

李元元,高志强,曹清河. 甘薯 SPF1 转录因子的生物信息学分析[J].江苏农业学报,2017,33(4):760-767.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.04.006

## 甘薯 SPF1 转录因子的生物信息学分析

李元元<sup>1</sup>, 高志强<sup>2</sup>, 曹清河<sup>1</sup>

(1.江苏省徐州市农业科学院,江苏 徐州 221121; 2.江苏师范大学药用植物生物技术省级重点实验室,江苏 徐州 221116)

**摘要:** WRKY 蛋白是一类植物特有的转录因子超家族,SPF1 是第一个从植物(高系 14)中克隆的 WRKY 家族基因。借助生物信息学手段,对甘薯 SPF1 蛋白组成、结构和功能进行分析预测。结果表明,SPF1 编码蛋白含有丰富的丝氨酸位点,并含有 2 个 WRKY 保守结构域,分别带有 CX<sub>4</sub>CX<sub>22</sub>HXX 和 CX<sub>4</sub>CX<sub>23</sub>HXX 锌指结构,分别形成 4 个和 5 个  $\beta$ -折叠片。SPF1 和甘薯祖先种 *Ipomoea trifida* WRKY 结构域均具有非常保守的 WRKYG (Q/K) K 氨基酸序列,并且 C 端 WRKY 结构域的保守性比 N 端 WRKY 结构域的低。系统进化树分析结果显示,蛋白 N 端和 C 端的 WRKY 结构域分属 2 个不同的分支。蛋白结构预测结果显示,SPF1 WRKY 结构区(204~445 aa)处于蛋白三维结构的内侧,形成非亲水性靶标 DNA 结合区。SPF1 作为转录因子,在调控细胞核基因表达的同时,其蛋白 N 端序列具有叶绿体定位功能。推测 SPF1 可能参与细胞核和叶绿体的基因表达调控。

**关键词:** 甘薯; SPF1; 转录因子; WRKY 结构域

**中图分类号:** S531.032 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)04-0760-08

## Bioinformatics analysis of SPF1 transcription factors from sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]

LI Yuan-yuan<sup>1</sup>, GAO Zhi-qiang<sup>2</sup>, CAO Qing-he<sup>1</sup>

(1. Institute of Agricultural Sciences of Xuzhou, Xuzhou 221121, China; 2. The Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant of Jiangsu Province, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China)

**Abstract:** WRKY protein is a kind of plant specific transcription factor superfamily, and SPF1 is the first cloned WRKY gene from sweet potato (Kokei No.14). Using Bioinformatics tools, the protein structure and function of SPF1 were analyzed. SPF1 protein is rich in serine amino acids and contains two WRKY domains harbouring CX<sub>4</sub>CX<sub>22</sub>HXX and CX<sub>4</sub>CX<sub>23</sub>HXX zinc finger structures respectively, finally forming four and five  $\beta$ -sheets. The WRKY domains in SPF1 of Kokei No.14 and sweet potato ancestor *Ipomoea trifida* had highly conservative WRKYG (Q/K) K amino acid sequence, and C terminus presented relatively lower conservation than N terminus did. Phylogenetic analysis revealed that the WRKY domain in termini N and C belonged to two different branches. The two WRKY domains(204~445 aa) in SPF1 were located inside of the protein three-dimensional structure where the non-hydrophilic target DNA was bound. As a transcription factor, SPF1 might be involved in the regulations of nuclear and chloroplast genes expression.

**Key words:** sweet potato; SPF1; transcription factor; WRKY domain

收稿日期:2016-12-31

基金项目:徐州市农业科学院科研基金项目(2015005)

作者简介:李元元(1986-),女,江苏沛县人,硕士,助理研究员,研究方向为植物生物技术。(Tel)0516-82189590;(E-mail)li\_yy2016@126.com

甘薯,又名番薯,属于双子叶植物纲(Dicotyledoneae)管花目(Tubiflorae)旋花科(Convolvulaceae)

番薯属(*Ipomoea*)番薯(*I. batatas*),是世界上排名第7的重要粮食作物。全世界每年生产约  $1.04 \times 10^8$  t 甘薯,其中中国生产约  $8.5 \times 10^7$  t,属于甘薯生产大国<sup>[1]</sup>。甘薯是六倍体( $2n=6 \times=90$ )作物,具有较大的基因组(2 205 Mb)和复杂的遗传背景(异交习性),相比水稻(389 Mb)等其他粮食作物,甘薯的基因组测序、传统基因/QTL 定位、基因克隆和功能研究相对比较困难,而通过甘薯转录组测序技术<sup>[2-3]</sup>和简单、高效、低投入的基因编辑技术 CRISPR-Cas9<sup>[4]</sup>可以快速发掘、鉴定甘薯重要的农艺性状和抗性相关基因。

