

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201309003

李立芹, 王西瑶. 马铃薯 *WRKY2* 基因的克隆和非生物逆境下的表达模式[J]. 广西植物, 2015, 35(3):401-407Li LQ, Wang XY. Cloning and expression pattern research under abiotic stress of the *WRKY2* in potato[J]. *Guihaia*, 2015, 35(3):401-407

马铃薯 *WRKY2* 基因的克隆和非生物逆境下的表达模式

李立芹, 王西瑶*

(四川农业大学 农学院, 成都 611130)

摘要: 马铃薯 *WRKY2* 基因的功能尚未见有报道, *WRKY* 蛋白是近年来发现的一类重要转录因子家族, 它们在植物应对生物胁迫、非生物胁迫和生长发育过程中起到关键的调控作用。该研究采用电子克隆法获得马铃薯 *WRKY2* 基因, 该基因的编码区长度 1 065 bp, 编码 355 氨基酸, 序列分析表明, 该蛋白属于 *WRKY* 家族第二组成员, 锌指结构为 C-X₅-C-X₂₃H-X-H。构建系统发育树结果表明它与番茄 *WRKY7* 亲缘关系较近, 氨基酸序列相似性达 96%, 与烟草中 *WRKY* 蛋白的相似性为 86%, 利用原核表达法在大肠杆菌中获得该蛋白。通过凝胶阻滞实验证明, 该蛋白在体外能结合 W-box 元件, 而且这种结合能被冷探针所竞争, 同时也表明 *StWRKY2* 不能结合含有突变 W-box DNA 片段, 证明 *StWRKY2* 与 W-box 结合具有特异性。通过实时荧光定量 PCR 技术分析该基因在根、茎和叶中的表达量, 结果表明该基因主要在根中表达, 其次是叶和茎。为进一步研究该基因可能参与的生理功能, 对马铃薯组培苗进行 10 μmol/L 低磷、10 μmol/L 低钾、200 mmol/L NaCl、400 mmol/L PEG 溶液和 4 °C 低温处理, 处理时间 6 h, 实时荧光定量 PCR 的结果表明该基因在低磷处理后表达量明显下降, 在 200 mmol/L NaCl 和 400 mmol/L PEG 处理 6 h 后表达量明显升高, 但在 10 μmol/L 低钾和 4 °C 低温处理后表达量与对照相比无明显变化。说明 *StWRKY2* 能响应低磷、NaCl 和 PEG 这三种非生物逆境胁迫。研究结果可为进一步深入研究马铃薯 *WRKY2* 基因的功能奠定基础。

关键词: 马铃薯; *WRKY*; 系统发育; EMSA; 表达模式

中图分类号: Q943.2; Q812 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2015)03-0401-07

Cloning and expression pattern research under abiotic stress of the *WRKY2* in potato

LI Li-Qin, WANG Xi-Yao*

(College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: Function of *StWRKY2* has not been reported. Plant *WRKY* proteins are found as an important class of transcription factors in recent years, which are widely involved in biotic stress, abiotic stress and growth development regulation, and they are mainly divided into three groups. *WRKY2* was cloned from potato by homology cloning, with length of the coding region 1 065 bp, encoding 355 amino acids by DNA sequencing. With the amino acid sequence of *StWRKY2* blasting in NCBI, 19 homology amino acid sequences were selected to analysis conservative domain. Amino acid analysis showed that the *StWRKY2* contained 1 conserved *WRKY* domain (TTGACC) and belonged to the second group of *WRKY* family members, and its zinc-finger structure was C-X₅-C-X₂₃H-X-H. Phylogeny tree results showed *StWRKY2* was the most closest to *SlWRKY7* (*Solanum lycopersicum*) with 96% similarity, and the similarity of a *WRKY* protein of tobacco was 86%. The protein-GST (glutathione-S-transferase) complex was obtained in *Escherichia coli* by using the method of prokaryotic expression. *StWRKY2*-GST could com-

收稿日期: 2014-02-26 修回日期: 2014-05-12

基金项目: 国家自然科学基金(31070244)

