

徐 丽, 陈 新, 宗晓娟, 等. 樱桃砧木 *PcWRKY1* 基因的克隆与表达分析[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(3): 636-641.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.03.023

樱桃砧木 *PcWRKY1* 基因的克隆与表达分析

徐 丽, 陈 新, 宗晓娟, 朱东姿, 魏海蓉, 王甲威, 谭 钱, 张力思, 刘庆忠
(山东省果树研究所/山东省果树生物技术重点实验室, 山东 泰安 271000)

摘要: WRKY 转录调控因子广泛参与植物的生长发育、生物胁迫和非生物胁迫等生理过程。为明确干旱和盐等非生物胁迫对樱桃砧木 *PcWRKY1* 基因表达的影响, 本研究利用 RT-PCR 技术克隆了樱桃砧木 Gisela 6 (*Prunus cerasus* × *Prunus canescens*) 的 WRKY 基因 cDNA 序列, 命名为 *PcWRKY1* (GenBank 登录号为 KY399985)。序列分析结果表明, *PcWRKY1* 完整开放阅读框为 1 461 bp, 编码 486 个氨基酸, 编码的蛋白质含有 2 个 WRKY 保守结构域和 2 个 C₂H₂ 锌指结构域, 属于 WRKY 家族第 I 类成员。qRT-PCR 分析 *PcWRKY1* 在 200 mmol 甘露醇和 200 mmol NaCl 胁迫下的表达情况, 结果显示, 甘露醇和 NaCl 均能诱导 *PcWRKY1* 基因表达, 推测 *PcWRKY1* 基因在应对干旱和盐 2 种非生物胁迫方面可能具有重要作用。

关键词: 樱桃砧木; WRKY 转录因子; 基因表达

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)03-0636-06

Cloning and expression analysis of *PcWRKY1* gene in cherry rootstocks

XU Li, CHEN Xin, ZONG Xiao-juan, ZHU Dong-zi, WEI Hai-rong, WANG Jia-wei, TAN Yue, ZHANG Li-si, LIU Qing-zhong

(Shandong Province Key Laboratory of Fruit Tree Biotechnology / Shandong Institute of Pomology, Tai'an 271000, China)

Abstract: The WRKY transcription factors are widely involved in the physiological processes related to plant growth and development, biotic and abiotic stresses. A full-length cDNA for *PcWRKY1* (GenBank accession number KY399985) gene was cloned from the cherry (*Prunus*) rootstock Gisela 6 (*Prunus cerasus* × *Prunus canescens*) using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Sequence analysis results showed that the *PcWRKY1* gene was found to contain an open reading frame (ORF) with 1 461 bp and encoded 486 amino acids. The protein encoded by *PcWRKY1* comprised of two conserved WRKY domains and two zinc finger structures (C₂H₂), and thus, belonged to Group I of the WRKY family. Furthermore, the expression of *PcWRKY1* under the stresses of 200 mmol mannitol and 200 mmol NaCl was analysed by quantitative RT-PCR. Both mannitol and NaCl could induce the expression of *PcWRKY1* gene, suggesting that *PcWRKY1* played an important role in dealing with drought and salt stress.

Key words: cherry rootstock; WRKY transcription factor; gene expression

收稿日期: 2017-09-16

基金项目: 山东省农业科学院青年科研基金项目 (2016YQN25); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201203075); 山东省水果产业体系创新团队建设项目 (SDAIT-03-022-04)

作者简介: 徐 丽 (1983-), 女, 山东曲阜人, 博士, 助理研究员, 主要从事果树资源与分子技术研究。(E-mail) xuli1245@163.com