WRKY 蛋白是开花植物特有的一类转录因子超家族,因其 N 端或 C 端含有 WRKY 高度保守的氨基酸序列而得名。WRKY 家族基因在植物的生长发育以及植物和环境的相互作用中具有重要调控功能<sup>[5]</sup>。例如,*AtWRKY12* 和 *AtWRKY13* 可以调控拟南芥花期<sup>[6]</sup>,*Dlf1* 能同时调控水稻花期和株高<sup>[7]</sup>,*WRKY46* 和 *WRKY75* 调控侧根和根毛发育<sup>[8-9]</sup>,*WRKY* 基因参与植物的持绿性<sup>[10]</sup>和叶片衰老<sup>[11]</sup>等性状的调控。在植物营养与代谢方面,*OsWRKY74*<sup>[12]</sup>和 *WRKY42*<sup>[13]</sup>分别促进水稻和拟南芥磷元素的吸收利用和植物铁元素的利用<sup>[14]</sup>以及具有药用价值次生代谢物的调控<sup>[15]</sup>等。在提高植物的抗病性方面,SHEN 等报道了在大麦白粉病抗性途径中,免疫受体蛋白 MLA10 和 WRKY 在核内相互作用,通过调控不同的 PAMP 病原菌信号途径来增强作物抗病性<sup>[16]</sup>。LE ROUX 等报道了拟南芥中病原菌通过表达乙酰转移酶(*PopP2*)靶标植物体内的 WRKY 转录因子,使其 C 端 WRKY 结构域中关键的赖氨酸乙酰化,破坏 WRKY 和 DNA 的结合能力,导致 WRKY 不能激活相应的植物抗病途径,使植物失去抗病性<sup>[17]</sup>。所以植物 WRKY 转录因子超家族通过蛋白和 DNA 以及蛋白和蛋白间的相互作用,介导不同的信号网络以调节植物各种生物学过程。

目前,甘薯祖先种 *I. trifida* 基因组已测序,对 *I. trifida* 自交系 Mx23Hm 和高度杂合系 0431-1 进行基因组测序,发现其基因组大小分别为 513 Mb 和 712 Mb,分别预测出 62 407 个和 109 449 个基因<sup>[18]</sup>。ISHIGURO 等(1994)从植物中克隆了第一个 WRKY 转录因子家族基因 *SPF1*,其来自普通栽培甘薯高系 14,*SPF1* 调控贮藏蛋白和  $\beta$ -淀粉酶的基因功能<sup>[19]</sup>,但到目前为止,普通栽培甘薯的 WRKY 家族基因很

少被分析和研究。本研究拟利用生物信息学分析方法,结合已有甘薯祖先种 *I. trifida* 的 WRKY 序列,对甘薯 SPF1 蛋白的结构和功能、氨基酸组成和特点进行预测分析,以期对甘薯 WRKY 家族基因的生物学功能研究,以及 WRKY 基因在种内和种间的进化提供重要依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

在 NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中检索甘薯 *SPF1* 基因的核酸与蛋白序列,*SPF1* 基因编码蛋白序列 GenBank BAA06278.1,其 cDNA 序列 GenBank D30038.1。在 Plant Transcription Factor Database(V4.0)数据库<sup>[20]</sup>中下载甘薯祖先种 *I. trifida* 的 80 个 WRKY 转录因子家族基因的蛋白序列。

### 1.2 方法

1.2.1 *SPF1* 基因功能域和基因家族分析 采用 NCBI 的 Conserved Domains 数据库<sup>[21]</sup>和 Prosite 数据库的在线生物信息分析软件 ScanProsite<sup>[22]</sup>对甘薯 *SPF1* 基因编码的氨基酸序列进行结构域和基因家族类型分析。利用 ScanProsite 提取 SPF1 和 *I. trifida* WRKY 转录因子(I<sub>t</sub>WRKY1~80)蛋白序列中的 WRKY 结构域,用后缀 1、2 区别同一基因编码蛋白中 N 端和 C 端的 WRKY 结构域。利用在线生物信息分析软件 WebLogo<sup>[23]</sup>(Version 2.8.2)分析比较 IbSPF1 和 I<sub>t</sub>WRKY1~80 蛋白序列 WRKY 结构域中保守的氨基酸位点。采用邻接法<sup>[24]</sup>并利用 MEGA7<sup>[25]</sup>软件构建 WRKY 结构域系统进化树,采用 p-distance 法<sup>[26]</sup>计算进化距离,利用 bootstrap 法<sup>[27]</sup>重复检验 1 500 次。

1.2.2 *SPF1* 蛋白一级和二级结构的分析 基于 WebLab<sup>[28]</sup>分析平台,利用 pepstats(v6.0.1)软件对 SPF1 蛋白的氨基酸组成和特点进行统计,采用 octanol(v6.0.1)软件分析 SPF1 蛋白的亲水性,然后利用在线生物信息分析软件 Scansite<sup>[29]</sup>分析 SPF1 的磷酸化位点,最后利用在线生物信息分析软件 PredictProtein<sup>[30]</sup>分析 SPF1 蛋白结构特点。

1.2.3 *SPF1* 蛋白三级结构和功能分析 利用 Ex-PaSy 数据库中的在线生物信息分析软件 Swiss-Model 对 SPF1 蛋白进行蛋白三级结构同源建模。首先寻找相似性较高的模板,选择 2ayd.1 的 N 端和 C 端