作者简介: 李立芹(1974-), 女, 山东东阿县人, 博士, 副教授, 从事马铃薯分子生物学研究, (E-mail)lilinqin88@163.com。

*通讯作者: 王西瑶, 博士, 教授, 从事马铃薯贮藏和分子生物学研究, (E-mail)wxyrtl@163.com。

bine W-box *in vivo* by Electrophoretic Mobility Shift Assay analysis, but only GST protein could not combine W-box. StWRKY2-GST combination with W-box could be competed by cold probe (unlabeled probe). And the experiment results also showed that StWRKY2-GST could not combine mutation W-box, this suggested StWRKY2-GST combined W-box with specificity. Analysis of StWRKY2 expression level in the root, stem and leaf tissue through the real-time fluorescence quantitative PCR, the results showed that the gene was mainly expressed in the root. Next was leaf and stem. In order to further study the possible function of the gene, potato seeding from tissue culture were treated under 10 $\mu\text{mol/L}$ low phosphorus, 10 $\mu\text{mol/L}$ low potassium, 200 mmol/L NaCl, 400 mmol/L PEG solution and 4 $^{\circ}\text{C}$ low-temperature treatment for 6 h, real-time fluorescence quantitative PCR showed that this gene expression level decreased significantly after low phosphorus treatment, expression of StWRKY2 increased significantly after 200 mmol/L NaCl and 400 mmol/L treatment. Expression level of StWRKY2 had no obvious change after low potassium and 4 $^{\circ}\text{C}$ low temperature treatment. The results indicated that StWRKY2 could in response to low phosphorus, NaCl and PEG three kinds of abiotic stresses. These results would lay a solid foundation for further study of potato WRKY2 gene function.

Key words: potato; WRKY; phylogeny; EMSA; expression pattern

WRKY 转录因子最初是从甘薯中发现的一类蛋白,当时命名为 SPF1 (Ishiguro *et al.*, 1994)。这类蛋白的特点是在其 N 端含有 60 个高度保守的 WRKY 结构域,其中包括一个十分保守的七肽 WRKYGQK,该结构域中还含有一类类似锌指的结构域。后来相继从其它植物例如欧芹、水稻、烟草、大麦和紫花苜蓿中也鉴定出了这种蛋白 (Cormack *et al.*, 2002; 郭泽建等, 2004; Hara *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2003; 陈婷婷等, 2012)。WRKY 蛋白参与植物的抗病性 (Li *et al.*, 2006)、代谢调控 (Xu *et al.*, 2004)、衰老 (Robatzek *et al.*, 2002) 和非生物逆境等生理过程 (Mare *et al.*, 2004; 江文波等, 2009)。拟南芥中 AtWRKY22 和 AtWRKY29 已被鉴定是 MAPK 信号途径的下游组分,参与细菌和真菌病原物的信号传导 (Wang *et al.*, 2004)。一些 WRKY 蛋白参与植物生长发育过程,例如拟南芥中 TTG2 编码一个 WRKY 转录因子 (即 AtWRKY44),该蛋白在表皮毛中高水平表达,该基因突变体叶表面毛状体的数量减少且没有分支 (Jonson *et al.*, 2002)。拟南芥 WRKY6 对低硼胁迫表现出敏感表型 (Ichiro *et al.*, 2010),说明该转录因子在硼胁迫生理过程中起到正调控作用。

马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 是目前世界上继水稻、玉米和小麦之后的第四大粮食作物,现已在世界各地广泛种植,马铃薯的适应性强,经济价值高,既可粮菜兼用,又能作为工业原料,因此马铃薯在我国乃至全球工农业生产中占有举足轻重地位。本研究首次报道克隆出马铃薯品种米拉 WRKY2 基因,序列分析表明该蛋白属于 WRKY 家族第二组成

员,锌指结构为 C-X₅-C-X₂₃-H-X-H,通过凝胶阻滞实验证明该蛋白在体外具有结合 DNA 的活性,同时利用实时荧光定量 PCR 研究其在低磷、低钾、高盐、PEG 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温处理共五种非生物逆境胁迫下的表达情况,这为今后深入研究该基因的功能奠定了坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试马铃薯品种米拉,由四川农业大学马铃薯研究中心提供。植物材料的处理是把 MS 培养基上生长 1 个月马铃薯组培苗置于相应处理的溶液和 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温中处理 6 h。大肠杆菌 DH5 α 和 BL21、DNA 凝胶回收纯化试剂盒购于天根科技 (北京) 有限公司; pMD19-T 克隆载体、ExTaq DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶购于 TaKaRa 公司 (大连)。

