

基于红花不同组织转录组数据的转录因子分析

董园园¹, 刘秀明¹, 姚娜¹, 李海燕^{1,2*}

1. 吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

摘要: **目的** 注释并分类红花 *Carthamus tinctorius* 中转录因子家族, 分析其不同组织间的表达水平差异。**方法** 使用红花不同组织转录组测序数据组装 Unigene, 利用 Nr 数据库中转录因子信息比对并注释红花转录因子, 同时对 MYB 转录因子家族的基因表达、蛋白保守结构域及系统发育树等内容重点分析。**结果** 红花转录组测序数据中共获得 731 个转录因子, 分属 42 个转录因子家族。MYB 转录因子家族成员的表达及蛋白结构分析显示, MYB 转录因子家族在花冠中表达差异显著, 氨基酸序列中存在 3 个保守的蛋白核心结构, 系统发育树分析显示聚为 2 类 MYB 亚族。**结论** 红花 MADs-box、bHLH、MYB、AP2 转录因子家族成员最多, 在不同组织间表达差异显著, MYB 转录因子家族具有一定保守性。

关键词: 转录因子; 转录组; MYB 家族; 高通量测序; 黄酮

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)21-4515-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.024

Transcription factor analysis of safflower based on transcriptome

DONG Yuan-yuan¹, LIU Xiu-ming¹, YAO Na¹, LI Hai-yan^{1,2}

1. Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: **Objective** This research aimed to analyze transcription factors (TFs) and their expression level in different tissues of *Carthamus tinctorius*. **Methods** Seed, leaf and petal transcriptome were analyzed by Solexa sequencing and assembled into Unigene. TFs were obtained according to Nr database. Gene expression, conservative Motif and evolutionary tree of MYB family were analyzed. **Results** A total of 731 transcription factors belong to 42 transcription factor family were obtained. Furthermore, MYB expressed differently in corolla when contrast to seed and leaf. There are three conserved protein domains in MYB family and MYB family was clustered into two subfamilies based on phylogenetic tree results. **Conclusion** TF families of MADs-box, WRKY, MYB and AP2 were differentially expressed significantly in various tissue samples and MYB TF family are conserved.

Key words: transcription factor; transcriptome; MYB family; high sequencing; flavonoid

RNA 转录是构成植物基因表达调控的重要组成部分, 包含转录因子 (transcription factor, TF) 及转录因子结合位点识别 (transcription factor binding site, TFBS)。TF 根据识别的顺式作用元件类型分为基础型和调节型 2 种。而 TF 编码基因依据 DNA 结合域结构特征或调控的细胞功能类型又可划分为不同的 TF 家族。TF 能够正向或负向调控基因, 特异识别并结合转录起点附近 6~12 个碱基

的顺式调控元件, 介导功能基因的表达激活或表达抑制^[1]。TF 几乎参与调控所有的细胞功能, 作为基因网络调控的枢纽, TF 的表达失调则可引起下游功能基因的转录变化, 显著影响植物生长发育、组织形态、环境适应等生理过程, 改变植物细胞过程中表达信号的稳定传导^[2-4]。

基因组背景清晰的植物中平均含有 1 500~2 000 个 TF, 隶属于约 50 个 TF 家族^[5]。目前 GEO

收稿日期: 2017-05-19

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863”) 资助项目 (2011AA100606); 国家自然科学基金项目 (31501366); 吉林省科技厅项目 (20150623024TC-11); 吉林农业大学科研启动基金 (2015018)

作者简介: 董园园 (1985—), 女, 吉林人, 讲师, 研究方向为植物分子生物学。

***通信作者:** 李海燕 (1971—), 女, 吉林人, 教授, 博士生导师, 研究方向为分子生物学。

Tel: (0431)84533427 Fax: (0431)84533347 E-mail: hyli99@163.com

数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 收录了 65 个植物物种的 TF 信息, 主要是来自于模式植物的 TF 数据, 其中约 46% 的 TF 信息来源于拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 的遗传调控研究, 另外 13% 的数据是来自水稻 *Oryza sativa* L. 的相关研究, 而非模式植物的 TF 信息收录有限, 为相关植物的基因表达调控研究带来挑战。

红花 *Carthamus tinctorius* L. 是集药用与油用于一体的植物。红花中活性成分黄酮与类黄酮, 是一类具有扩张血管、抑制血栓形成、抗氧化等多种药理活性的次生代谢产物, 主要用于冠心病、糖尿病并发症的治疗。此外, 红花籽粒因不饱和脂肪酸含量高而具有丰富的营养价值^[6]。作为临床上广泛应用的中药材, 相比较于模式植物, 红花可用的遗传信息资源匮乏, 国内外相关的研究报道数量不多, 研究也较为简单。截至目前, Genbank 数据库中收录的红花非冗余核酸序列信息 1 146 条, 其中转录因子相关的调控序列信息仅 4 条。因此本研究中, 基于高通量测序对红花 TF 编码基因的系统进行分析, 有助于进行红花分子遗传、生长发育、次生代谢产物合成、基础化合物代谢及信号转导等多方面的调控机制研究。

