

响应镉胁迫的水稻 WRKY15 转录因子基因的分离与表达特征

彭喜旭^{1,2} 白宁宁¹ 王海华^{1,2,*}

(¹ 湖南科技大学 生命科学学院, 湖南 湘潭 411201; ² 重金属污染土壤生态修复与安全利用湖南省高校重点实验室, 湖南 湘潭 411201; *通讯联系人, E-mail: hhwang@hnust.edu.cn)

Isolation and Expression Profiles of Cadmium Stress-Responsive Rice WRKY15 Transcription Factor Gene

PENG Xixu^{1,2}, BAI Ningning¹, WANG Haihua^{1,2,*}

(¹ School of Life Science, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China; ² Key Laboratory of Ecological Remediation and Safe Utilization of Heavy Metal-polluted Soils, College of Hunan Province, Xiangtan 411201, China; *Corresponding author, E-mail: hhwang@hnust.edu.cn)

Abstract: 【Objective】 Cadmium (Cd) is one of the most toxic heavy metal elements to growth and development of plants and human health. WRKY transcription factors play important regulatory roles in the resistance against stresses. But so far, the regulatory functions of WRKY proteins (WRKYs) in the resistant responses to Cd stress in plants remain unclear so far. 【Methods】 Full-length coding sequence of *OsWRKY15* was amplified by RT-PCR with gene-specific primers designed according to gene prediction. Structural characteristics of *OsWRKY15* were analyzed by bioinformatics software; Organ-specific and induced expression patterns of *OsWRKY15* were analyzed by qRT-PCR. Transcriptional activation activity of *OsWRKY15* was tested by yeast one-hybrid assay. 【Results】 *OsWRKY15*, 988 bp in length, contained an entire ORF in length of 825 bp, encoding a protein of 274 amino acid residues consisting of one WRKY domain with a zinc finger motif of C₂HC, belonging to the WRKY subgroup III. *OsWRKY15* had a nuclear localization signal and was predicted to be localized in nucleus. Yeast one-hybrid assay revealed that *OsWRKY15* had transcriptional activation activity. The transcript levels of *OsWRKY15* were higher in roots than those in stems and leaves, and the least was in panicles, flowers and dry seeds. Its expression was rapidly and significantly induced in response to Cd exposure, nitric oxide (NO) and abscisic acid (ABA) application with more increase folds in roots than in leaves. However, salicylic acid, jasmonic acid and ethylene exerted no obvious effects on the expression of *OsWRKY15*. 【Conclusion】 *OsWRKY15* may be involved in the regulation of rice resistance response to Cd stress through NO- and ABA-dependent signal pathways.

Key words: WRKY transcription factor; cadmium; gene isolation; gene expression profiles; *Oryza sativa*

摘要: 【目的】镉(Cd)是一种对植物生长发育和人类健康均具有很强毒害效应的重金属元素。WRKY 转录因子在抗逆生理过程中起重要的调节作用。为了研究 WRKY 基因在镉胁迫响应和抗性反应中的作用, 【方法】基于基因注释, 采用 RT-PCR 策略从一氧化氮(NO)处理的水稻叶片中分离完整的 *OsWRKY15* 编码序列, 运用生物信息学软件分析其编码蛋白的结构特征, 采用 qRT-PCR 分析其基因的空间(器官)特异性及诱导表达模式; 运用酵母单杂交方法检测其转录激活活性。【结果】克隆了 *OsWRKY15* cDNA 序列, 长 988 bp, 包含一个长 825 bp 的完整开放读码框, 编码 274 个氨基酸。*OsWRKY15* 具有 1 个典型的 WRKY 保守结构域, 锌指类型为 C₂HC, 归类于 WRKY 第 3 组; 拥有一个核定位信号, 因此推测为一种核蛋白。酵母单杂交分析表明, 它具有转录激活活性。*OsWRKY15* 在根中的表达丰度最高, 其次是叶和茎, 在颖果、花和干种子中的表达丰度较低; 受 Cd、NO 和脱落酸(ABA)快速且显著诱导, 且在根中被诱导的程度比叶中大, 而水杨酸、茉莉酸和乙烯对其表达无明显影响。【结论】*OsWRKY15* 是一个具有功能的核蛋白, 推测其可能通过 NO、ABA 介导的信号途径参与水稻对 Cd 胁迫的抗性反应。

关键词: WRKY 转录因子; 镉; 基因分离; 基因表达模式; 水稻

中图分类号: Q945.78; Q786; S511.032

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2018)02-0103-08

收稿日期: 2017-05-20; 修改稿收到日期: 2017-09-15。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31301617); 湖南省自然科学基金资助项目(2016JJ3060); 湖南省教育厅重点科研平台开放基金资助项目(15K045)。

镉(cadmium, Cd)是植物的非必需营养元素,其积累能直接或间接抑制植物的光合、呼吸和蒸腾作用,引起水分、矿质代谢异常和氧化胁迫,从而导致植株叶片失绿、卷曲坏死,根尖发黄,生长迟缓,最终死亡^[1]。Cd 具高迁移性,易被作物吸收,并通过食物链威胁人类健康^[2]。金属矿藏开采、冶金、“三废”排放、污水灌溉、污泥与磷肥的施用是土壤 Cd 污染的主要来源^[3]。