1.2 方法

1.2.1 提取马铃薯米拉总 RNA 和反转录 以组培苗的幼嫩叶片为材料,采用 Trizol 法提取总 RNA,然后反转录为 cDNA。反转录的反应体系为 10 μL ,在 DEPC 水处理过的小管中依次加入下列组分: Oligo dT 0.5 μL ; dNTP (20 mmol/L) 1 μL ; RNA 3 μg ; 补水至 6.5 μL 。65 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,迅速在冰上冷却至少 1 min,稍微离心,然后加入 5 \times First-Strand buffer 2 μL 、0.1 mol/L DTT 1 μL ; Super ScriptTM II RT 0.5 μL 。反应条件是 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 处理 15 min。反转录产物在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 扩增 WRKY2 基因 用同源序列克隆方法, 利用 Primer Premier 5.0 设计同源引物, 引物序列为 WRKY2-F (5'-GGATCCATGGCTGTAGACTTA-ATGACCA-3' 下划线处表示酶切位点, 下同) 和 WRKY2-R 引物 (5'-CCCGGGTTAAGAAGAT-TCAAGAACAT-3')。PCR 反应体系以 0.5 μ L cDNA 为模板, 加入 10 \times ExTaq 缓冲液 2.5 μ L (含 Mg^{2+}), WRKY2-F 和 WRKY2-R 各 0.5 μ L (10 μ mol/L), 20 mmol/L dNTP 0.5 μ L, ExTaq DNA 聚合酶 0.25 μ L (5 U/ μ L), 加水至 25 μ L。PCR 反应的条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 10 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 基因克隆及测序 扩增产物经电泳检测后, 回收目的片段, 然后与 pMD19-T 载体 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 然后在涂有氨苄青霉素的 LB 平板上进行培养过夜, 第二天挑取单克隆, 进行菌落 PCR 检测, 然后随机选取 3 个独立的阳性克隆进行测序 (上海 Invitrogen 生物工程技术服务有限公司)。

1.2.4 序列分析 基因的编码框用 NCBI 提供的在线 ORF Finder 寻找 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>); 核苷酸及氨基酸序列的同源序列搜索由 NCBI 提供的在线 BLAST 进行 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>); 系统演化树用 MEGA4 软件进行。

1.2.5 原核表达载体构建、目的蛋白诱导和纯化 利用引物 WRKY2-F 和 WRKY2-R 对测序正确的质粒进行 PCR 扩增并回收目的基因。通过双酶切和连接的方法把目的基因连接到 pGEX-4T-2 载体上, 然后利用原核表达方法进行目的蛋白表达, 采用谷胱甘肽-Sepharose 4B 珠子对目的蛋白进行纯化。采用 Bradford 法测定蛋白浓度, 纯化后蛋白冷冻干燥保存于冰箱待用。

1.2.6 凝胶阻滞实验 (EMSA) 将含有 W-box DNA 序 (CATAAGAGTTGACCTTGACCACTA) 和突变序列 (CATAAGAGTTCTCCTTCTCCACTA) 串联重复 3 次, 用化学合成的方法合成双链。凝胶阻滞实验按照 Light Shift Chemiluminescent EMSA Kit (Pierce) 试剂盒标准步骤进行。

1.2.7 马铃薯 WRKY2 基因的定量分析 对正常生长和五种胁迫处理的马铃薯幼苗采用 Trizol 法提

取总 RNA, 逆转录后获得 cDNA。采用同样的方法获得马铃薯幼苗根、叶和茎的 cDNA。然后利用荧光实时定量 PCR 技术对目的基因进行扩增, 检测 StWRKY2 在不同器官和不同处理后的表达情况。扩增正向引物为 (5'-TTCTCCGTCGCCGCGAC-3') 和反向引物为 (5'-TCATGCTAATAGCAGG-GACT-3')。以 EF1 α 作为内标基因, 扩增引物为 EF1 α F (5'-CCAGATTGGAAAACGGATAT-3') 和 EF1 α R (5'-CACCAGTTGGGTCCTTCTTG-3')。反应体系为 20 μ L, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 60 s, 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 目的基因的 PCR 扩增及克隆

以马铃薯组培苗 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 可见 1 条约为 1 kb 的条带 (图 1)。该条带回收纯化后, 与 pMD19-T 载体连接, 转化产物经过菌落 PCR 筛选后, 将获得阳性克隆送到生物公司进行测序。

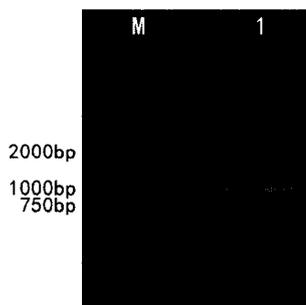


图 1 StWRKY2 基因扩增结果
M. 标记 2000; 1. PCR 产物。

Fig. 1 St WRKY2 PCR product
M. Marker 2000; 1. PCR product.