1 材料与方法

1.1 材料

红花 TF 基因序列来自于实验室所构建的转录组数据。测序样品经笔者鉴定为红花 *Carthamus tinctorius* L. 的生长期复叶、盛花期花冠、成熟期籽粒组织部位。

1.2 TF 家族注释与表达分析

SOAP2 软件^[7]将转录组测序片段 reads 数据组

装获得 Unigene 序列。通过 BlastN 软件将 Unigene 序列和 Nr 蛋白数据库中 TF 信息进行比对, 设定阈值 $E < 1 \times 10^{-5}$, 根据蛋白序列相似度及期望值, 对 Unigene 分类并进行 TF 信息注释。红花 TF 的表达量计算使用 RPKM (reads per kb per million reads) 方法^[8]。

$$RPKM = \frac{10^6 C}{NL / 10^3}$$

RPKM 为 Unigene 标准化后表达量, C 为唯一比对到 Unigene 的 reads 数目, N 为唯一比对到全部 Unigene 的总 reads 数, L 表示 Unigene 碱基数

RPKM 反映样本内基因表达水平, 可除去基因长度及测序差异对基因表达造成的影响, RPKM 可直接用于不同样本间的基因表达差异比较。

1.3 实时荧光定量 qRT-PCR 分析

依据转录组测序数据, 选取 12 个 MYB 家族 TF 基因序列, 进行不同组织间基因表达差异分析验证。引物设计使用 Primer express 软件, 引物序列见表 1。cDNA 第一链合成使用 MMLV 反转录酶 (宝生物公司, 大连) 进行反转录操作, 反应条件为 37 °C、15 min, 85 °C、5 s。荧光定量 PCR 反应使用 SYBR Premix ExTaq (宝生物公司, 大连) 试剂盒, 以反转录产物为模板, 18 S rRNA 基因作为内参。反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火、延伸共 20 s, 40 个循环。扩增反应使用 Storage MX3000 荧光定量扩增仪 (安捷伦公司, 美国)。采用相对定量法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 计算 Unigene 相对表达水平。

1.4 保守蛋白序列分析

使用基于 MEME suite 4.11.2 数据库开发的在线分析软件 MEME (<http://meme-suite.org/tools/>)

表 1 红花 MYB 的引物设计

Table 1 Primer sequences of safflower MYB

基因	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')	产物长度/bp
Unigene14568	CGGTGGATGCACTTCTGGAT	GCACACACCAGATGCTCATG	136
Unigene14926	AACAACACCACCACCACCAT	AACAGGTGCGGGAGTTATGG	147
Unigene6961	CACCTCGTCCTAAGCGCAA	GTATCCAGGTCCAAGGGCAC	122
Unigene141067	ACTGGAACACTCATCTGAAGAAG	GCTCCTCGACTGACCATCAC	107
Unigene5713	CCGTGAATGAACTCCCACCA	GTTGGTTCTTCGAGTGGGGT	103
Unigene11113	GAGAGTGGAGGAGGAGGTGT	CGATGATGGACAGGAAGGGG	106
Unigene28824	TGCAGTAACAATGGGCACAAC	ACCCATACTAGCACTCTTTCGG	105
Unigene23182	GAAGATACGGTGCCTGAGGG	ACTCCAAGCCTCCATTAGCT	130
Unigene136203	CTCCAAAACCCACACCAAA	TGACGAGAGACCAGTTCCTC	115
Unigene149429	TGCAGCAATCCGAAGAAATCA	CAGTTCCTAGGGCCGTGTTT	107
Unigene26238	CGCCGATGAGAACGAGATCA	TGAGATGCGAGTTCCAGTGG	125
Unigene27556	GAGCGTGTGTGTGTGCAAA	TTCGCCGTTGGTCTGAATGT	123
18 S rRNA	GAGAAACGGCTACCACATCCAA	TCGTTTGAGCCCGGTATTGTTA	102

meme) 进行红花 MYBTf 的保守蛋白序列预测。参数设置: Motif 保守蛋白域搜索最大数量设置为 5, Motif 宽度范围设置为 10~50。

1.5 系统发育分析

使用 ClustalW2 软件进行 CtMYB 转录因子家族多蛋白序列比对; MEGA 软件使用最大简约法 (MP maximum parsimony) 构建系统进化树并进行进化分析。