植物通过复杂的信号转导途径启动对 Cd 胁迫的应答,包括信号感知、次级信使产生、信号级联放大,最终汇集于转录因子对一系列参与 Cd 吸收、转运和解毒相关基因的转录激活,从而启动对 Cd 胁迫的主动抗性反应^[4]。转录因子在植物 Cd 应答的信号转导中占据重要位置。全基因组表达谱分析表明,Cd 胁迫下,水稻中包括 DREB、NAC、MYB、AP2/ERF、WRKY 在内的一些转录因子基因表达被早期诱导^[5, 6]。在芥菜(*Brassica juncea*)中, bZIP 转录因子基因 *BjCdR5* 受 Cd 诱导;进一步的分析表明, *BjCdR5* 参与 Cd 吸收以及从根至地上部的长距离转运,在 Cd 抗性中发挥重要作用^[7]。硫代葡萄糖苷是细胞中一种重要的硫的储存形式,在植物逆境应答中发挥重要功能。在天蓝遏蓝菜中, *MYB28* 受高 Cd 诱导,参与硫代葡萄糖苷合成的调节^[8]。

WRKY 转录因子在高等植物中构成蛋白超家族^[9]。它们最典型的结构特征是含有 1 至 2 个保守的 WRKY 结构域:由大约 60 个氨基酸组成,其 N 端的七肽 WRKYGQK 十分保守,C 端为锌指结构。根据 WRKY 结构域的数目和锌指结构的组成,可将 WRKY 蛋白分成 3 组:第 1 组含两个 WRKY 结构域,锌指模式为 C₂H₂;第 2 和 3 组含 1 个 WRKY 结构域,前者的锌指模式为 C₂H₂,后者则为 C₂HC^[9]。WRKY 基因在植物抗热、冷、高盐、干旱、渗透和营养饥饿等非生物逆境中具有重要的调节功能^[10]。近来研究表明,WRKY 基因还可参与植物对金属或类金属胁迫反应及转运的调节。水稻 *WRKY80* 在过量的 Fe 处理下表达上调,暗示其在植物 Fe 胁迫反应中可能发挥一定的调节作用^[11]。拟南芥 *WRKY6* 的表达对砷(As)十分敏感,功能获得和功能丧失突变体的遗传与生理分析表明,该因子通过调节 As/Pi 转运体基因的表达以及抑制 As 诱导的转座子活化,从而实现 As 吸收的控制^[12]。拟南芥 *WRKY46* 通过抑制苹果酸转运体基因 *ALMT1* 的表达,在 Al 吸收过程中起负调控作用^[13]。

WRKY 转录因子介导植物生理过程是通过不同的信号途径来实现的。在这些复杂信号网络中,

除了一系列正、负调节子的交互作用外,水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)和脱落酸(ABA)等激素参与了上游调控^[14]。一氧化氮(Nitric oxide, NO)广泛参与植物的许多发育与生理过程^[15],也是植物体内一种重要的抗逆相关激素,在包括金属抗性中发挥重要的调节功能。NO 通过直接清除 ROS、提高细胞抗氧化酶活力、调节植物对金属的吸收与在细胞内的分布等机制,减轻 Cd、Al、Cu、Ni、Pb 等金属对植物的毒性^[16]。Hong 等^[17]发现, Cd 处理下,玉米 *WRKY4*(*ZmWRKY4*)与超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)基因的表达同时被诱导;原生质体瞬时表达分析表明, *ZmWRKY4* RNA 干扰阻断了 ABA 诱导的 *ZmSOD4* 和 *ZmAPX* 基因的表达与酶活性,而超表达 *ZmWRKY4* 则起促进作用。这些结果提示, *ZmWRKY4* 可能通过调节 *ZmSOD4* 和 *ZmAPX* 表达在 Cd 胁迫反应中发挥功能。然而,WRKY 在植物 Cd 响应和抗性中的调节作用以及 NO 信号是否参与其中,仍不清晰。

前期我们采用 cDNA 芯片(Agilent Rice Oligo Microarray, 含 40 000 个基因或转录本)对 NO 处理下水稻叶片的全基因组表达谱进行了分析。该芯片含有 112 个 WRKY 探针,代表 71 个 WRKY 基因,涵盖了目前预测的水稻 WRKY 家族^[18] 70%的成员。结果表明,至少在一个时间点有两倍或以上的表达变化的 WRKY 基因有 42 个;至少在两个时间点有两倍或以上表达变化的 WRKY 基因 17 个(定义为 NO 响应基因)^[19]。这些表达变化得到了实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)的印证。我们分析了 17 个 NO 响应的 WRKY 基因在 Cd 处理下的诱导表达情况,发现水稻 *WRKY15* 基因(*OsWRKY15*)可被 Cd 显著诱导,推测其可能通过 NO 信号途径在水稻对 Cd 胁迫反应和抗性中发挥作用。

本研究基于基因注释,分离完整的 *OsWRKY15* 编码序列,运用生物信息学软件分析其编码蛋白的结构特征,并检测 *OsWRKY15* 的空间(器官)特异性及诱导表达模式,拟为 *OsWRKY15* 的生物学功能研究积累基础性资料。