三级结构模型作为模板,然后分别对 SPF1 蛋白进行同源建模,模型建立后保存模型文件为 PDB 格式,最后利用 Swiss-PdbViewer4.0.1<sup>[31]</sup> 软件对模型的三维结构进行显示并分析。

1.2.4 SPF1 转录因子功能分析 利用在线生物信息分析软件 STITCH<sup>[32]</sup> 和 STRING<sup>[33]</sup> 分析 SPF1 蛋白在拟南芥和水稻中相似性最高的同源蛋白,然后依据同源蛋白已有试验数据预测蛋白间或蛋白与功能化合物间的相互作用网络,从而推断被预测蛋白可能具有的信号途径和生物学功能。选取甘薯部分已知功能基因的启动子序列,利用在线生物信息分析软件 JASPAR database 分析其可能具有的 WRKY 结构域靶标位点。

## 2 结果与分析

### 2.1 SPF1 蛋白结构域与基因家族

对比 NCBI 的 Conserved Domains 数据库和 Ex-PaSy 的 Prosite 数据库中 SPF1 蛋白序列数据,发现

其属于 WRKY 转录因子家族,编码蛋白含有 2 个 WRKY 结构域,分别含有 CX<sub>4</sub>CX<sub>22</sub>HXX 和 CX<sub>4</sub>CX<sub>23</sub>HXX 锌指结构。其中 Conserved Domains 分析结果为 210~265 aa 和 385~442 aa,Prosite 分析结果为 204~268 aa 和 380~445 aa。在 Plant Transcription Factor Database(V4.0)数据库中共收录 WRKY 家族基因 14 549 个,其中 80 个来自甘薯祖先种 *I. trifida* (*ItWRKY1*~80),其编码蛋白序列长度为 118~750 aa。15 个甘薯祖先种 WRKY 家族基因编码蛋白含有 2 个 WRKY 结构域,其氨基酸序列长度为 439~750 aa。

采用 WebLogo(Version 2.8.2)在线分析平台分析比较了 *SPF1* 和 *ItWRKY1*~80 基因编码蛋白 N 端和 C 端 WRKY 结构域(图 1)。甘薯 WRKY 基因编码蛋白 N 端和 C 端的 WRKY 结构域均具有非常保守的 WRKYG(Q/K)K 序列,相比蛋白 C 端的 WRKY 结构域,N 端 WRKY 结构域的保守氨基酸位点更多,与目前所发现的 C 端 WRKY 结构域行使主要生物学功能且具有功能多样性的结果相一致。