2 结果与分析

2.1 红花 TF 的分类与注释

红花籽粒、叶片、花冠组织文库累计获得 Unigene 153 769 个, 注释得到 42 个 TF 家族共 731 个 TF。其中, 籽粒文库获得 452 个 TF, 叶片文库获得 485 个 TF, 花冠组织获得 710 个 TF。369 个 TF 属于 3 个文库共表达 (图 1), 对红花 3 个文库共表达的 TF 注释发现, WRKY、MYB、AP2、bZIP、NAC 转录因子家族基因数量较庞大, 在红花不同组织中均有分布。红花不同组织转录组文库注释结果统计显示 WRKY 是最大的 TF 家族, 含有 47 个基因成员。

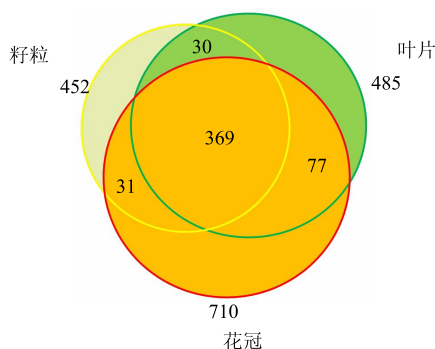


图 1 不同红花组织中表达的 TF 数量

Fig. 1 Quantity statistics of transcription factors in different tissues of *C. tinctorius*

2.2 红花 TF 的差异表达分析

TF 在红花不同组织间的表达存在差异性。组织间进行两两比较, 设置 3 种对比组。与籽粒相比, 叶片中共有 98 个 TF 转录水平发生变化, 上调表达的 TF 有 30 个, 下调表达的 TF 有 68 个。表达倍数变化浮动为 8.61~10.89 倍, 服从正态分布。表达上调或下调基因数量最多的 2 个 TF 家族分别是 WRKY 及 AP2 (图 2)。与叶片相比, 花冠中共有 92 个 TF 转录水平发生变化, 上调表达的 TF 共 63 个, 29 个 TF 下调表达。表达倍数变化浮动为 9.33~8.37 倍。表达上调或下调基因数量最多的 2 个 TF 家族分别是 WRKY 及 AP2 (图 3)。与籽粒比较, 花

冠中共有 103 个 TF 发生差异表达, 75 个 TF 表达上调, 下调的 TF 有 28 个, 表达倍数变化浮动为 11.15~10.16 倍。其中表达上调或下调基因数量最多的 2 个 TF 家族分别为 MYB、AP2 (图 4)。整体观察各对比组中 TF 家族差异表达基因数量, 结果发现, 花冠组织中上调表达的 MYB 家族基因数量较多, 该结果提示 MYB 可能是研究红花花冠发育、黄色素合成、黄酮代谢等分子调控机制中需重点关注的一个 TF 家族。

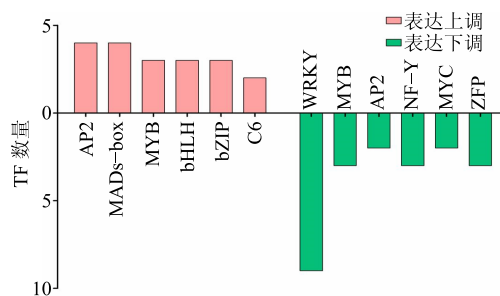


图 2 与籽粒比较叶片中上调与下调表达差异基因最多的 6 个 TF 家族

Fig. 2 Different expressed transcription factor families and numbers in tissues of *C. tinctorius*

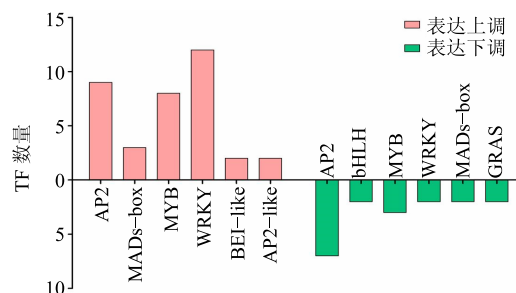


图 3 与叶片比较花冠中上调与下调表达差异基因最多的 6 个 TF 家族

Fig. 3 Different expressed transcription factor families and numbers in tissues of *C. tinctorius*

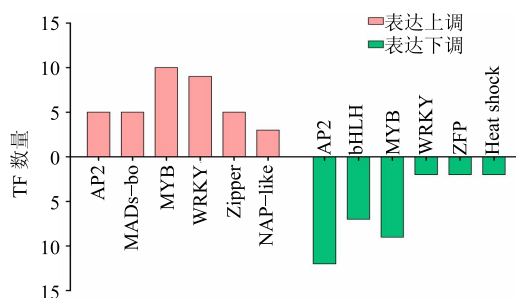


图 4 与籽粒比较花冠中上调与下调表达差异基因最多的 6 个 TF 家族

Fig. 4 Different expressed transcription factor families and numbers in tissues of *C. tinctorius*