1 材料与方法

1.1 水稻培养与处理

在人工气候室中培养水稻日本晴(*Oryza sativa* L. *japonica* cv. Nipponbare)至 3 叶 1 心期。人工气候室培养条件如下:光强 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{s})$,光周期 14 h 光照/10 h 黑暗, 28°C/22°C,相对湿度 85%。用

100 μmol/L 硝普钠溶液(NO 供体)、1 mmol/L 水杨酸(SA)、100 μmol/L 茉莉酸甲酯(MeJA, 溶于 0.1% 甲醇)、100 μmol/L 脱落酸(ABA)、1 mmol/L 乙烯利(乙烯供体)对水稻幼苗进行叶面喷施, 各处理溶液中含 0.1%吐温 80, 以蒸馏水或 0.1%甲醇喷施为对照。在木村 B 营养液中添加 30 μmol/L Cd₂SO₄ 作为 Cd 处理, 以未加 Cd₂SO₄ 的营养液作为对照。

1.2 OsWRKY15 cDNA 的分离

基于水稻基因组注释计划 (<http://rice.Plantbiology.msu.edu/>)注释的 LOC_01g46800 序列设计引物: 5' -GGCATGGTGAGGCAACTGG-3' 和 5' -GGCTGGCAACGTGTAGGAAA-3' , 用逆转录 PCR 从 NO 处理的水稻幼苗叶片 RNA 中扩增.PCR 产物纯化后, 连接到 pUCmT 载体上, 测序验证。

1.3 序列分析

采用 DNASTar 软件推断基因的开放读码框 (ORF)及其所编码的氨基酸序列, 计算等电点和分子量。蛋白质同源序列搜索用 NCBI(<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)的 Protein BLAST 工具。采用 Mega 4.0 软件基于邻接法构建系统进化树。用 PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite>) 预测保守结构域和活性位点, 用 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 预测亚细胞定位信号。

1.4 RNA 提取与实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

采用 TRIZOL 试剂抽提总 RNA。用 FastQuant 逆转录试剂盒(北京天根)合成 cDNA 第 1 链。qRT-PCR 在 CFX96 PCR 仪(美国伯乐)上进行。以 *OsActin 1* 作为内参。设阴性对照和 3 次重复。结果利用相对定量方法($2^{-\Delta\Delta CT}$)计算。反应体系与程序参照参考文献[18]。*OsWRKY15* 引物: 5' -GTCGTCGCCCTTCGTGTC-3' , 5' -ATGAACTCCATGTCGTCTCCC-3' 。*OsActin1* 引物: 5' -ATCGCCCTGGACTATGAC-3' , 5' -GAAACGCTCAGCAC

CAAT-3' 。

1.5 转录激活分析

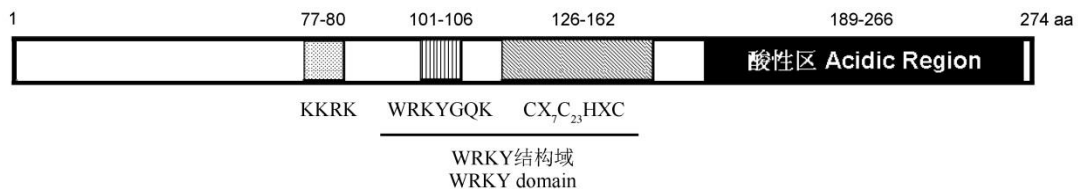
用引物 5' -CGGAATTCGGCATGGTGAGGC AACTGG-3' (下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点)和 5' -ACGCGTTCGACGGCTGGCAACGTGTAGGAAA -3' (下划线部分为 *Sal* I 酶切位点)扩增 *OsWRKY15* 的完整编码区(不含终止密码子), 用 *EcoR* I/*Sal* I 酶切, 插入到 PGBKT7(pBD), 构建 pBD-*OsWRKY15*。转化酵母菌株 AH109, 在 SD-Trp、SD-Trp-Ade-His 选择培养基上 30℃培养 3 d。β-半乳糖苷酶活性测定按供应商说明书进行。分别设 pBD 空载体和 pBD-*OsWRKY15*^[20]转化子为阴性和阳性对照。

2 结果与分析

2.1 OsWRKY15 cDNA 的克隆与序列分析

从 NO 处理的水稻幼苗叶片 RNA 中通过逆转录 PCR 扩增, 获得与预期长度(988 bp)一致的 cDNA 序列, 将该基因命名为 *OsWRKY15*。其编码序列最大的 ORF 长 825 bp, 推测编码 1 个由 274 个氨基酸组成、分子量为 29.1 kD、等电点(pI)为 7.3 的蛋白质。

利用 PROSITE 对 *OsWRKY15* 的编码蛋白进行结构域分析, 结果表明 *OsWRKY15* 具有 WRKY 蛋白家族的典型结构特征: 87~162 位为 WRKY 结构域, 其锌指模式为 CX₇CX₂₃HXC(图 1)。根据 WRKY 蛋白的分组原则^[9], 归于第 3 组。*OsWRKY15* 具有 3 个酪蛋白磷酸化位点、1 个 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点、3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点。用 WoLF PSORT 预测, *OsWRKY15* 在 77~80 位有核定位信号 KKRK, 提示其定位于细胞核中的可能性最大。189~266 位的理论 pI 为 3.4, 其中酸性氨基酸(Asp, D 和 Glu, E)的比例达 14.1%(11/78),