2.2 序列分析及系统进化树构建

序列分析结果表明, 该基因的开发阅读框为 1 065 bp, 编码 355 氨基酸。用 StWRKY2 的氨基酸序列在 NCBI 网站中的 Blast 进行在线比对, 从中选出同源性较高的 19 条氨基酸序列进行保守域分析, 并通过比对从中选择同源性较高的 WRKY 结构域进行作图, 结果表明克隆的 WRKY2 含有 1 个保守 WRKY 结构域, 其锌指结构模式为 C-X₅-C-X₂₃-H-X-H, 属于 WRKY 家族的第二组 (图 2)。同时根据这 20 个蛋白的氨基酸序列 (包括 StWRKY2) 构建系统发育树 (图 3)。分析发现, 该

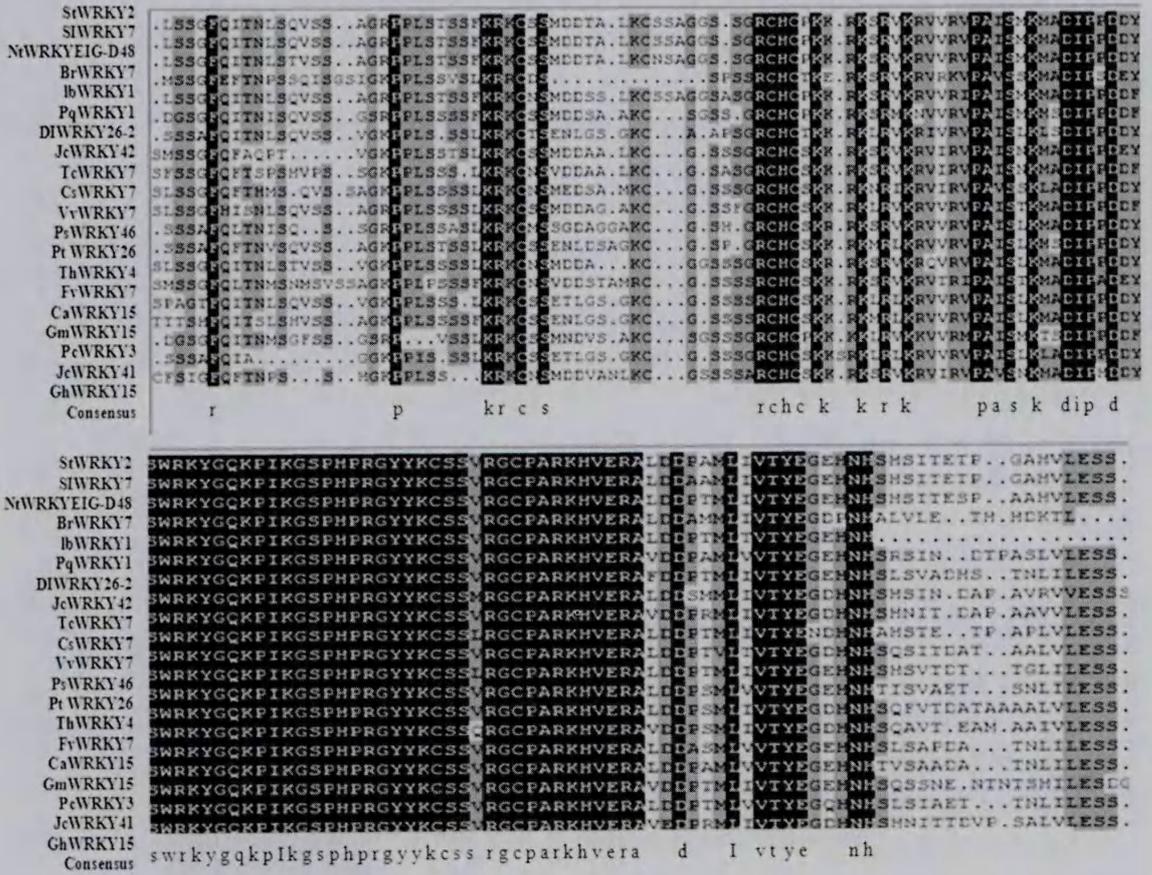


图 2 StWRKY2 蛋白与不同物种 WRKY 蛋白保守结构域比较 黑色阴影表示 20 个序列中均保守的 WRKY 结构域,其他根据保守程度高低依次使用深灰色和浅灰色阴影标示。一致的序列在下面列出,第一行代表的是 StWRKY2 蛋白。

Fig. 2 Conserved protein domain comparison between StWRKY2 and WRKY protein from other species Black shadow indicates WRKY conserved domain. According to the degree of conservation, dark gray and light gray are indicated. Consensus sequence is listed below, and the first line represents StWRKY6 protein.