通讯作者: 刘庆忠, (E-mail) qzliu001@126.com

干旱和盐碱等非生物胁迫是影响植物生长发育的主要限制因素^[1-3]。为适应这些非生物胁迫, 植物在分子水平上进化形成了相应的机制,

诱导胁迫相关转录因子的表达。因为转录因子能通过参与不同的复杂的信号通路,调控植物的生理生化活动来抵御逆境。WRKY 是目前研究较为广泛的一类植物特有的转录因子,存在 1 个或 2 个高度保守的 WRKYGQK 结构域及紧随其后的一段锌指结构^[4]。研究结果表明拟南芥和水稻中分别有 74 和 126 个 WRKY 基因家族成员,而在绿藻中仅有一个成员^[5]。Zhou 等^[6]把大豆 *GmWRKY13* 和 *GmWRKY54* 分别转到拟南芥中,过量表达 *GmWRKY54* 的植株对于干旱和盐害都具有一定的忍耐性,而过量表达 *GmWRKY13* 的植株对盐害和甘露醇胁迫敏感。过表达 *AtWRKY25* 和 *AtWRKY33* 能够通过影响 SOS (Salt overly sensitive) 通路来提高拟南芥对高盐环境的耐受性^[7]。Song 等^[8]用 PEG, NaCl 和 ABA 处理转 *OsWRKY08* 基因的拟南芥,发现 *OsWRKY08* 基因表达量增加,改善了转基因拟南芥渗透调节能力。相似的 *ZmWRKY33* 受高盐、干旱、低温和 ABA 诱导表达,且转基因拟南芥的耐盐性提高^[9]。Sun 等^[10]的研究结果表明二穗短柄草 *BdWRKY36* 能提高转基因烟草耐受干旱的能力。棉花的 *GhWRKY17* 在受干旱、高盐处理的诱导后大量表达^[11]。目前已从拟南芥^[12] [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]、水稻^[13] (*Oryza sativa* L.)、油菜^[14] (*Brassica napus* L.)、大豆^[15] [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 等植物中克隆到大量的 WRKY 转录因子。而樱桃中还未见相关 WRKY 转录因子的研究报道。

由于樱桃喜温、不耐寒、不耐盐碱,所以其分布和栽培区域受到限制,因此种植樱桃除选择抗逆性强的品种,还要选择合适的具有抗性的砧木。樱桃砧木在樱桃生产中起着非常重要的作用,因此改善砧木抗逆性迫在眉睫。通过常规育种获得新品种周期较长,而通过基因工程获得抗逆新品种日益受到重视,其中关键基因的挖掘是前提。本课题组利用 RNA-Seq 技术获得了樱桃转录组数据,本研究以此转录组数据为基础,以甜樱桃砧木 Gisela 6 叶片为材料,采用 RT-PCR 方法,筛选并克隆了樱桃砧木 WRKY 转录因子,进行了生物信息学和胁迫诱导表达模式分析,为樱桃抗逆品种选育提供理论依据和技术支持,也为樱桃的分子育种提供

基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

供试材料为 Gisela 6 (*Prunus cerasus* X *Prunus canescens*) 组培苗。组培苗在 MS+0.5 mg/L 6-BA, 附加蔗糖 20.0 mg/L、琼脂 6.0 mg/L, pH 为 5.6 的继代培养基上培养。对培养 3 周的组培苗分别转移到添加甘露醇 (200 mmol/L) 和 NaCl (200 mmol/L) 的培养基上,每个处理重复 3 次,每个重复 9 瓶,分别于 0 h、2 h、4 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 取组培苗叶片。采集后立即投入液氮冷冻,保存于 -80 °C 冰箱备用。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

采用 RN38-EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒 (北京,艾德莱) 提取总 RNA。反转录参照 Fermentas 公司说明书进行,以 Oligo(dT)¹⁸ 为引物合成 cDNA 第一链。

1.3 *PcWRKY1* 基因的克隆

以获得的樱桃转录组数据为基础,设计 1 对引物 *PcWRKY1*-F (5'-ATGATTCTCTAGGGGAACCTGG-3') 和 *PcWRKY1*-R (5'-TTAGACAGGTTCTGCTTTTGGATT-3')。以反转录 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,目的片段切胶回收和连接 pEASY-Blunt 载体 (北京,全式金),转化大肠杆菌 DH5 α ,菌落 PCR 检测后挑取 5 个阳性菌落送交上海生工生物公司测序。

1.4 樱桃 *PcWRKY1* 基因的生物信息学分析

用 NCBI 提供的在线 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 寻找基因的开放阅读框 (ORF),用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行核苷酸及氨基酸序列的同源序列搜索,用 DNAMAN 软件构建系统进化树。用 ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/ProtParam.html>) 预测编码蛋白质的分子量、等电点等理化特性,通过 ProtScale 软件分析 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 氨基酸序列的疏/亲水性。