2.3 MYB 的荧光定量 PCR 表达分析

对组织间表达差异的 MYB 转录因子家族,利用实时荧光定量 PCR 对基因进行表达分析。实时定量结果显示,与转录组测序的 RPKM 结果相比较,12 个候选的 TF 中 8 个 (66%) MYB 基因在不同组织间的表达趋势变化基本一致 (图 5),另一个 MYB Unigen6961 在籽粒和花冠组织中的表达差异变化趋势与实时定量结果变化一致。在 8 个验证正确的基因中,有 3 个 MYB

基因相较于籽粒、叶片组织,在花冠中表达水平最高。以上结果说明转录组测序数据分析的准确性。

2.4 CtMYB 转录因子家族的序列保守域分析

红花转录组数据中共注释到 42 个 MYB 基因,通过 CDS (编码蛋白序列) 和反式作用元件 DNA 结合域结构筛选,最终有 20 个 MYB 转录因子序列通过检测,注释为 CtMYB。编码氨基酸数量分布从 20 到 90 个 (表 2)。

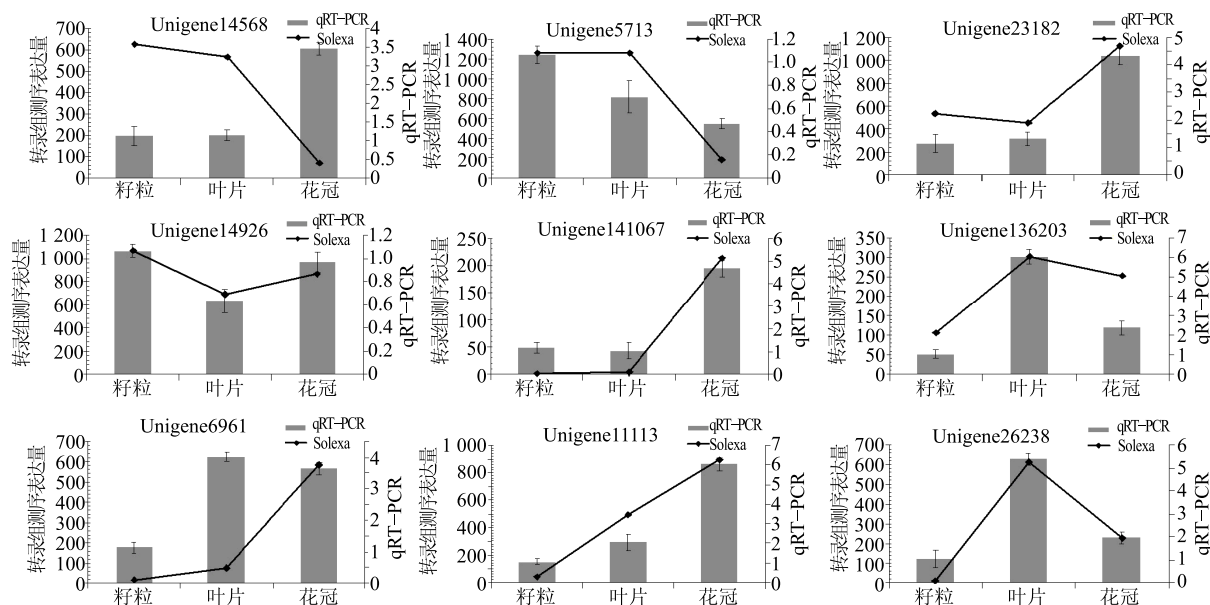


图 5 红花不同组织 MYB 的 qRT-PCR 表达分析

Fig. 5 Expression level analysis of transcription factor in *Carthamus tinctorius* by qRT-PCR

表 2 红花 MYB 家族注释

Table 2 MYB family annotation in safflower

基因名称	序列长度/bp	起始位点/bp	终止位点/bp	氨基酸数量	Nr 注释	参考物种
Unigene145952	287	2	280	93	MYB TF	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>
Unigene6386	880	149	880	244	MYB TF	长春花 <i>Catharanthus roseus</i>
Unigene6961	834	3	638	212	MYB TF	长春花
Unigene83130	406	77	406	110	MYB TF	长春花
Unigene151153	428	115	426	104	MYB TF	还魂草 <i>Craterostigma plantagineum</i>
Unigene141067	238	2	238	79	MIXTA-like 2	金鱼草 <i>Antirrhinum majus</i>
Unigene84006	746	1	366	183	MYB117	大豆 <i>Glycine max</i>
Unigene127655	660	8	448	147	MYB161	大豆
Unigene26652	419	99	419	107	MYB178	大豆
Unigene5713	836	3	704	234	MYB62	大豆
Unigene16573	884	34	705	336	MYB62	大豆
Unigene98891	367	130	240	37	MYB84	大豆
Unigene76516	1 353	100	1 068	323	MYB1 protein	非洲菊 <i>Gerbera hybrid</i>
Unigene78028	983	86	982	299	MYB12	非洲菊
Unigene112604	268	6	266	87	MYB2	石斛 <i>Dendrobium sp.</i>
Unigene24552	346	92	346	85	MYB21	苹果 <i>Malus × domestica</i>
Unigene82674	349	1	342	114	MYB23	苹果
Unigene2594	780	165	779	205	MYB3R3	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>
Unigene136203	204	1	204	68	MYB73	拟南芥
Unigene149429	353	86	352	89	MYB73	拟南芥