蛋白与来自番茄的 WRKY7(XP_004238130.1)和烟草 WRKY EIG-D48 (BAB16432.1)聚为紧密一枝,说明它们的亲缘关系较近,它们的相似性依次为 96%和 86%。

2.3 凝胶阻滞实验 (EMSA)

凝胶阻滞实验 (EMSA)能证明转录因子与 DNA 结合的情况,本研究采用凝胶阻滞实验 (EMSA)分析了 StWRKY2 与 W-box 结合的情况,第 1 泳道加入 GST 蛋白和 DNA 片段,第 2 泳道加入 DNA 片段,前两个泳道未见阻滞条带;第 3 泳道加入 StWRKY2 和 DNA 片段,出现阻滞条带,结果表明 StWRKY2 能与 W-box 结合;第 4 泳道是在加入 StWRKY2 和 DNA 片段同时,加入 100 倍冷探针,结果表明 StWRKY2 与 W-box 结合能被冷探针所竞争,第 5 泳道加入 StWRKY2 和含有突变 W-box

DNA 片段,未见阻滞条带,说明该 StWRKY2 不能与突变的 W-box 结合,证明 StWRKY2 与 W-box 结合的特异性(图 4)。

2.4 基因的表达模式分析

通过实时荧光定量 PCR 实验表明,StWRKY2 在根、叶和茎器官中的表达量依次下降(图 5)。说明该基因在根中的表达量最高,这可能与该基因的生物功能相关。为了进一步研究该基因可能参与的生理功能,对马铃薯组培苗进行了 10 μmol/L 低磷、10 μmol/L 低钾、200 mmol/L NaCl、400 mmol/L PEG 溶液和 4℃ 低温处理,处理的时间为 6 h。然后对处理后基因的表达情况进行分析,结果表明与正常对照相比,该基因在 10 μmol/L 低磷处理 6 h 后表达量明显下降,与此相反,该基因在 200 mmol/L NaCl 和 400 mmol/L PEG 处理 6 h 后表

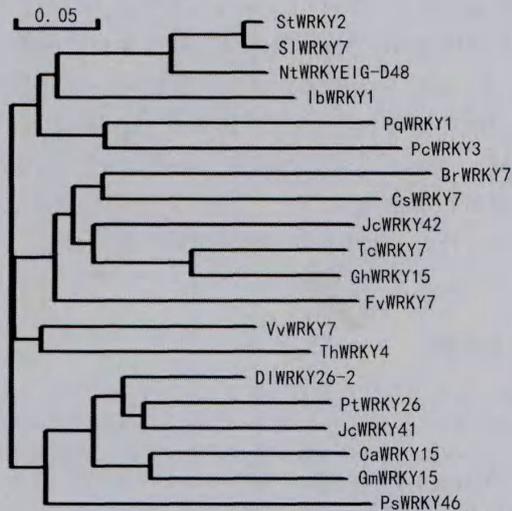


图 3 StWRKY2 与不同物种 WRKY 蛋白的系统演化分析 St. 马铃薯; Sl. 番茄; Nt. 烟草; Lb. 红薯; Pq. 西洋参; Pc. 欧芹; Br. 白菜; Cs. 黄瓜; Jc. 麻风树; Tc. 可可树; Gh. 棉花; Fv. 野草莓; Vv. 葡萄; Th. 刚毛怪柳; Dl. 龙眼; Pt. 三倍体毛白杨; Ca. 鹰嘴豆; Gm. 大豆; Ps. 罂粟。

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequence between PtWRKY2 and WRKY protein from other species St. *Solanum tuberosum*; Sl. *S. lycopersicum*; Nt. *Nicotiana tabacum*; Lb. *Ipomoea batatas*; Pq. *Panax quinquefolius*; Pc. *Petroselinum crispum*; Br. *Brassica rapa* sub sp. *pekinensis*; Cs. *Cucumis sativus*; Jc. *Jatropha curcas*; Tc. *Theobroma cacao*; Gh. *Gossypium hirsutum*; Fv. *Fragaria vesca* subsp. *vesca*; Vv. *Vitis vinifera*; Th. *Tamarix hispida*; Dl. *Dimocarpus longan*; Pt. (*Populus tomentosa* × *P. bolleana*) × *P. tomentosa*; Ca. *Cicer arietinum*; Gm. *Glycine max*; Ps. *Papaver somniferum*.