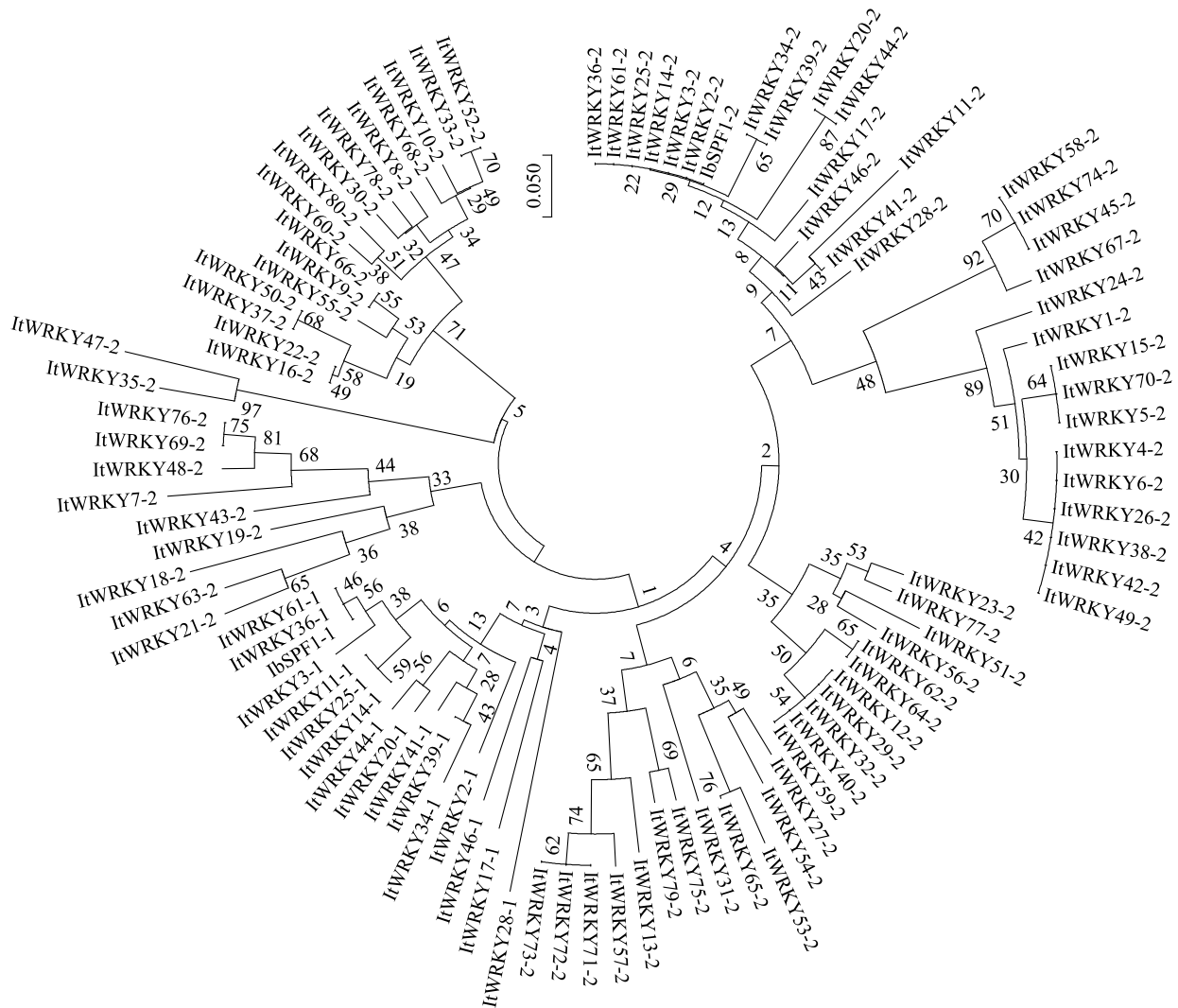


图 1 WebLogo 分析 *SPF1* 和 *ItWRKY1*~80 基因编码蛋白 WRKY 结构域保守的氨基酸位点

Fig.1 WebLogo analysis of conservative amino acids in WRKY domain encoded by *SPF1* and *ItWRKY1*~80

通过 MEGA7 构建的系统进化树(图 2)显示,*SPF1* 和 *ItWRKY1*~80 的 N 端和 C 端 WRKY 结构域分属不同分支,相比蛋白 N 端的 WRKY 结构域,C 端的 WRKY 结构域可以分成 4 大类,每一类下面可以继续分成不同的亚类,所以甘薯 WRKY 转录因子 C 端的 WRKY 结构域具有更多的生物学功能,与 WebLogo 分析的 WRKY 结构域

保守性结果相一致。通过比较栽培种和祖先种 WRKY 家族基因编码蛋白 N 端和 C 端的 WRKY 结构域,发现高系 14 *SPF1* N 端的 WRKY 结构域 IbSPF1-1 与 *ItWRKY61*-1、*ItWRKY36*-1 相似性较高。高系 14 *SPF1* C 端的 WRKY 结构域 IbSPF1-2 与 *ItWRKY36*-2、*ItWRKY61*-2、*ItWRKY25*-2、*ItWRKY14*-2、*ItWRKY3*-2、*ItWRKY2*-2 具有很高的



-1;N 端 WRKY 结构域;-2:C 端 WRKY 结构域。

图 2 SPF1 和 ItWRKY1~80 WRKY 结构域系统进化树

Fig.2 Phylogenetic analysis of WRKY domain in SPF1 and ItWRKY1~80

相似性。所以 WRKY 基因在甘薯祖先种和栽培种中存在一定的基因进化关系。

## 2.2 SPF1 蛋白的一级结构和二级结构

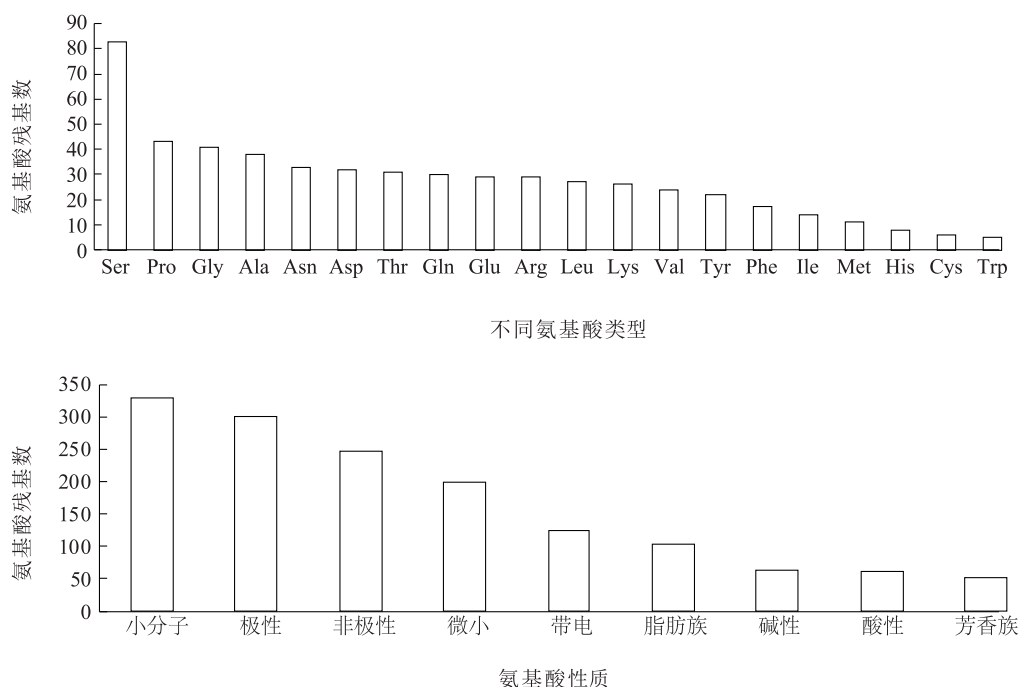
在 WebLab 生物信息综合分析平台上,采用 Pepstats(v6.0.1)软件统计 SPF1 的蛋白序列,其分子量为 59 694.98,等电点为 6.136 8,各种氨基酸统计结果如图 3 显示。在 SPF1 的氨基酸组成中,丝氨酸含量最高,具有 83 个氨基酸残基。图 3 显示,小分子氨基酸的残基数为 331,极性氨基酸的残基数为 301,非极性氨基酸的残基数为 248,微小氨基酸的残基数为 199,带电氨基酸的残基数为 124,脂肪族氨基酸的残基数为 103,碱性氨基酸的