1.5 *PcWRKY1* 基因非生物胁迫表达分析

提取不同处理材料的总 RNA,按照试剂盒说明书反转录合成第一链 cDNA (Fermentas)。利用 Real-time qRT-PCR 分析樱桃砧木 *PcWRKY1* 基因分别在 200 mmol 甘露醇和 200 mmol NaCl 胁迫下的表达情况。以稀释后的 cDNA 为模板,甜樱桃 *β -actin* 基因 (Accession no. FJ560908) 为内参,利用 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪,参照康为试剂 UltraSYBR mixture with Rox 试剂盒说明书进行。PCR 反应条件:95 ℃ 变性 10 min;95 ℃ 变性 15 s,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 40 s,40 个循环。荧光定量 PCR 的引物序列为 qF (5'-CTAATGATGATGGATACAAT-3') 和 qR (5'-TCTTCTTAA-CAGGACAAT-3'),每个样品重复 3 次,相对基因表达根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。

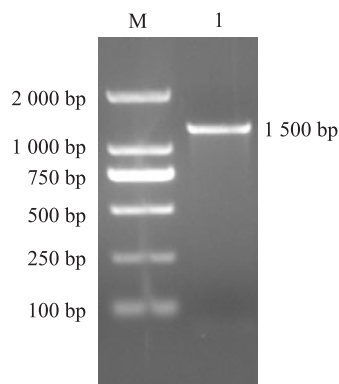
2 结果

2.1 *PcWRKY1* 基因克隆与序列分析

以甜樱桃砧木叶片 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板,以 *PcWRKY1*-F 和 *PcWRKY1*-R 为引物扩增获得约 1 500 bp 的片段 (图 1),测序结果表明目的片段为 1 461 bp。利用 NCBI 中的 ORF Finder 分析发现 *PcWRKY1* 基因起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA,编码 486 个氨基酸。氨基酸序列分析发现该序列含有 2 个 WRKY 保守结构域和 2 个 C_2H_2 不同的锌指基序 (图 2),一个是 $C-X_4-C-X_{22}-H-X_1-H$,另一个是 $C-X_4-C-X_{23}-H-X_1-H$,表明其属于 WRKY 家族第 I 类成员。ProtParam 软件分析结果显示其分子量为 52 940,等电点为 5.84,不稳定系数为 43.68,属于不稳定蛋白质。亲水性平均数为 -0.897,预测该蛋白质为亲水性蛋白。利用 NCBI 网站 BLAST 程序进行序列比对,该 cDNA 序列与其他植物的 WRKY 基因具有较高的相似性,与碧桃 (XM_007215222.1)、梅 (XM_008231659.2)、苹果 (XM_008381756.2) 和白梨 (XM_009366930.2) WRKY 基因的核苷酸序列相似性分别为 98%、98%、85% 和 85%。这表明分离得到的 cDNA 序列是甜樱桃砧木的 WRKY 基因,将其命名为 *PcWRKY1*,GenBank 登录号为 KY399985。

2.2 *PcWRKY1* 系统进化分析

将推导的 *PcWRKY1* 氨基酸序列经 BLAST



M:DL2000 marker;1:*PcWRKY1* 基因全长 PCR 扩增产物。

图 1 *PcWRKY1* 基因 PCR 扩增产物电泳分析

Fig.1 Electrophoresis of amplified product of *PcWRKY1* gene

比对,搜索与 *PcWRKY1* 同源性较高的植物氨基酸序列。结果显示 *PcWRKY1* 氨基酸序列与碧桃、梅、白梨和苹果等 WRKY 基因编码的氨基酸一致性分别为 98%、98%、76% 和 72%。为了进一步分析 *PcWRKY1* 与其它 WRKY 基因的亲缘关系,下载 10 个其他植物 WRKY 基因编码的氨基酸序列构建系统进化树 (图 3),结果表明 *PcWRKY1* 与来自蔷薇科的碧桃和梅亲缘关系最近,与白梨和苹果次之。