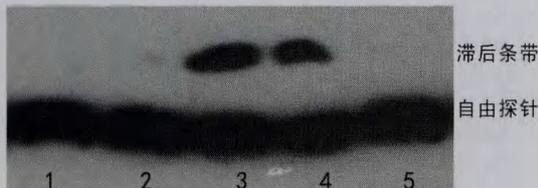


图 4 StWRKY2 与 W-box 结合的 EMSA 图谱 1. 加入 2 μ g GST 蛋白和 200ng DNA 片段(含有 W-box); 2. 加入 200 ng DNA 片段(W-box); 3. 加入 2 μ g StWRKY2-GST 和 200 ng DNA 片段(含有 W-box); 4. 加入 2 μ g StWRKY2-GST, 200 ng DNA 片段(W-box)和 100 倍冷探针; 5. 加入 2 μ g StWRKY2-GST 和 200 ng DNA 片段(含有突变 W-box)。

Fig.4 EMSA analysis of the bindings of StWRKY2 and W-box 1. Add 2 μ g GST and 200 ng W-box; 2. Add 100 ng W-box; 3. Add 2 μ g StWRKY2-GST and 200 ng W-box; 4. Add 2 μ g StWRKY2-GST, 200 ng W-box and 100 \times cold probe; 5. Add 2 μ g StWRKY2-GST and 200 ng mutated W-box.

达量明显升高,但是该基因在 10 μ mol/L 低钾和 4 $^{\circ}$ C 低温处理 6 h 后表达量与对照相比没有明显变化(图 6),初步判断它不响应这两种胁迫反应,或者该基因对于这两种胁迫响应可能需要更长的时间。

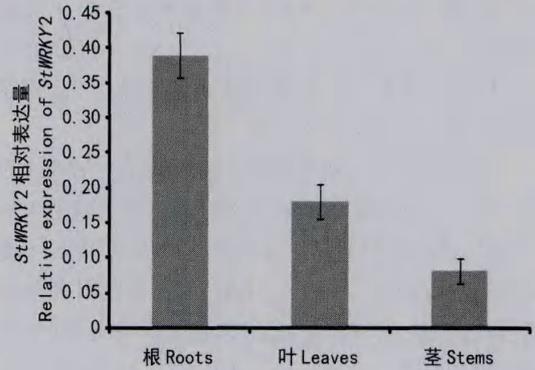


图 5 StWRKY2 基因在不同组织部位的表达模式
Fig. 5 Expression pattern of StWRKY2 in different parts

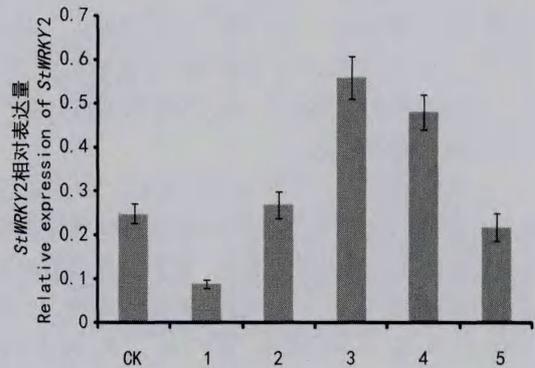


图 6 StWRKY2 在各种处理下(6 h)的表达模式 CK. 对照; 1. 10 μ mol/L 低磷处理; 2. 10 μ mol/L 低钾处理; 3. 200 mmol/L NaCl 处理; 4. 400 mmol/L PEG 处理; 5. 4 $^{\circ}$ C 处理。
Fig. 6 Expression pattern of StWRKY2 under different treatments (6 h) CK. Control; 1. 10 low phosphorus treatment; 2. 10 low potassium treatment; 3. 200 mmol/L NaCl treatment; 4. 400 mmol/L PEG treatment; 5. 4 $^{\circ}$ C treatment.

3 讨论

植物中 WRKY 蛋白根据所含有的结构域和锌指结构可以分成三组:第一组含 2 个 WRKY 结构域,锌指结构模式为 C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X-H;第二组和第三组均含 1 个 WRKY 结构域,第二组锌指结构模式与第一组相同;第三组仅在组成锌指的氨基酸有变化, C-X₇-C-X₂₂₋₂₃-H-X-C (Eulgem *et al.*, 2000)。通过氨基酸序列分析比对,本研究所克隆的 StWRKY2 蛋白属于第二组,系统发育树的结果表明 StWRKY2 和番茄 WRKY7 亲缘关系最近,氨基酸序列相似性达 96%,其次与烟草 WRKY EIG-D48 相似性达 86%。番茄 WRKY7 的功能至今未

见报道,烟草 WRKY EIG-D48 被报道是受到病原菌的诱导表达(Takemoto *et al.*, 2003)。因此推测 StWRKY2 可能与马铃薯的抗病性相关,但这还需要通过进一步相关实验证明。