残基数为 63,酸性氨基酸的残基数为 61,芳香族氨基酸的残基数为 52。Octanol (v6.0.1)软件可以显示 SPF1 蛋白序列的 White-Wimley 亲水性图(图 4),发现 SPF1 蛋白序列 220~460 aa 区域亲水性较低。

## 2.3 SPF1 蛋白结构与功能预测

利用在线分析软件 PredictProtein 分析 SPF1 蛋白的序列结构(图 5A),发现在蛋白序列的 N 端有  $\alpha$  螺旋,在 2 个 WRKY 结构域区间具有不同长度的  $\beta$  折叠片,同时发现 WRKY 结构域(204~445 aa)在蛋白三维结构中处于蛋白的内侧,与 SPF1 蛋白具有较低亲水性的区域(图 4)相类似。





Ser:丝氨酸;Pro:脯氨酸;Gly:甘氨酸;Ala:丙氨酸;Asn:天冬酰胺;Asp:天冬氨酸;Thr:苏氨酸;Gln:谷氨酰胺;Glu:谷氨酸;Arg:精氨酸;Leu:亮氨酸;Lys:赖氨酸;Val:缬氨酸;Tyr:酪氨酸;Phe:苯丙氨酸;Ile:异亮氨酸;Met:甲硫氨酸;His:组氨酸;Cys:半胱氨酸;Trp:色氨酸。

图3 SPF1 不同氨基酸性质和氨基酸类型统计

Fig.3 Statistics of SPF1 amino acids

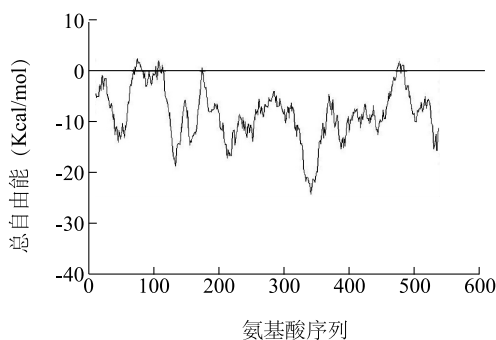


图4 SPF1 蛋白 White-Wimley 亲水性图

Fig.4 White-Wimley hydrophilic plot of SPF1

利用在线分析软件 Swiss-Model 进行同源建模和三级结构预测(图 5B),发现在 SPF1 蛋白的 N 端可以构建 4 个  $\beta$  折叠片结构,C 端可以构建 5 个  $\beta$  折叠片结构,与图 5A 预测二级结构的结果相类似。其中 WRKY 结构域的 4 个保守氨基酸位点 W、R、K、Y 分别位于 N 端 WRKY 结构域第 1 个  $\beta$  折叠片和 C 端 WRKY 结构域第 2 个  $\beta$  折叠片(图 5B)。三维结构显示 WRKY 保守氨基酸位点主要在 WRKY 结构域外侧,可能与其靶标 DNA 发挥生物学功能有

一定关系。

利用在线分析网站 STITCH 和 STRING 对 SPF1 可能具有的生物学功能进行分析。SPF1 与拟南芥的 AtWRKY33 具有 50% 的序列相似性,以 AtWRKY33 作为功能预测蛋白,发现其与植物抗病虫害有关的 MKS1 (MAP kinase substrate 1)、SIB1 (Sigma factor binding protein 1),与非生物逆境相关的 CZF1 (Zinc finger CCCH domain-containing protein)、STZ (Salt tolerance zinc finger),与乙烯反应相关的 ERF104 (Ethylene response factor 104),植物 C/N 平衡相关的 CNI1 (Carbon/nitrogen insensitive 1)、MPK3 (Mitogen-activated protein kinase 3) 和 MPK4 (Mitogen-activated protein kinase 4) 等相互作用(图 5C)。