2.3 *PcWRKY1* 的非生物胁迫表达分析

研究结果表明,WRKY 基因能受很多信号分子诱导,为进一步研究 *PcWRKY1* 在非生物胁迫诱导下的表达情况,用干旱和盐对甜樱桃砧木进行处理。以甜樱桃 *β -actin* 基因为内参,利用 qRT-PCR 方法对甜樱桃砧木叶片 *PcWRKY1* 基因在干旱 (200 mmol 甘露醇) 和盐 (200 mmol NaCl) 胁迫下的表达情况进行初步研究,干旱处理 2 h 和 4 h 时 *PcWRKY1* 基因的表达量基本相同,6 h 时表达量达到最大值,之后表达量呈下降趋势,但在整个胁迫过程中表达量均高于对照时期 (0 h),说明 *PcWRKY1* 基因可能在干旱胁迫中起作用 (图 4)。而 NaCl 处理 2 h 时 *PcWRKY1* 基因表达量开始升高,随着处理时间延长表达量逐渐增强,在处理 6 h 时 *PcWRKY1* 基因表达量达到最大值,随后表达量开始下降,但在整个胁迫过程中表达量均高于对照时期 (0 h),表明 *PcWRKY1* 基因可能在响应盐胁迫中起作用 (图 5)。

241	GTATCTGATACAAGAATCAAGCTCAGATGTTTCTCTAGGGGAACCTGGGACAGATAAAA M I S L G E P G T D K
301	TTGCTTCTGATATAGTACCGAAGAAAGAGGTTCAAATAGTAAATTCATGCTCCACATC I A S D I V P K K E S S N S E I H A P H
361	AAACTCCTGATAATGGGATCTGTCCCTGCAATCAGATCATAGAGGAAATGTTGAGTCTC Q T P D N G I C P L Q S D H R G N V E S
421	TAATACCTGAGAAATCGTTACAGCTGCCTGATGGTGTGGTACTGCATCTCAATCAAATC L I P E K S L Q L P D G V G T A S Q S N
481	AAGAAGGAAGTGTTCCTCTTAACTCTGAGAAAGCACCACAAACCCCTGAAACCTCTG Q E G S V S S L T S E K A P Q T P E T S
541	CCCTTGTCTTGGCATCTGGTCAAGAAGGAAGCACTCCATCTACAGCACGAGAGAGAGGGT A L V L R S G Q E G S T P S T A R E R G
601	TAGAGGATGGTTATCACTGGAGGAAATACGGCCAGAACTTGTTAAGGGAATGCATATG L E D G Y H W R K Y G Q K L V K G N A Y
661	TAAGAAGTTACTACAGATGTACGCATCCAAATGTCCAGTGAAGAGGCAAGTGGAGCGCA V R S Y Y R C T H P K C P V K R Q V E R
721	CACATAATGGGCAGATAACAGATACTGTTTACTTTGGTGAGCATGAACATCCCAAAGCTC T H N G Q I T D T V Y F G E H E H P K A
781	AAGTTAGCGTCCAGTAGCTGTAGTTTCTCGTGTCCATTGTGCAAGAAGACCAGAAG Q V S V P V A V S F L V S I V E E R P E
841	AGCTTTGTTAATGGTGTGCAAGGCAAAACCATCGGATGTGCATGGCCACACATCTAACC E L L L T G V E G K P S D V H G H T S N
901	AGATTGAGCCAGTGGACCCCTCTCAGCTATCAACCGTTGCAGATAATGAAGGTGTGCAGA Q I E P V D P S Q L S T V A D N E G V Q
961	GAGTGTCTCTCAATCAAATAGAACCAGAGATGGTGATCCAGACTCAAAAAGACAGAAGA R V L S Q S N R T R D G D P D S K R Q K
1 021	AGGAAAAACATAATGGCAACTCAATTCGGTGGATAAGCCAGCTGGTGAACCGGTGTG K E K H N G N S I P V D K P A G E P R V
1 081	TTGTTCACTATGAGTGAGGCTGATATAGTGAATGATGGTTACAGATGGCGCAAAATAG V V Q T M S E A D I V N D G Y R W R K Y
1 141	GGCAGAAGTTAGTAAAGGCAATCCAAATCCAAGGAGTTACTACAGATGCTCAATCCTG G Q K L V K G N P N P R S Y Y R C S N P
1 201	GGTGCCTGTAAAGAACATGTAGAGAGGGCGTCTCATGATTCAAAAGTTGTATAGCCA G C P V K K H V E R A S H D S K V V I A
1 261	CATATGAGGGCAACATGATCATGATATGCCACCCACAAGGACTGTGACCCACAATGCAT T Y E G Q H D H D M P P T R T V T H N A
1 321	CAGCATCAATGTGATTACGACGGCCCGTAATGGTGAGTCTGGCACTACATCAGAAGGGA S A S N V I T T A R N G E S G T T S E G
1 381	ATGCTGTCTGCCATGATACTAGCCAGAACACGAAGATAAACCAACAAGCAACTTTATG N A V C H D T S P E H E D K P N K Q L Y
1 441	TTGAGCCAAGAACTAAATCAAGTGATGTGTGCTGTGATATGGTCGTTGATTCTGATC V E P R T K S S D V A G C D M V V D S D
1 501	TGGGTCTGAAAGAAAATTAATGAGCAAGTGGTGGCAAAGCATGTACCACAGAAGAAA L G P E R K L N E Q V V G K A C T T E E
1 561	GTGATGCCCCGATATAATTGTTCTAGGGCCAATGAATTGCAAAATGGCGAGTCAGGAA S D A P D I I V P R A N E L Q N G E S G
1 621	TTAAATCAGAAGGCAACAACGCCTGCATTGATACGGTCGTTACGGCAATCTGTGTCCAG I K S E G N N A C I D T V V H G N L C P
1 681	AAAGTAATCACCGAGCAAAAAATCCAAAGCAGAACCTGTCTAAGTTAACCTGCAA E S N S P E Q K N P K A E P V