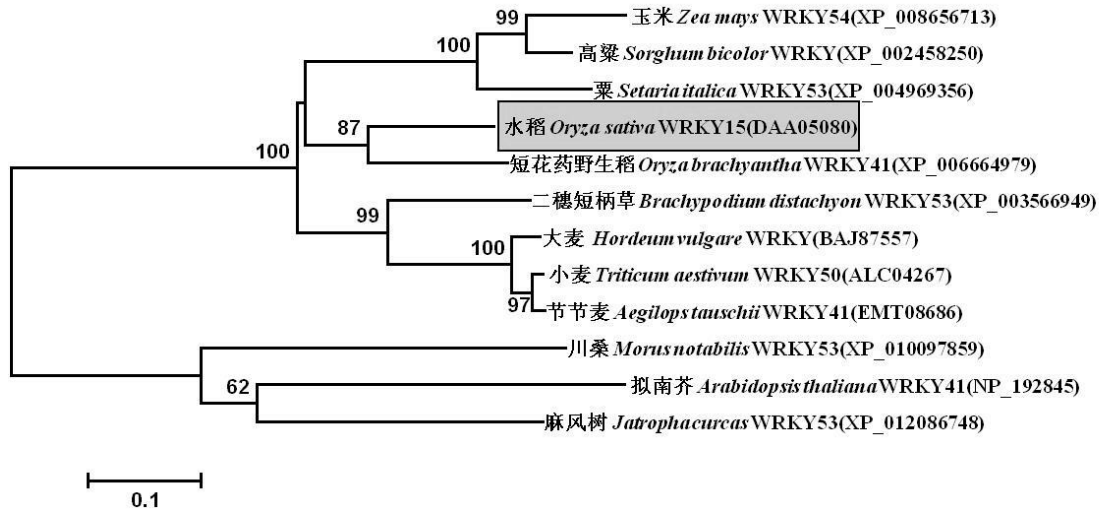


填充点、竖线、斜线的框和实框分别代表核定位信号、WRKYGQK 肽、锌指和酸性区。图中显示了保守的 WRKY 结构域和锌指类型。数字表示 *OsWRKY15* 中的氨基酸位置。

Dotted, vertically lined, diagonally lined and filled bars represent nuclear localization signal, WRKYGQK peptide, zinc-finger motif and acidic region, respectively. Conserved WRKY domain and zinc-finger pattern are presented, and numbers indicate the amino acid position of each structure in *OsWRKY15*.

图 1 *OsWRKY15* 基因的推导蛋白的结构模式

Fig. 1. Schematic diagram of the deduced protein of the *OsWRKY15* gene.



分支上的数字表示 1000 次重复的 Bootstrap 值。

Bootstrap values from 1000 replicates are shown.

图 2 OsWRKY15 与其他物种 WRKY 蛋白质的系统进化树分析

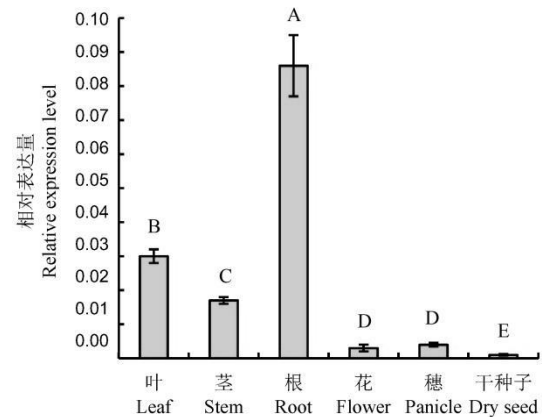
Fig. 2. Phylogenetic tree of OsWRKY15 and WRKY proteins from other species.

远大于酸性氨基酸在序列中的随机分布比例,提示 OsWRKY15 可能具有转录激活活性^[20],符合作为 WRKY 类转录因子的结构特征。

为了解 OsWRKY15 与不同物种的同源序列之间的进化关系,利用 BLAST 在线分析工具对 GenBank 的非冗余蛋白数据库进行同源序列搜索。结果表明,同源性最高的前 8 个序列均来源于单子叶植物,序列同一性均在 50% 以上。OsWRKY15 与短花药野生稻(*Oryza brachyantha*) WRKY41 (XP_006664979)在氨基酸水平上的同一性最高(65.3%),其次为高粱(*Sorghum bicolor*)中推定的 WRKY 蛋白 (XP_002458250)(53.1%)和玉米(*Zea mays*)WRKY54(XP_008656713)(52.1%)。这些蛋白的 WRKY 结构域十分保守,然而 WRKY 结构域之外存在较大分歧,反映了这些同源序列在结构上的多样性,也暗示它们可能具有不同的生物学功能。在多重序列比对的基础上,采用邻接法构建系统进化树(图 2)。这些序列分成两个大的进化分支:OsWRKY15 与来自单子叶植物的同源序列聚类在一组,而双子叶植物麻风树(*Jatropha curcas*)、川桑(*Morus notabilis*)和拟南芥的同源序列聚类在另一组,说明了它们在单、双子叶植物之间的进化分歧。

2.2 OsWRKY15 在不同器官中的表达分析

qRT-PCR 表明,OsWRKY15 在所分析的 6 种器官中均有表达,其中根中的表达量最高,其次是叶、茎,在颖果、花和干种子中表达量较低(图 3)。



不同字母表示在 0.01 水平差异显著 ($n=6$; 邓肯多重范围检验)。

Different uppercase letters indicate significant difference at 0.01 level ($n=6$) according to Duncan's multiple range test.