转录因子通过结合到靶基因启动子上的顺式作用元件从而调节基因的转录,WRKY 转录因子中的 WRKY 结构域主要是结合顺式作用元件 W-box 部位(Eulgem *et al.*, 2000)。EMSA 实验是目前研究蛋白与 DNA 互作时应最广泛,而且具有简单、快速和灵敏的特点。Ciolkowski *et al.*(2008)研究了不同 W-box 侧翼序列对拟南芥中 5 个 WRKY 转录因子结合 W-box 的影响;Verk *et al.*(2011)研究证明 AtWRKY28 能结合到可能靶基因 ICS1(参与 SA 途径的基因)启动子上,从而调节该基因表达。本研究采用 EMSA 实验证明 StWRKY2 能够结合 W-box,而不能结合突变的 W-box,说明该蛋白具有转录因子的 DNA 结合活性。

本研究通过 RT-PCR 对 StWRKY2 的表达部位进行分析,发现其主要在根中表达,推测其可能参与马铃薯对非生物逆境的响应。实验结果表明该基因在低磷处理 6 h 后表达量明显降低,说明 StWRKY2 参与低磷胁迫反应。拟南芥中 AtWRKY6 通过抑制下游靶基因 *pho1* 的表达参与低磷胁迫反应,在拟南芥中过量表达 AtWRKY6 的植株表现出低磷敏感的表现型,因此 AtWRKY6 在这样的信号通路中作为一个负调控因子(Chen *et al.*, 2009)。StWRKY2 在 200 mmol/L NaCl 和 400 mmol/L PEG 处理后表达量明显升高,表明它响应这两种渗透胁迫。与病菌防御反应相关的 AtWRKY70 和 AtWRKY54 能够通过调节气孔开度进而参与拟南芥的渗透胁迫反应,这两个基因的双突变体能够增强对 PEG 胁迫的抗性(Li *et al.*, 2013)。与此类似的是与病原菌防御反应相关的小麦 WRKY10 表达水平在 PEG、NaCl、冷和 H₂O₂ 处理后迅速升高,在烟草中过量表达 TaWRKY10 可以提高转基因烟草对干旱和盐胁迫的抗性,说明 TaWRKY10 在这两种胁迫反应中起到正调控的作用(Wang *et al.*, 2013)。

马铃薯作为一种世界范围内重要的经济作物,相对于水稻、玉米和小麦比较而言,WRKY 转录因子的研究较少,第一个报道的 StWRKY1 在转录水平上是受到软腐病诱导表达(Dellagi *et al.*, 2000);马铃薯 WRKY6 基因已被克隆,该蛋白在大肠杆菌

中已成功表达(Li *et al.*, 2011);马铃薯 DNA 芯片数据表明 WRKY 转录因子参与菌根早期形成的过程,进一步研究表明该转录因子家族通过调节植物防卫相关的基因控制菌根的形成(Gallou *et al.*, 2012)。相信随着基因组学与分子生物学发展,越来越多马铃薯中 WRKY 转录因子功能将被阐述,这对于马铃薯中重要功能基因的鉴定和遗传育种工作具有重要意义。

参考文献:

- Chen TT(陈婷婷), Yang QC(杨青川), Ding W(丁旺), *et al.* 2012. Cloning and subcellular localization of a WRKY transcription factor gene of *Medicago sativa* (紫花苜蓿 WRKY 转录因子基因的克隆与亚细胞定位)[J]. *Acta Pratac Sin*(草业学报), **21**(4): 159-167
- Chen YF, Li LQ, Xu Q, *et al.* 2009. The WRKY6 transcription factor modulates PHOSPHATE1 expression in response to low Pi stress in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, **21**(11): 3 554-3 566
- Ciolkowski I, Wanke D, Birkenbihl RP, *et al.* 2008. Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function[J]. *Plant Mol Biol*, **68**(2): 81-92
- Cormack RS, Eulgem T, Rushton PJ, *et al.* 2002. Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1 576**(1-2): 92-100
- Dellagi A, Helibronn J, Avrova AO, *et al.* 2000. A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression [J]. *Mol Plant Microb Interact*, **13**(10): 1 092-1 101
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, *et al.* 2000. The WRKY superfamily of plant transcriptional factors[J]. *Trends Plant Sci*, **5**(5): 199-206
- Gallou A, Declerck S, Cranenbrouck S. 2012. Transcriptional regulation of defence genes and involvement of the WRKY transcription factor in *Arbuscular mycorrhizal* potato root colonization [J]. *Funct Integr Genom*, **12**(1): 183-198
- Guo ZJ(郭泽建), Kan YC(阚云超), Chen XJ(陈旭君), *et al.* 2004. Characterization of a rice WRKY gene whose expression is induced upon pathogen attack and mechanical wounding(一种转录受病原物接种和机械创伤诱导的水稻 WRKY 基因的鉴定)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **46**(8): 955-964
- Hara K, Yaq M, Kusano T, *et al.* 2000. Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding[J]. *Mol Genet Genomics*, **263**(1): 30-37
- Ichiro K, Yoko ID, Masami YH, *et al.* 2010. WRKY6 is involved in the response to boron deficiency in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Physiol Plant*, **139**(1): 80-92
- Ishiguro S, Nakamura K. 1994. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 50 upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato[J]. *Mol Genet Genomics*, **244**(6): 563-571
- Jang WB(江文波), Yu DQ(余迪求). 2009. *Arabidopsis* WRKY2