灰色区域为 WRKY 转录因子的特征序列 WRKYGQK; 方框内是起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA); 下划线部分是锌指结构域 C₂H₂, 其中 C 和 H 残基用方框标出。

图 2 *PcWRKY1* 基因的碱基序列及预测的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence and the predicted amino acid sequence of *PcWRKY1*

3 讨论

WRKY 转录因子广泛参与植物的生长、发育、

衰老等进程,对各种生物胁迫和非生物胁迫都有一定响应。但是关于 WRKY 转录因子的研究多集中于拟南芥和烟草等模式植物中,而有关樱桃转录因

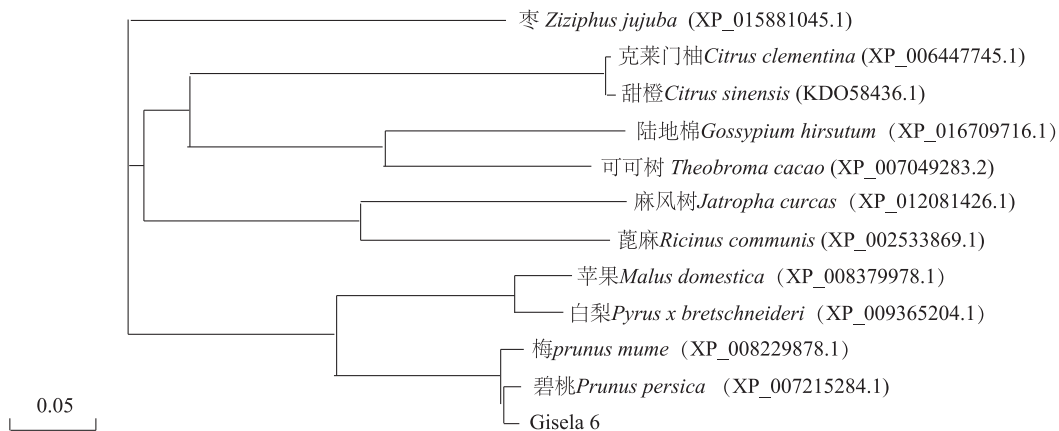


图 3 甜樱桃砧木 PcWRKY1 氨基酸序列与不同物种 WRKY 氨基酸序列的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of the amino acid sequence of PcWRKY1 in cherry rootstock and the amino acid sequence of WRKY from different species