利用在线分析软件 iPSORT 对 SPF1 蛋白序列 N 端 30 个氨基酸区域具有的叶绿体定位功能进行进一步预测,采用在线分析软件 TargetP 1.1 预测 SPF1 蛋白定位在叶绿体的分值 0.886,定位在线粒体的分值 0.015。根据甘薯叶绿体基因组测序结果<sup>[3]</sup>,选取差异表达的 *psaA* (Gene ID: 23764561)、*psbI* (Gene ID: 23764533)、*petB* (Gene ID:

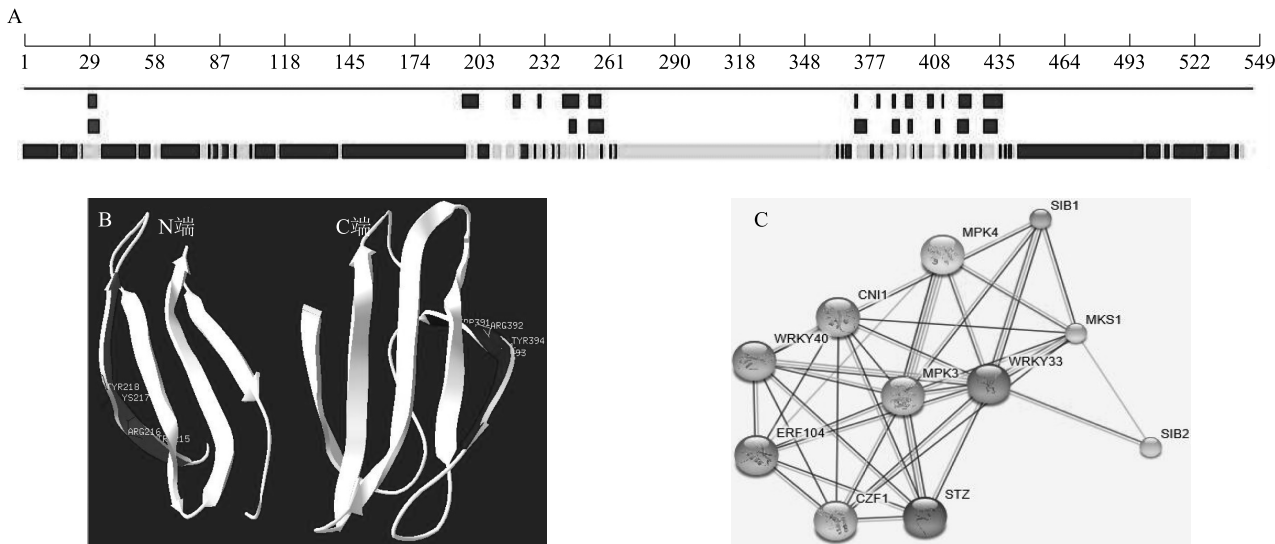
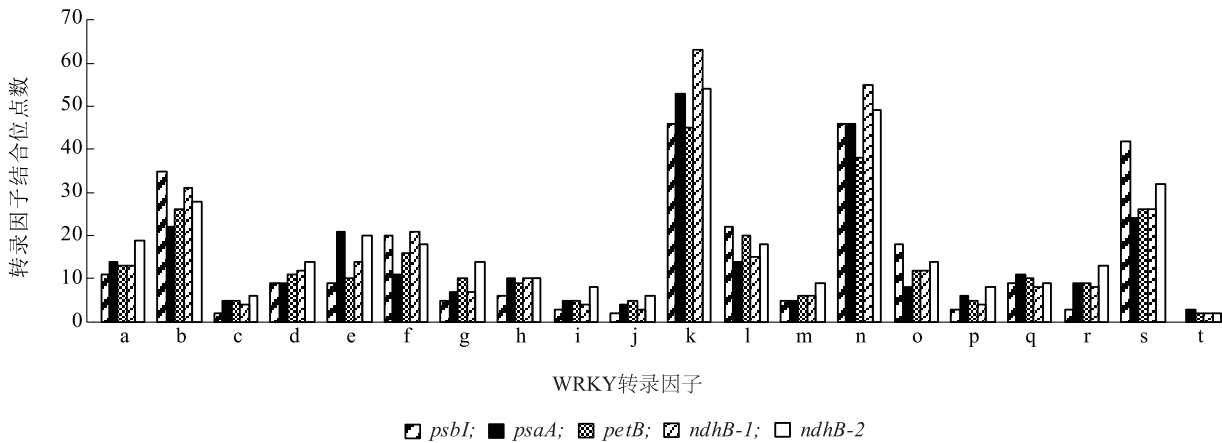


图 5 甘薯 SPF1 蛋白结构与功能预测  
Fig.5 Structure and function analysis of protein SPF1 in sweet potato

23764601)、*ndhB* (Gene ID: 23764617、23764655), 其基因的启动子序列大小为 2 000 bp, 利用软件 JASPAR database 分析发现其含有不同的 WRKY 基