将 CtMYB 氨基酸序列数据提交至 MEME 数据库, 保守结构分析共获得 3 个蛋白序列保守域模型, Motif1 (期望值 $3.8 \times e^{-161}$)、Motif2 ($3.4 \times e^{-111}$)、Motif3 ($1.0 \times e^{-79}$) (图 6)。以红花已知 MYB 编码蛋白序列 gi748937755 作为参照, 4 个 Unigene 含有 Motif1、Motif2、Motif3 3 个序列保守域, 9 个 Unigene 仅含有 Motif2 序列保守域, 其余 Unigene 含有 2 个序列保守域: Motif1 和 Motif2, 或 Motif1 和 Motif3。序列保守域在 CtMYB 氨基酸序列的分布见图 7, 横坐标标示为蛋白序列长度。

2.5 CtMYB 转录因子家族的系统发育分析

由于 CtMYB 蛋白序列间相似度差异较大, 选择最大简约法 MP 构建 20 个 CtMYB 的系统进化树 (图 8)。聚类结果显示 CtMYB 聚为 2 个亚族, Unigene112604、Unigene24552、Unigene76516、Unigene151153、Unigene98891 共 5 个 TF 与红花 MYB 转录因子 Gi748937755 进化关系较近, 聚为一个亚族。Unigene145952 等 8 个 TF 聚为另一亚族, 与 Gi748937755 进化关系较远。而亲缘关系最近的 2 个 MYB 基因为 Unigene6386 和 Unigene83130,

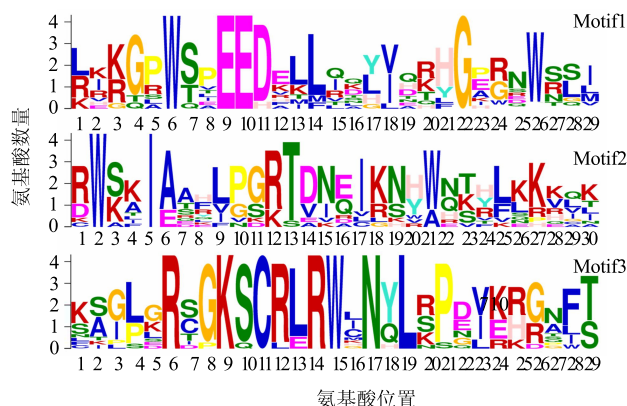


图 6 红花 MYB 家族的 3 个保守结构域序列模型

Fig. 6 Three conserved Motif sequence models of safflower CtMYB

分别编码 243 和 109 个氨基酸, 在不同组织中转录组 RPKM 表达趋势相近。Unigene6386 和 Unigene83130 在籽粒中表达量分别是花冠中的 3.95 倍和 2.93 倍, 在叶片中表达量分别是花冠中的 3.90 倍和 3.67 倍。推测 Unigene6386 和 Unigene83130 在红花中执行的分子功能可能相同。另一组同源关系较近的 2 个 TF 为 Unigene149429 和 Unigene136203, Nr 蛋白注释均为 MYB73, 蛋白信