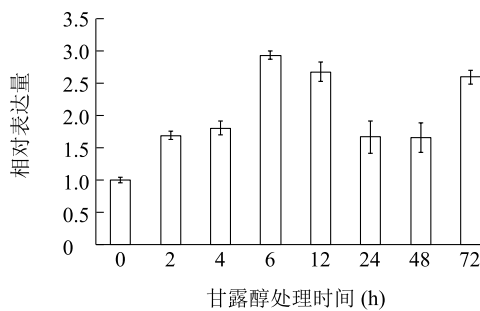


图 4 200 mmol 甘露醇处理下 PcWRKY1 基因的表达

Fig.4 Expression of PcWRKY1 gene under the treatment of 200 mmol mannitol

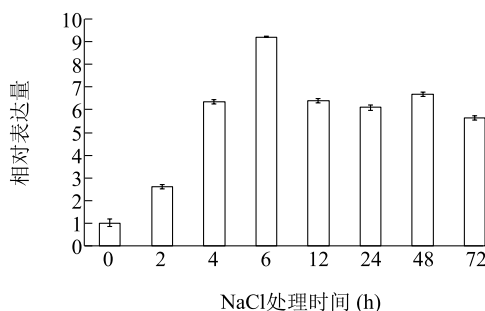


图 5 200 mmol NaCl 处理下 PcWRKY1 基因的表达

Fig.5 Expression of PcWRKY1 gene under the treatment of 200 mmol NaCl

子相关研究还未见报道。本研究从甜樱桃砧木中分离到 1 个 WRKY 基因,生物信息学分析结果表明, PcWRKY1 编码 486 个氨基酸,推测相对分子量为 52 940。根据 WRKY 结构域的数量和锌指结构域

的特征, WRKY 家族被划分成 3 类^[16],第 I 类包含 2 个 WRKY 结构域,第 II 类包含 1 个 WRKY 结构域,其锌指结构均为 C₂H₂(C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H)型,第 III 类与第 II 类相同,含有 1 个 WRKY 结构域,但其锌指结构为 C₂HC(C-X₇-C-X₂₃-H-X₁-C)型。PcWRKY1 含有 2 个高度保守的 WRKY 结构域,锌指结构为 C₂H₂型,属于 WRKY 家族第 I 类成员。系统进化分析结果显示, PcWRKY1 与来自蔷薇科的碧桃和梅的 WRKY 同源性最高,与蔷薇科植物聚在一起,表明该蛋白质在植物进化过程中比较保守,也暗示了其在功能上的保守性。

干旱和盐都会导致植物缺水,缺水可影响植物的新陈代谢、生长发育、胞膜透性和蛋白质含量等。转录因子在植物耐受干旱和盐胁迫过程中发挥着重要的作用。其中 WRKY 基因家族成员被证实能响应植物对干旱和盐的胁迫^[17-18]。共表达拟南芥 AtWRKY28 和 AtbHLH17 能够显著提升多种非生物胁迫的耐受性,包括干旱、高盐和氧化胁迫^[19]。过表达水稻 OsWRKY45 提高了水稻的耐盐、耐旱性,同时还增强了植株的免疫力^[20]。过表达棉花 hWRKY39-1 能够提高转基因烟草对盐的耐受性^[21]。本研究通过荧光定量 PCR 对樱桃砧木在 200 mmol 甘露醇和 200 mmol NaCl 胁迫下 PcWRKY1 的表达模式进行了分析。结果显示, PcWRKY1 在干旱胁迫后表达量明显上升,6 h 时表达量达到最高。在盐胁迫中 PcWRKY1 的表达情况与干旱胁迫相似,被诱导 2 h 后表达量开始升高,并且随着时间延长在 72 h 内一

直处于高表达水平。研究结果表明第 I 类 WRKY 蛋白在起源上属于较为原始的一个类群,也最为保守,可参与对病原菌和非生物逆境的抗性^[22]。序列分析结果表明 *PcWRKY1* 属于第 I 类 WRKY 基因家族成员,结合荧光定量分析结果,推测 *PcWRKY1* 可能同时响应干旱胁迫和盐胁迫。为了进一步研究该基因的功能,作者已经将该基因构建了植物表达载体,进行烟草转化试验,进一步分析该基因的抗逆性。