图 3 OsWRKY15 在水稻不同器官中的表达模式

Fig. 3. Expression patterns of OsWRKY15 in different rice organs.

2.3 OsWRKY15 在 Cd 和抗逆相关激素处理下的表达分析

采用 qRT-PCR 对水稻叶片和根在 Cd 处理下的表达动态进行了分析。结果表明,叶和根中 OsWRKY15 的表达均被 Cd 诱导,在根中诱导的幅度大于叶。在叶中,Cd 处理 6 h 时表达水平最高,为对照的 4.0 倍;在根中,Cd 处理后 1 h,表达达最高值,为对照的 8.7 倍,然后降低,但 12 h 的表达量仍显著高于对照(图 4-A)。提示 OsWRKY15 可能参与水稻对 Cd 胁迫的响应和抗性。

一氧化氮(NO)、水杨酸(SA)、茉莉酸甲酯(JA)、脱落酸(ABA)和乙烯利(ET)是与 Cd 胁迫响应和抗性相关的植物激素^[21]。为了了解 *OsWRKY15* 参与 Cd 胁迫响应或抗性所依赖的信号途径, 对 *OsWRKY15* 在上述 5 种激素处理后的表达变化进行了检测。结果表明, *OsWRKY15* 的表达受 NO 快速且显著诱导。在根中, NO 处理后 6 h 前表达量呈明显上升趋势, 6 h 达最大值, 表达量为 0 h 对照的 15.4 倍; 在叶中, *OsWRKY15* 在处理 1 h 达到最大值, 此时的表达量为对照的 9.9 倍, 6 h 时回复至与对照相当的水平, 然后又显著上升至接近 1 h 的水平(图 4-B)。同样, *OsWRKY15* 受 ABA 快速且显著诱导。处理后 1~12 h, 叶中 *OsWRKY15* 的表达量持续上升; 在根中, ABA 处理后 6 h 前呈显著上升趋势, 然后回落(图 4-E)。从总体上看, 无论在根还是叶中, *OsWRKY15* 被 NO 诱导的程度比被 ABA 诱导的要大。然而, SA、JA 和 ET 处理后, 根和叶中 *OsWRKY15* 的表达无明显变化, 各时间点表达量均与 0 h 对照相当(图 4-C, D, F)。