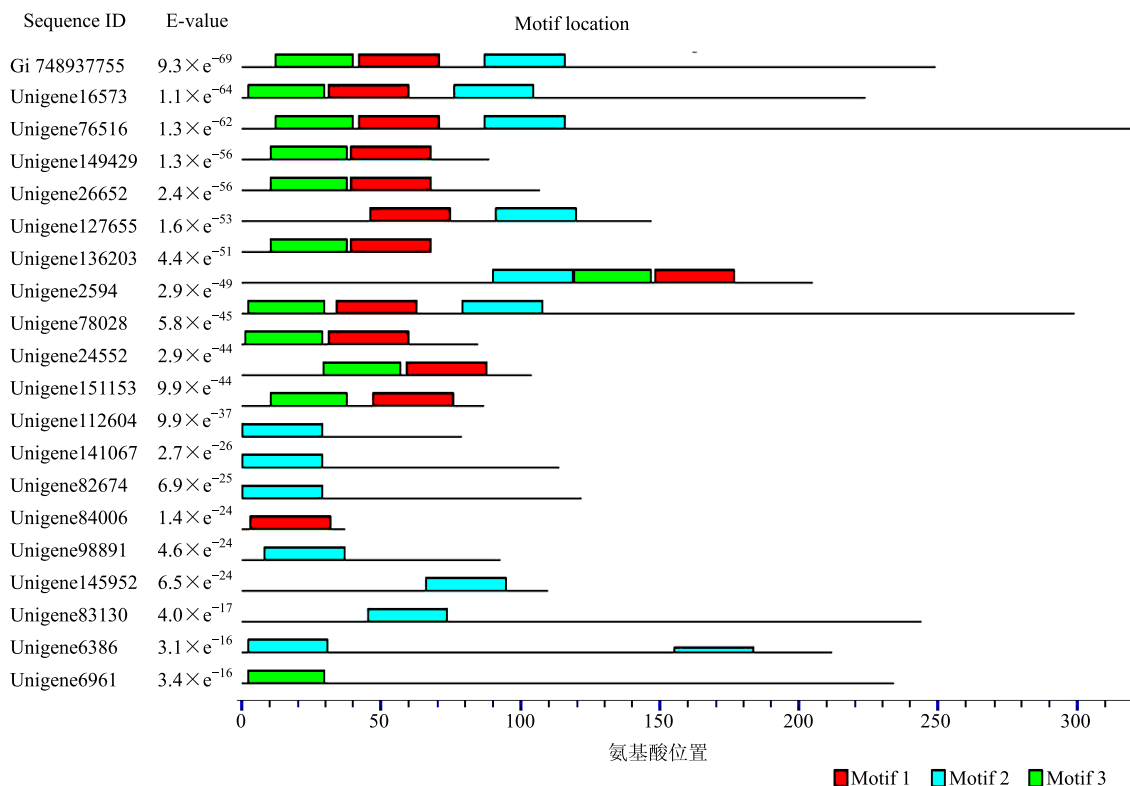


图 7 红花 MYB 家族的保守结构域分布

Fig. 7 Motif location of CtMYB in *C. tinctorius*

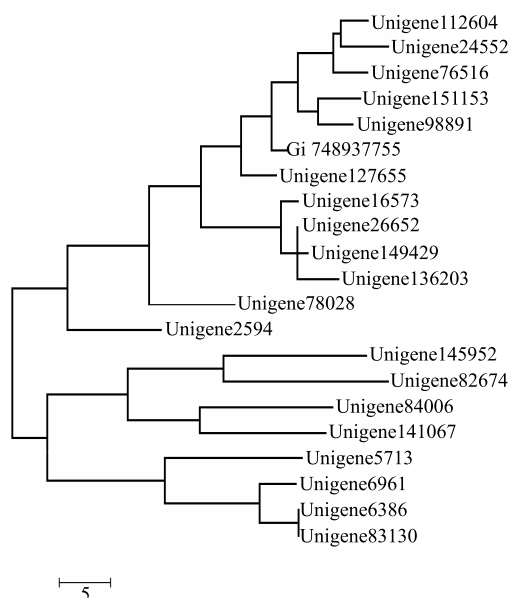


图 8 CtMYB 转录因子家族的系统进化树

Fig. 8 Phylogenetic tree of CtMYB

息相同,但基因序列存在差异,推测 Unigene149429 和 Unigene136203 的基因序列差异可能是由转录本的可变剪切(AS)引起的。

3 讨论

拟南芥、水稻、小麦、玉米等^[9-12]植物因清晰的基因组背景,为相关功能基因鉴定、物种进化、全基因组关联分析、SSR 等研究提供了大量参考信息,但红花属于非模式植物,其遗传背景尚不明确,对于红花相关的功能基因及表达调控研究都带来一定的限制。转录组数据挖掘技术能够有效的鉴定功能基因、TF、非编码 RNA 等遗传信息,为相关物种的遗传信息鉴定、基因表达图谱绘制、代谢途径挖掘、分子功能鉴定提供了数据参考。目前,葡萄、丹参、甜瓜等^[13-15]植物已相继借助转录组测序技术挖掘了相关的功能基因及差异表达调控研究。为在分子表达调控水平上开发红花的经济价值和医学价值,本研究基于红花不同组织文库的 Solexa 转录组数据鉴定了红花 TF 家族及成员数量,得到了丰富的 TF 基因、表达及序列信息。为红花及相关物种的基因表达调控研究提供了数据支持。

本研究通过红花不同组织的 TF 表达及比较鉴定到了 WRKY、AP2、MYB、WD40、MADS-box 转录因子家族。WRKY 是植物特有的一类 TF,家族规模较大,主要参与植物衰老、干旱胁迫、磷胁迫等功能^[16-19]。最新发现 WRKY 通过响应赤霉素(GA)调控植物短日照下开花过程^[20]。AP2/ERF 转

