.6	4.3
LOC_Os01g17330	Eukaryotic translation initiation factor 6	5.5	6.7	4.2	5.7
LOC_Os01g32670	Expressed protein	5.1	6.1	4.6	4.5
LOC_Os04g12970	Hypothetical protein	4.6	6.4	3.6	3.7
LOC_Os07g41460	Flavonol 4-sulfotransferase	4.5	5.9	3.9	3.7
LOC_Os01g40290	Expressed protein	4.2	5	3.8	3.9
LOC_Os01g52470	Elongation factor 2	4.0	4.5	4.2	3.3
LOC_Os03g57640	Gibberellin receptor GID1L2	4.0	5.2	3	3.7
LOC_Os11g30290	Hypothetical protein	3.8	4.1	2.4	5
LOC_Os01g72140	Glutathione S-transferase	3.8	3.6	3.8	4
LOC_Os12g08930	Expressed protein	3.7	5.4	3.2	2.6
LOC_Os02g36530	Expressed protein	3.6	4	3.5	3.2
LOC_Os03g62480	Anthocyanidin 5,3-O-glucosyltransferase	3.5	4.2	2.9	3.5
LOC_Os11g10470	Expressed protein	3.5	4.1	3.2	3.2
LOC_Os09g27040	GEX1	3.5	4.7	2.9	2.8
LOC_Os01g43740	Cytochrome P450 72A1	3.4	4	3.7	2.5
LOC_Os06g39240	Endothelial differentiation-related factor 1	3.2	4.4	3.1	2.2
LOC_Os08g05970	Expressed protein	3.2	4.1	2.9	2.5
LOC_Os06g05410	Expressed protein	2.9	3.9	2.2	2.7
LOC_Os02g37320	ATFP4	2.8	3.3	2.3	2.7
LOC_Os01g53350	Anthocyanidin 5,3-O-glucosyltransferase	2.5	3.4	2	2.2
LOC_Os02g12900	Cysteine synthase	2.3	2.4	2.3	2.3
LOC_Os02g18180	ATP-binding cassette sub-family E member 1	2.2	2.5	2	2
LOC_Os05g45450	Nuclear protein	2.2	2.1	2.4	2
LOC_Os03g05700	Expressed protein	2.1	2.2	2.1	2.1

Their promoters were used for searching the conserved UV-B responsive elements.