- transcription factor may be involved in osmotic stress response (拟南芥 WRKY2 转录调控因子可能参与调控渗透胁迫反应)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **31**(5):427-432
- Jonson CS, Kolevski B, Smyth DR. 2002. TRANSPARENT TESTA GLA-BRA 2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encode a WRKY transcription factor [J]. *Plant Cell*, **14**(6):1 359-1 375
- Li J, Besseau S, Toronen P, et al. 2013. Defense-related transcription factors WRKY70 and WRKY54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatal aperture in *Arabidopsis* [J]. *New Phytol*, **7**(1):1-16
- Li J, Brader G, Kariola T, et al. 2006. WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defence [J]. *Plant J*, **46**(3):477-491
- Li LQ(李立芹), Huang YB(黄玉碧), Wang XY(王西瑶). 2011. Cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of the WRKY6 of potato(马铃薯 WRKY6 基因的克隆、序列分析与原核表达研究)[J]. *Acta Pratac Sin*(草业学报), **20**(2): 177-183
- Robatzek, Somssich IE. 2002. Targets of *At*WRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense [J]. *Genes Dev*, **16**(9):1 139-1 149
- Sun CX, Palmqvist S, Olsson H, et al. 2003. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso 1 promoter [J]. *Plant Cell*, **15**(9):2 076-2 092
- Takemoto D, Yoshioka H, Doke N, et al. 2003. Disease stress-inducible genes of tobacco expression profile of elicitor-responsive genes isolated by subtractive hybridization [J]. *Physiol Plant*, **118**(4):545-553
- Mare C, Mazzucotelli E, Crosatti C, et al. 2004. Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold and drought response in barley [J]. *Plant Mol Biol*, **55**(3):399-416
- Verk MC, Bol JF, Linthost HJ. 2011. WRKY transcription factors involved in activation of SA biosynthesis genes [J]. *BMC Plant Biol*, **19**(11):89-111
- Xu YH, Wang JW, Wang S, et al. 2004. Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene(+)- δ -cadinene synthase-A [J]. *Plant Physiol*, **135**(1):507-515
- Wang C, Deng P, Chen L, et al. 2013. A Wheat WRKY transcription factor TaWRKY10 confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic tobacco [J]. *PLoS One*, **8**(6):1-13
- Wang J, Zhang S, Stacey G. 2004. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in *Arabidopsis* by chitin [J]. *Mol Plant Pathol*, **5**(2):125-135

(上接第 419 页 Continue from page 419)

- Sonneveld T, Tobutt KR, Robins TP. 2003. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers [J]. *Theor Appl Genet*, **107**: 1 059-1 070
- Sonneveld T, Robbins TP, Boskovic R, et al. 2001. Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection [J]. *Theor Appl Genet*, **102**:1 046-1 055
- Tao R, Yamane H, Sugiura A. 1999. Molecular Typing of S-alleles through identification characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry [J]. *Am Soc Hortic Sci*, **24**(3):224-233
- Verdoort L, Van Haute A, Goderis IJ, et al. 1998. Use of multi-allelic self-incompatibility gene in apple to assess homozygosity in shoots obtained through haploid induction [J]. *Theor Appl Genet*, **96**:294-300
- Williams W, Brown AG. 1956. Genetic response to selection in cultivated plants: gene frequencies in *Prunus avium* [J]. *Heredity*, **10**:237-245
- Xue Y, Carpenter R, Dickinson HG, et al. 1996. Origin of allelic diversity in *Antirrhinum* S-locus RNases [J]. *Plant Cell*, **8**:805-814
- Zhang XM(张晓明), Wang HX(王鸿霞), et al. 2007. Sweet cherry S genotype PCR identification technology(甜樱桃 S 基因型 PCR 鉴定技术研究)[J]. *J Fruit Sci*(果树学报), **24**(4):466-471
- Zhou J(周杰). 2008. Analysis of sweet cherry varieties S genotype identification and genetic diversity(甜樱桃品种 S 基因型鉴定及遗传多样性分析)[D]. Tai'an(泰安); Shandong Agricultural University(山东农业大学)