参考文献:

- [1] 穆蓁蓁, 克热木·伊力, 王一静. 高温干旱对库尔勒香梨叶片生理指标的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 209-212.
- [2] 刘三梅, 杨清辉, 李秀年, 等. 不同生育时期干旱胁迫对甘蔗形态指标及生理特性的影响[J]. 南方农业学报, 2016, 47(8): 1273-1278.
- [3] 张 战, 张丽丽, 倪善君, 等. 滨海盐碱土对水稻苗期生长及生理特性的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 111-114.
- [4] AGARWAL P, REDDY M P, CHIKARA J. WRKY: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(6): 3883-3896.
- [5] WEN F, ZHU H, LI P, et al. Genome-wide evolutionary characterization and expression analyses of WRKY family genes in *Brachypodium distachyon*[J]. DNA Res, 2014, 21: 327-339.
- [6] ZHOU Q Y, TIAN A G, ZOU H F, et al. Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. Plant Biotechnol J, 2008, 6(5): 486-503.
- [7] JIANG Y, DEYHOLOS M K. Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses[J]. Plant Mol Biol, 2009, 69(1/2): 91-105.
- [8] SONG Y, JING S J, YU D Q. Overexpression of the stress induced *OsWRKY08* improves the osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. Chin Sci Bull, 2009, 54: 4671-4678.
- [9] LI H, GAO Y, XU H, et al. *ZmWRKY33*, a WRKY maize transcription factor conferring enhanced salt stress tolerances in *Arabidopsis*[J]. Plant Growth Regul, 2013, 70: 207-216.
- [10] SUN J, HU W, ZHOU R, et al. The *Brachypodium distachyon* *BdWRKY36* gene confers tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants[J]. Plant Cell Rep, 2015, 34(1): 23-35.
- [11] YAN H R, JIA H, CHEN X B, et al. The cotton WRKY transcription factor GhWRKY17 functions in drought and salt stress in transgenic *Nicotiana benthamiana* through ABA signalling and the modulation of reactive oxygen species production[J]. Plant Cell Physiol, 2014, 55(12): 2060-2076.
- [12] EULGEM T, SOMSSICH I E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling[J]. Curr Opin Plant Biol, 2007, 10(4): 366-371.
- [13] ROSS C A, LIU Y, SHEN Q J. The WRKY gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. J Integr Plant Biol, 2007, 49(6): 827-842.
- [14] YANG B, JIANG Y, RAHMAN M, et al. Identification and expression analysis of WRKY transcription factor genes in canola (*Brassica napus* L.) in response to fungal pathogens and hormone treatments[J]. BMC Plant Biol, 2009, 9(1): 68.
- [15] SCHMUTZ J, CANNON S B, SCHLUETER J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean[J]. Nature, 2010, 463(7278): 178-183.
- [16] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, et al. The WRKY superfamily of plant transcriptional factors[J]. Trends Plant Sci, 2000, 5: 199-206.
- [17] GOLLDACK D, LUKING I, YANG O. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network[J]. Plant Cell Rep, 2011, 30(8): 1383-1391.
- [18] TRIPATHI P, RABARA R C, RUSHTON P J. A systems biology perspective on the role of WRKY transcription factors in drought responses in plants[J]. Planta, 2014, 239(2): 255-266.
- [19] BABITHA K C, RAMU S V, PRUTHVI V, et al. Co-expression of *AtbHLH17* and *AtWRKY28* confers resistance to abiotic stress in *Arabidopsis*[J]. Transgenic Res, 2013, 22(2): 327-341.
- [20] TAO Z, KOU Y, LIU H, et al. *OsWRKY45* alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice[J]. J Exp Bot, 2011, 62(14): 4863-4874.
- [21] SHI W, HAO L, LI J, et al. The *Gossypium hirsutum* WRKY gene *GhWRKY39-1* promotes pathogen infection defense responses and mediates salt stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana* [J]. Plant Cell Rep, 2014, 33(3): 483-498.
- [22] ÜLKERB, SOMSSICH I E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function[J]. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7(5): 491-498.

(责任编辑: 陈海霞)