因结合位点(图 6), 推测 *SPF1* 可能对细胞核和叶绿体基因均有调控功能, 需要结合试验验证。



a; WRKY2; b; WRKY8; c; WRKY12; d; WRKY15; e; WRKY18; f; WRKY21; g; WRKY23; h; WRKY25; i; WRKY30; j; WRKY38; k; WRKY40; l; WRKY43; m; WRKY45; n; WRKY48; o; WRKY57; p; WRKY60; q; WRKY62; r; WRKY63; s; WRKY75; t; ZAP1。

图 6 甘薯叶绿体基因启动子区 WRKY 结合位点统计  
Fig.6 Number of binding site of WRKY with chloroplast gene promoter in sweet potato

3 讨论

*SPF1* 基因是第一个从植物中克隆的 WRKY 转录因子家族基因, 来自普通栽培甘薯高系 14。SPF1 编码蛋白含有 549 个氨基酸, 2 个 WRKY 保守结构

域, 分别含有 CX<sub>4</sub>CX<sub>22</sub>HXH 和 CX<sub>4</sub>CX<sub>23</sub>HXH 锌指结构。甘薯栽培种高系 14 SPF1 与甘薯祖先种 *I. trifida* ItWRKY1~80 的 N 端和 C 端 WRKY 结构域含有不同的保守氨基酸位点, 但 2 个 WRKY 结构域含有非常保守的 WRKYG (Q/K) K 序列。SPF1 和 It-

WRKY1~80 的系统进化树分析结果表明,N 端和 C 端的 WRKY 结构域分属 2 个不同分支,其中 C 端的 WRKY 结构域又可以划分成 4 类不同的亚类,可能与 WRKY 转录因子 C 端 WRKY 结构域所具有的各种生物学功能有一定关系。SPF1 蛋白结构分析结果表明,N 端和 C 端 WRKY 结构域分别形成 4 个和 5 个  $\beta$  折叠片,并且 2 个 WRKY 结构区域在整个蛋白结构中折叠到蛋白内侧,这与蛋白的非亲水性预测结果相一致,具有靶标 DNA 的作用。

WRKY 转录因子在植物响应和适应各种环境胁迫时具有重要调节功能,随着基因组测序技术在各种植物中的应用,除了模式植物拟南芥和水稻<sup>[34]</sup>外,其他植物 WRKY 家族基因也在被系统地分析和鉴定<sup>[35-38]</sup>。在 NCBI 中采用 BlastP 在线分析软件对 SPF1 进行比对,选取相似性较高(>60%)的同源蛋白,选取其中 21 条蛋白序列进行多序列比对,发现其他物种具有 2 个、3 个或更多的保守性 WRKY 结构域。前人研究发现不同物种间 WRKY 结构域的串联重复和片段重复在 WRKY 家族基因的遗传进化中起重要作用<sup>[34,36]</sup>。WRKY 转录因子超家族成员一般通过结合靶标基因启动子区的 W-box 来调节下游基因的表达<sup>[39]</sup>,同时 WRKY 还会被 MAPK 磷酸化<sup>[40]</sup>,结合 14-3-3 蛋白<sup>[41]</sup>等发挥各种生物学功能。所以 SPF1 含有丰富的丝氨酸位点特性,随后在 Scansite 在线系统中发现 SPF1 可以被 GSK、MAPK3、PDK 等磷酸化,使 SPF1 具有很多潜在的生物学功能,需要后续鉴定。

综上所述,甘薯作为六倍体作物,基因组遗传背景复杂,基因组很大,所以甘薯基因组测序和基因功能研究工作非常困难。随着转录组测序技术在甘薯重要农艺性状相关基因发掘中的应用,以及基因编辑技术 CRISPR-Cas9<sup>[4]</sup>的出现,可以通过转录组测序去挖掘甘薯 WRKY 家族基因,以及克隆 WRKY 基因(如 *SPF1*)进行基因定向敲除来研究基因的功能,从而快速鉴定甘薯 WRKY 家族基因可能参与调控的重要农艺性状和抗病虫害特性。本研究的发现可以为 *SPF1* 等甘薯 WRKY 家族基因的后续生物学功能研究,以及 WRKY 基因在甘薯种内和种间的遗传进化研究奠定基础。

#### 参考文献:

[1] FAOSTAT. Food and agriculture organization of the United Na-

tions, production statistics [EB/OL]. [2016-12-16]. <http://faostat3.fao.org/home/index.html>.