录因子也是植物中广泛参与非生物胁迫调控的一类基因家族,多项研究均提示 AP2/ERF 通过 ABA 信号通路参与干旱调控^[21-23]。在此研究基础上,AP2/ERF 据报道还与冷胁迫、盐碱胁迫调控相关^[24]。Byun 等^[25]发现 DaCBF7 的组成性表达可提高水稻的耐低温能力。Agarwal 等^[26]研究指出 DREB2A 的过表达引起烟草抗渗透压能力增强。AP2/ERF 也参与植物的生物合成过程。Wuddineh 等^[27]发现一个 ERF 基因 ERF001 过表达可引起柳枝稷的糖合成水平增加。本研究发现红花 WRKY、AP2 家族在各组织中的基因数量及表达差异变化,说明 WRKY、AP2 对红花的衰老、逆境胁迫及激素应答起到了重要调控作用,是研究红花生物及非生物胁迫机制需关注的 TF 家族。MADS-box 是一类保守的 TF 家族,多用于研究植物发育调控和分子进化, MADS-box 与植物器官特异性形成有关^[28]。Chang 等^[29]在花器官的分化过程中,鉴定到 1 个 MADS-box 亚家族,调控花瓣和雄蕊的组织分化。Kramer 等^[30]研究发现,兰花 MADS-box2、MADS-box3 及 MADS-box4 基因分别在花萼、花被、花瓣中特异表达。以上研究均提示 MADS-box 与花器官的分化和发育调控相关。本研究发现 MADS-box 家族在花冠中基因数量和表达水平波动较为显著,推测 MADS-box 对红花的花器官分化及组织特异性具有调控作用。

MYB 家族主要与植物逆境适应性调控有关,例如 R2R3-MYB 作为 ABA 信号通路的负调控因子参与干旱响应过程^[31]; He 等^[32]研究报道 ChiMYB 表达与盐胁迫调控相关,ChiMYB 过表达后引起拟南芥抗盐能力增强。最新发现 MYB 转录因子介导植物生物合成通路,调控包括脂类及次生代谢产物等的合成。花青素^[33]、果皮褐色素^[34]、苯丙烷^[35]等黄酮类次生代谢产物合成均与 MYB 表达调控相关。黄酮及衍生物合成过程中,MYB 调控黄酮合成通路中二氢黄酮醇还原酶(DFR)基因的转录,进而影响植物的黄酮类次生代谢产物量^[36]。在本研究中红花花冠组织中鉴定到了大量表达差异的 MYB 家族,MYB 家族氨基酸序列包含 3 个保守的蛋白核心结构,在进化上展现家族保守特征。黄酮及类黄酮是红花中的主要药用活性成分,CtMYB 家族成员主要在花冠中差异表达,暗示 CtMYB 可能与 DFR 基因启动子结合,介导红花黄酮合成通路中限速酶基因 DFR 的时空表达,从而影响黄酮和类黄酮的产量变化。CtMYB 是红花黄酮类次生代谢产