NO、ABA 和 Cd 处理下, *OsWRKY15* 在根中受诱导表达的程度明显高于叶。

以上表明, *OsWRKY15* 可能通过依赖于 NO 和

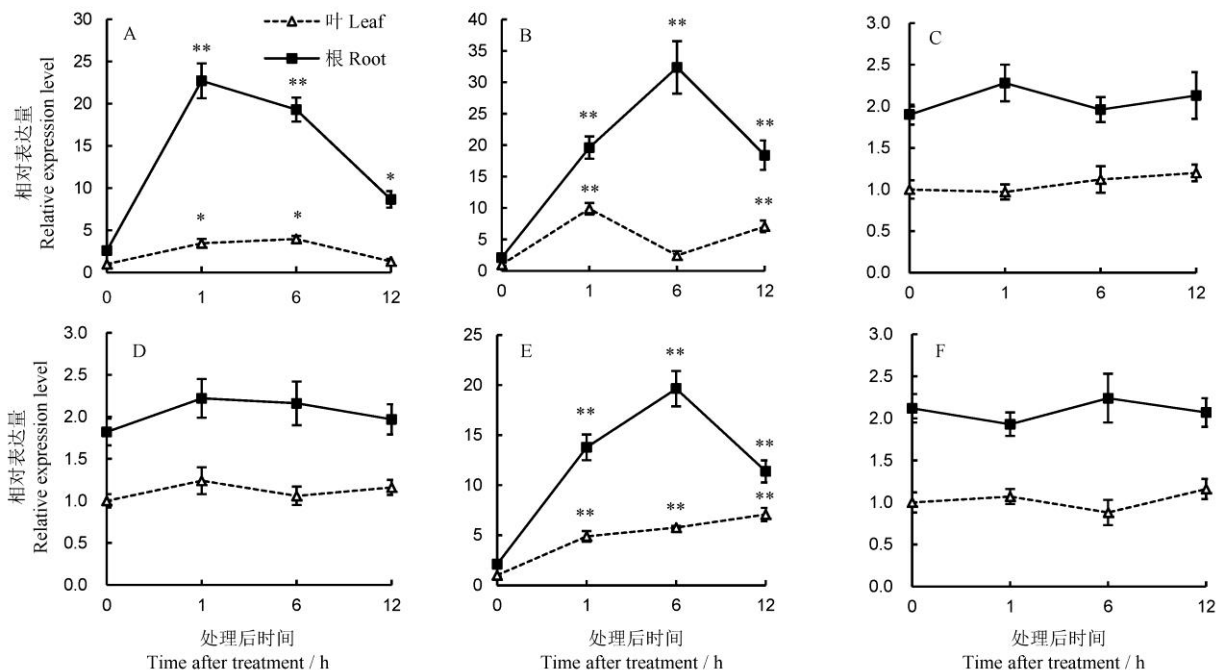
ABA 的信号途径参与水稻对 Cd 胁迫的反应。

2.4 *OsWRKY15* 的转录激活活性分析

从一级结构分析来看, 锌指结构后的区域含有较多的酸性氨基酸, 提示 *OsWRKY15* 可能为一转录激活子^[20]。为验证此假说, 将 *OsWRKY15* cDNA 的完整编码序列插入至 pGBKT7 中 Gal4 BD 的 C 端, 构建与 Gal4 BD 融合的酵母转化载体, 然后转化至酵母 AH109 中, 进行酵母单杂交分析。空载体 pGBKT7(负对照)、pBD-*OsWRKY15* 和 pBD-*OsWRKY30*(正对照)^[19]均在 SD-Trp 培养基上生长良好, 而在 SD-Trp-Ade-His 选择培养基上只有 pBD-*OsWRKY15* 和正对照能够生长(图 5-A), 说明 *OsWRKY15* 的确具有转录激活的能力。 β -半乳糖酶活性测定的结果也证明了这一点(图 5-B)。

3 讨论

植物对 Cd 的响应和抗性涉及到许多吸收、转运、解毒相关基因的表达调控^[4]。转录是基因表达的第 1 步, 转录水平的调控体现了经济与灵活的原则, 在基因表达调控中处于关键环节。另外, 从潜在的应用层面上看, 转录因子在提高作物抗逆方面

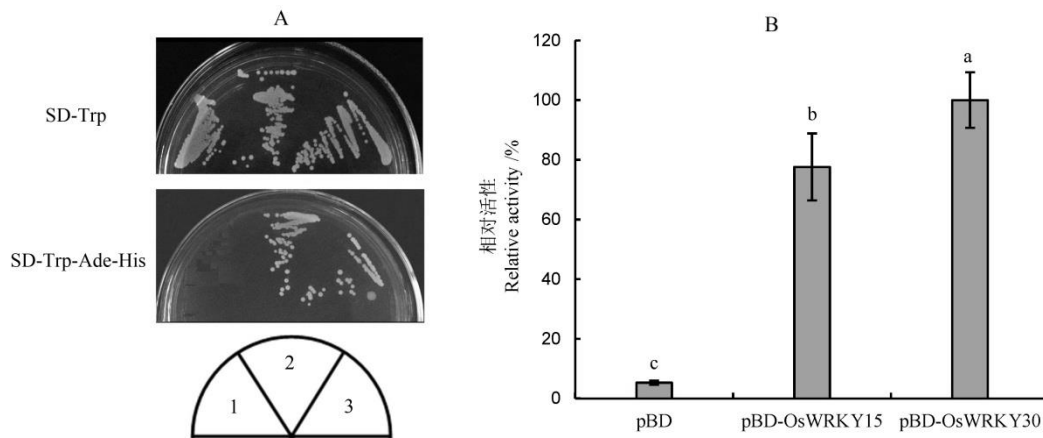


A—镉; B—一氧化氮; C—水杨酸; D—茉莉酸甲酯; E—脱落酸; F—乙烯利。*, **分别表示与 0 h 对照相比在 0.05、0.01 水平上有显著差异($n=6$; 邓肯多重范围检验法)。

A, Cadmium; B, Nitric oxide; C, Salicylic acid; D, Methyl jasmonate; E, Abscisic acid; F, Ethephon; *, ** indicate significant difference at 0.05, 0.01 level($n=6$), respectively, in relative to that of the control at 0 h according to Duncan's multiple range test.

图 4 *OsWRKY15* 在激素和 Cd 处理下的诱导表达

Fig. 4. *OsWRKY15* expression in response to different treatments with hormones and Cd exposure.



A—生长在 SD-Trp 或 SD-Trp-Ade-His 培养基上的酵母转化子。1—空载体 pGBKT7(负对照); 2—pGBKT7-OsWRKY15; 3—pGBKT7-30(正对照)。B—酵母转化子的 β -半乳糖苷酶相对活性分析。不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上有显著差异(邓肯多重范围检验法)。

A, Yeast transformants grew in SD-Trp or SD-Trp-Ade-His media. 1, Empty vector pGBKT7 (negative control); 2, pGBKT7-OsWRKY15; 3, pGBKT7-30 (positive control); B, Assay for relative β -galactosidase activity of yeast transformants. Different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

图5 OsWRKY15在酵母中的转录激活活性分析

Fig. 5. Assay of transcriptional activation activity of OsWRKY15 in yeast cells.