- [2] GU Y H, TAO X, LAI X J, et al. Exploring the polyadenylated RNA virome of sweet potato through high-throughput sequencing [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98884.
- [3] YAN L, LAI X, LI X, et al. Analyses of the complete genome and gene expression of chloroplast of sweet potato [*Ipomoea batata*] [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0124083.
- [4] BOETTCHER M, MCMANUS M T. Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR [J]. Molecular Cell, 2015, 58(4): 575-585.
- [5] PHUKAN U J, JEENA G S, SHUKLA R K. WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7:760.
- [6] LI W, WANG H, YU D. Arabidopsis WRKY transcription factors WRKY12 and WRKY13 oppositely regulate flowering under short-day conditions [J]. Molecular Plant, 2016, 9(11): 1492-1503.
- [7] CAI Y, CHEN X, XIE K, et al. Dlf1, a WRKY transcription factor, is involved in the control of flowering time and plant height in rice [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102529.
- [8] DING Z J, YAN J Y, LI C X, et al. Transcription factor WRKY46 modulates the development of *Arabidopsis* lateral roots in osmotic/salt stress conditions via regulation of ABA signaling and auxin homeostasis [J]. The Plant Journal, 2015, 84(1): 56-69.
- [9] RISHMAWI L, PESCH M, JUENGST C, et al. Non-cell-autonomous regulation of root hair patterning genes by WRKY75 in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2014, 165(1): 186-195.
- [10] THOMAS H, OUGHAM H. The stay-green trait [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(14): 3889-3900.
- [11] HAN M, KIM C Y, LEE J, et al. OsWRKY42 represses OsMT1d and induces reactive oxygen species and leaf senescence in rice [J]. Molecules and Cells, 2014, 37(7): 532-539.
- [12] DAI X, WANG Y, ZHANG W H. OsWRKY74, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(3): 947-960.
- [13] SU T, XU Q, ZHANG F C, et al. WRKY42 modulates phosphate homeostasis through regulating phosphate translocation and acquisition in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2015, 167(4): 1579-1591.
- [14] YAN J Y, LI C X, SUN L, et al. A WRKY transcription factor regulates Fe translocation under Fe deficiency [J]. Plant Physiology, 2016, 171(3): 2017-2027.
- [15] YAMADA Y, SATO F. Tyrosine phosphorylation and protein degradation control the transcriptional activity of WRKY involved in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis [J]. Scientific Reports, 2016, 6:31988.
- [16] SHEN Q H, SAIJO Y, MAUCH S, et al. Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses [J]. Science, 2007, 315(5815): 1098-1103.
- [17] LE ROUX C, HUET G, JAUNEAU A, et al. A receptor pair with

- an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity[J]. *Cell*, 2015, 161(5): 1074-1088.
- [18] HIRAKAWA H, OKADA Y, TABUCHI H, et al. Survey of genome sequences in a wild sweet potato, *Ipomoea trifida* (HBK) G. Don[J]. *DNA Research*, 2015, 22(2): 171-179.
- [19] ISHIGURO S, NAKAMURA K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and  $\beta$ -amylase from sweet potato[J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1994, 244(6): 563-571.
- [20] JIN J, TIAN F, YANG D C, et al. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45: D1040-D1045.
- [21] MARCHLER-BAUER A, DERBYSHIRE M K, GONZALES N R, et al. CDD: NCBI's conserved domain database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014; gku1221.
- [22] DE CASTRO E, SIGRIST C J A, GATTIKER A, et al. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34: W362-W365.
- [23] CROOKS G E, HON G, CHANDONIA J M, et al. WebLogo: a sequence logo generator[J]. *Genome Research*, 2004, 14(6): 1188-1190.
- [24] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [25] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33: 1870-1874.
- [26] NEI M, KUMAR S. *Molecular evolution and phylogenetics* [M]. United Kingdom: Oxford University Press, 2000.
- [27] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39: 783-791.
- [28] LIU X, WU J, WANG J, et al. WebLab: a data-centric, knowledge-sharing bioinformatic platform[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(suppl 2): W33-W39.
- [29] OBENAUER J C, CANTLEY L C, YAFFE M B. Scansite 2.0: proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3635-3641.
- [30] YACHDAV G, KLOPPMANN E, KAJAN L, et al. PredictProtein—an open resource for online prediction of protein structural and functional features[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1): W337-W343.
- [31] GUEX N, PEITSCH M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(15): 2714-2723.
- [32] SZKLARCZYK D, SANTOS A, VON MERING C, et al. STITCH 5: augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D380-D384.
- [33] SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(D1): D447-D452.
- [34] 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 Research*, 2005, 12(1): 9-26.
- [35] TRIPATHI P, RABARA R C, LANGUM T J, et al. The WRKY transcription factor family in *Brachypodium distachyon*[J]. *Bmc Genomics*, 2012, 13: 270.
- [36] HUANG X, LI K, XU X, et al. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in white pear (*Pyrus bretschneideri*) reveals evolution and patterns under drought stress[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 1104.
- [37] LI M Y, XU Z S, TIAN C, et al. Genomic identification of WRKY transcription factors in carrot (*Daucus carota*) and analysis of evolution and homologous groups for plants[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23101.
- [38] SONG H, WANG P, LIN J Y, et al. Genome-wide identification and characterization of WRKY gene family in peanut[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 534.
- [39] CHI Y, YANG Y, ZHOU Y, et al. Protein - protein interactions in the regulation of WRKY transcription factors[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(2): 287-300.
- [40] ISHIHAMA N, ADACHI H, YOSHIOKA M, et al. *In vivo* phosphorylation of WRKY transcription factor by MAPK[J]. *Plant MAP Kinases: Methods and Protocols*, 2014, 1171: 171-181.
- [41] CHANG I F, CURRAN A, WOOLSEY R, et al. Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Proteomics*, 2009, 9(11): 2967-2985.

(责任编辑:王 妮)