物合成的必须调控因子, 因此 CtMYB 鉴定与表达调控研究有助于明确红花黄酮的合成机制, 为使用基因工程手段开发红花的药用价值奠定基础。

参考文献

- [1] Mahr R, Frunzke J. Transcription factor-based biosensors in biotechnology: Current state and future prospects [J]. *Appl Micro Biot*, 2016, 100(1): 79-90.
- [2] Farquharson K L. A domain in the bHLH transcription factor DYT1 is critical for anther development [J]. *Plant Cell*, 2016, 28(5): 997-998.
- [3] Zhai R, Wang Z, Zhang S, *et al*. Two MYB transcription factors regulate flavonoid biosynthesis in pear fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67(5): 1275-1284.
- [4] Schwinn K E, Boase M R, Bradley J M, *et al*. MYB and bHLH transcription factor transgenes increase anthocyanin pigmentation in petunia and lisianthus plants, and the petunia phenotypes are strongly enhanced under field conditions [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 603(5): 1-11.
- [5] Franco-Zorrilla J M, Lopez-Vidriero I, Carrasco J L, *et al*. DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(6): 2367-2372.
- [6] Li H, Dong Y, Yang J, *et al*. *De novo* transcriptome of safflower and the identification of putative genes for oleosin and the biosynthesis of flavonoids [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30987.
- [7] Li R, Yu C, Li Y, *et al*. SOAP2: An improved ultrafast tool for short read alignment [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(15): 1966-1967.
- [8] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, *et al*. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. *Nat Methods*, 2008, 5(7): 621-628.
- [9] Briskine R V, Paape T, Shimizu-Inatsugi R, *et al*. Genome assembly and annotation of *Arabidopsis halleri*, a model for heavy metal hyperaccumulation and evolutionary ecology [J]. *Mol Ecol Resour*, 2016, 9(27): 1-12.
- [10] Lee K J, Kwon S J, Hwang J E, *et al*. Genome-wide expression analysis of a rice mutant line under salt stress [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(4): 1-15.
- [11] Dong Y, Liu J, Zhang Y, *et al*. Genome-wide association of stem water soluble carbohydrates in bread wheat [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0164293.
- [12] Song X Y, Zhang Y Y, Wu F C, *et al*. Genome-wide analysis of the maize (*Zea mays* L.) CPP-like gene family and expression profiling under abiotic stress [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(3): 1-11.
- [13] Wu J, Zhang Y, Zhang H, *et al*. Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurensis* grape responding to downy mildew by using solexa sequencing technology [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 234(10): 1-16.
- [14] Emrich S J, Barbazuk W B, Li L, *et al*. Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing [J]. *Genome Res*, 2007, 17(1): 69-73.
- [15] Mu Y, Ding F, Cui P, *et al*. Transcriptome and expression profiling analysis revealed changes of multiple signaling pathways involved in immunity in the large yellow croaker during *Aeromonas hydrophila* infection [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 506-519.
- [16] Dai X, Wang Y, Zhang W H. OsWRKY74, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67(3): 947-960.
- [17] 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(1): 1104-1117.
- [18] Wang L, Zheng L, Zhang C, *et al*. ThWRKY4 from *Tamarix hispida* can form homodimers and heterodimers and is involved in abiotic stress responses [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 27097-27106.
- [19] Rinerson C I, Scully E D, Palmer N A, *et al*. The WRKY transcription factor family and senescence in switchgrass [J]. *BMC Genom*, 2015, 16(1): 912-928.
- [20] Li W, Wang H, Yu D. The Arabidopsis WRKY transcription factors WRKY12 and WRKY13 oppositely regulate flowering under short-day conditions [J]. *Mol Plant*, 2016, 9(11): 1492-1503.
- [21] Rabara R C, Tripathi P, Rushton P J. The potential of transcription factor-based genetic engineering in improving crop tolerance to drought [J]. *OMICS*, 2014, 18(10): 601-614.
- [22] Du C, Hu K, Xian S, *et al*. Dynamic transcriptome analysis reveals AP2/ERF transcription factors responsible for cold stress in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. *Mol Genet Genomics*, 2016, 291(3): 1053-1067.
- [23] Zhang Z W, Feng L Y, Cheng J, *et al*. The roles of two transcription factors, ABI4 and CBFA, in ABA and plastid signalling and stress responses [J]. *Plant Mol Biol*, 2013, 83(4/5): 445-458.
- [24] Gahlaut V, Jaiswal V, Kumar A, *et al*. Transcription factors involved in drought tolerance and their possible role in developing drought tolerant cultivars with emphasis on wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2016, 129(11): 2019-2042.

- [25] Byun M Y, Lee J, Cui L H, *et al.* Constitutive expression of DaCBF7, an Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* CBF homolog, resulted in improved cold tolerance in transgenic rice plants [J]. *Plant Sci*, 2015, 236(6): 61-74.
- [26] Agarwal P, Agarwal P K, Joshi A J, *et al.* Overexpression of PgDREB2A transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(2): 1125-1135.
- [27] Wuddineh W A, Mazarei M, Turner G B, *et al.* Identification and molecular characterization of the switchgrass AP2/ERF transcription factor superfamily, and overexpression of PvERF001 for improvement of biomass characteristics for biofuel [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2015, 20(3): 101.
- [28] Yan L, Wang X, Liu H, *et al.* The Genome of *Dendrobium officinale* Illuminates the biology of the important traditional Chinese orchid herb [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(6): 922-934.
- [29] Chang Y Y, Kao N H, Li J Y, *et al.* Characterization of the possible roles for B class MADS box genes in regulation of perianth formation in orchid [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(2): 837-853.
- [30] Kramer E M, Jaramillo M A, Di Stilio V S. Patterns of gene duplication and functional evolution during the diversification of the AGAMOUS subfamily of MADS box genes in angiosperms [J]. *Genetics*, 2004, 166(2): 1011-1023.
- [31] Gao F, Yao H, Zhao H, *et al.* Tartary buckwheat FtMYB10 encodes an R2R3-MYB transcription factor that acts as a novel negative regulator of salt and drought response in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 12(109): 387-396.
- [32] He M, Wang H, Y Z L, *et al.* Cloning and characterization of ChiMYB in *Chrysanthemum indicum* with an emphasis on salinity stress tolerance [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(3): 1-17.
- [33] Zhou H, Peng Q, Zhao J, *et al.* Multiple R2R3-MYB transcription factors involved in the regulation of anthocyanin accumulation in peach flower [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 1557(7): 1-11.
- [34] Legay S, Guerriero G, Andre C, *et al.* MdMyb93 is a regulator of suberin deposition in russeted apple fruit skins [J]. *New Phytol*, 2016, 212(4): 977-991.
- [35] Soler M, Plasencia A, Lepikson-Neto J, *et al.* The woody-preferential gene EgMYB88 regulates the biosynthesis of phenylpropanoid-derived compounds in wood [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 22(7): 1422-1428.
- [36] Ravaglia D, Espley R V, Henry-Kirk R A, *et al.* Transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in nectarine (*Prunus persica*) by a set of R2R3 MYB transcription factors [J]. *BMC Plant Biol*, 2013, 13(68): 1-14.