可能更加有效。因为,作物抗性通常由多基因控制,单个基因的遗传转化只能部分提高抗性;而一个转录因子可以调控表达多个性状或同一性状的多个基因。因此,分离和鉴定信号途径中的转录因子基因对阐明植物适应 Cd 胁迫的生理与分子机理至关重要,同时可能在 Cd 污染土壤的植物修复和低金属积累作物品种选育中具有一定的应用前景。

基因表达分析可为基因功能解析提供基础信息。基于 cDNA 芯片杂交和第 2 代 RNA-Seq 测序技术的基因组尺度上的转录组分析初步揭示了转录因子在植物 Cd 应答中起重要的调节作用^[5,6]。水稻地上部 WRKY104 的表达在 Cd 处理后 24 h 提高超过 90 倍^[6];在 Cd 超富集植物天蓝遏蓝菜中, TcWRKY53 的表达同样被 Cd 诱导^[23],提示它们可能参与植物对 Cd 胁迫的应答或抗性。最近, Yang 等^[24]通过启动子顺式元件分析、酵母单杂交以及基因表达模式分析,发现刚毛怪柳(*Tamarix hispida*) WRKY7 可能作为液泡膜 V 型质子泵 *ThVHAc1* 基因的上游调节子,在 Cd 抗性中起重要的调节作用。本研究从 NO 处理的水稻叶片中分离了 OsWRKY15 完整的编码序列,推定编码含 1 个 WRKY 结构域的蛋白,其锌指具有水稻第 3 亚组典型的结构模式^[9],含 KKRK 典型的核定位信号,预测定位于细胞核中。转录因子的转录激活域一般富含酸性氨基酸^[21]。很多 WRKY 具有符合上述特征的转录激活域^[9]。OsWRKY15 的 C 端为酸性结构区,

含有 4 个 Glu、7 个 Asp。酵母单杂交分析表明, OsWRKY15 的确具有转录激活活性。这些结果提示, OsWRKY15 是一个有功能的核调节蛋白。

NO、SA、JA、ABA 和 ET 等几种重要的逆境适应相关激素均参与植物对 Cd 抗性的建立、维持与活化^[22],因此 Cd 胁迫应答与其他非生物胁迫的抗性反应可能享有相似的信号传递机制,这也反映了植物对 Cd 的应答、抵御机制的复杂多样性。一方面, Cd 处理可以诱导这些激素在植物组织中的生物合成,改变它们在各器官或组织中积累水平与分布,另一方面这些激素的施用可以通过不同的机制提高植物对 Cd 的抗性。药物试验证明, NO 可以降低 Cd 胁迫下苜蓿的根部对 Cd 的吸收速率,同时通过激活活性氧清除系统缓解 Cd 对根细胞的氧化损伤,从而有效地削弱 Cd 伤害^[25]。ABA 可以整合不同的胁迫信号,控制下游胁迫反应,在植物对干旱、盐、低温等多种非生物逆境的抗性中发挥重要功能^[22]。在水稻中, ABA 抑制 Cd 从根向地上部运输,从而赋予水稻对 Cd 的抗性^[26]。Oono 等^[6]发现, Cd 胁迫下水稻中 ABA 依赖的转录因子(如 bZIP、NAC) 基因以及许多抗旱相关基因被 Cd 显著诱导,提示 Cd 与干旱胁迫的信号通路存在“对话”机制。本研究发现, OsWRKY15 被 Cd 快速而显著诱导,提示它可能参与了水稻对 Cd 胁迫的响应和抗性;尽管诱导时序与程度不同, OsWRKY15 都能被 NO 和 ABA 诱导,提示它可能位于 NO 和 ABA 信号途径的交

叉点实现对 Cd 胁迫反应的调节, 也不能排除它参与水稻对其他非生物胁迫抗性调节的可能性, 这尚需进一步证实。SA、JA 和 ET 不影响 *OsWRKY15* 的表达水平, 说明它们可能不参与 *OsWRKY15* 介导的对 Cd 胁迫的应答或抗性调节。*OsWRKY15* 在根、茎、叶等 6 种器官中表达丰度不一, 且根中的表达水平高于其他器官, 这与 Ramamoorthy 等^[27]报道的结果基本一致。有趣的是, Cd、NO 和 ABA 处理下, 根部 *OsWRKY15* 的表达受诱导的程度高于叶。若证明 *OsWRKY15* 果真在水稻 Cd 抗性中具有调节功能的话, 这些结果将不难理解, 因为植物对 Cd 吸收以及 Cd 对植物伤害的原初部位在根部。至于 *OsWRKY15* 在水稻 Cd 胁迫响应和抗性中是否具有重要的生物学功能有待下一步研究证明。

参考文献:

- [1] Cosio C, Vollenweider P, Keller C. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.): I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environ Exp Bot*, 2006, 58: 64-74.
- [2] Grant C A, Clarke J M, Duguid S, Chaney R L. Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation. *Sci Total Environ*, 2008, 390: 301-310.
- [3] Folgar S, Torres E, Pérez-Rama M, Cid A, Herrero C, Abalde J. *Dunaliella salina* as marine microalga highly tolerant to but a poor remover of cadmium. *J Hazard Mater*, 2009, 165: 486-493.
- [4] Verbruggen N, Hermans C, Schat H. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12: 364-372.
- [5] Tang M F, Mao D H, Xu L W, Li D, Song S, Chen C. Integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles in response to Cd exposure in rice seedlings. *BMC Genom*, 2014, 15: 835.
- [6] Oono Y, Yazawa T, Kawahara Y, Kanamori H, Kobayashi F, Sasaki H, Mori S, Wu J, Handa H, Itoh T, Matsumoto T. Genome-wide transcriptome analysis reveals that cadmium stress signaling controls the expression of genes in drought stress signal pathways in rice. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96946.
- [7] Farinati S, DalCorso G, Varotto S, Furini A. The *Brassica juncea* BjCdR15, an ortholog of *Arabidopsis* TGA3, is a regulator of cadmium uptake, transport and accumulation in shoots and confers cadmium tolerance in transgenic plants. *New Phytol*, 2010, 185: 964-978.
- [8] van de Mortel J E, Schat H, Moerland P D, Ver Loren van Themaat E, van der Ent S, Blankestijn H, Ghandilyan A, Tsiatsiani S, Aarts M G. Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ*, 2008, 31: 301-324.
- [9] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, Somssich I E. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2000, 5, 199-206.
- [10] Chen L, Song Y, Li S, Zhang L, Zou C, Yu D. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 819(2): 120-128.
- [11] Ricachenevsky F K, Sperotto R A, Menguer P K, Fett J P. Identification of Fe-excess-induced genes in rice shoots reveals a WRKY transcription factor responsive to Fe, drought and senescence. *Mol Biol Rep*, 2010, 37: 3735-3745.
- [12] Castrillo G, Sánchez-Bermejo E, de Lorenzo L, Crevillén P, Fraile-Escanciano A, Tc M, Mouriz A, Catarecha P, Sobrino-Plata J, Olsson S, Leo Del Puerto Y, Mateos I, Rojo E, Hernández L E, Jarillo J A, Piñeiro M, Paz-Ares J, Leyva A. WRKY6 transcription factor restricts arsenate uptake and transposon activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013, 25: 2944-2957.
- [13] Ding Z J, Yan J Y, Xu X Y, Li G X, Zheng S J. WRKY46 functions as a transcriptional repressor of ALMT1, regulating aluminum-induced malate secretion in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2013, 76: 825-835.
- [14] Jiang Y J, Yu D Q. WRKY transcription factors: Links between phytohormones and plant processes. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 501-502.
- [15] Lamotte O, Courtois C, Barnavon L, Pugin A, Wendehenne D. Nitric oxide in plants: The biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta*, 2005, 221: 1-4.
- [16] Xiong J, Fu G, Tao L, Zhu C. Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 497: 13-20.
- [17] Hong C Y, Cheng D, Zhang G Q, Zhu D, Chen Y, Tan M. The role of ZmWRKY4 in regulating maize antioxidant defense under cadmium stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482: 1504-1510.
- [18] Wu K L, Guo Z J, Wang H H, Li J. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins. *DNA Res*, 2005, 12: 9-26.
- [19] 孟姣, 王海华, 向建华, 蒋丹, 彭喜旭, 贺欢欢. 水稻 WRKY 转录因子基因家族响应外源一氧化氮的表达谱分析. *中国水稻科学*, 2016, 30(2): 111-120.
- Meng J, Wang H H, Xiang J H, Jiang D, Peng X X, He H H. Expression profiles of rice WRKY transcription factor gene family responsive to exogenous nitric oxide application. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(2): 111-120. (in Chinese with English abstract)

- [20] Peng X X, Hu Y, Tang X, Zhou P, Deng X, Wang H H, Guo Z. Constitutive expression of rice *WRKY30* gene increases the endogenous jasmonic acid accumulation, PR gene expression and resistance to fungal pathogens in rice. *Planta*, 2012, 236: 1485-1498.
- [21] Schwechheimer C, Bevan M. The regulation of transcription factor activity in plants. *Trends Plant Sci*, 1998, 3: 378-383.
- [22] Asgher M, Khan M I, Anjum N A, Khan N A. Minimising toxicity of cadmium in plants—role of plant growth regulators. *Protoplasma*, 2015, 252: 399-413.
- [23] Wei W, Zhang Y, Han L, Guan Z, Chai T. A novel WRKY transcriptional factor from *Thlaspi caerulescens* negatively regulates the osmotic stress tolerance of transgenic tobacco. *Plant Cell Rep*, 2008, 27: 795-803.
- [24] Yang G, Wang C, Wang Y, Guo Y, Zhao Y, Yang C, Gao C. Overexpression of *ThVHAc1* and its potential upstream regulator, *ThWRKY7*, improved plant tolerance of cadmium stress. *Sci Rep*, 2016, 6: 18752.
- [25] Li L, Wang Y, Shen W. Roles of hydrogen sulfide and nitric oxide in the alleviation of cadmium-induced oxidative damage in alfalfa seedling roots. *Biometals*, 2012, 25: 617e631.
- [26] Uraguchi S, Mori S, Kuramata M, Kawasaki A, Arai T, Ishikawa S. Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice. *J Exp Bot*, 2009, 60: 2677-2688.
- [27] Ramamoorthy R, Jiang S Y, Kumar N, Venkatesh P N, Ramachandran S. A comprehensive transcriptional profiling of the *WRKY* gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49: 865-879.