

丹参转录因子 SmWRKY14 基因的克隆及表达分析

陈 尘^{1,2}, 张 燕¹, 李 林², 王 之², 李淑娟^{1*}

1. 陕西省植物资源保护与利用工程技术研究中心, 陕西省西安植物园 (陕西省植物研究所), 陕西 西安 710061

2. 陕西师范大学生命科学学院, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 教育部药用资源与天然药物化学重点实验室, 陕西 西安 710119

摘要: 目的 克隆丹参 *Salvia miltiorrhiza* 转录因子基因 SmWRKY14, 分析其在不同组织及应答环境因子和植物激素过程中的表达特征。方法 以丹参转录组数据中 Unigene (c50007_g1) 序列为参考, 利用 PCR 扩增获得 SmWRKY14 基因序列。通过生物信息软件及在线工具预测基因编码蛋白的理化性质、蛋白质结构等分子特征, 采用 DNAMAN 和 MEGA 6.0 分别进行氨基酸多序列比对和进化树构建, 运用实时荧光定量 PCR 检测该基因的表达模式。结果 克隆得到 SmWRKY14 基因 cDNA 全长 1 103 bp, 编码 244 个氨基酸, 相对分子质量 27 600, 等电点 8.19。该蛋白含有 WRKY 特征基序, 不含信号肽及跨膜结构域, 其高级结构主要由无规卷曲构成。进化树分析表明 SmWRKY14 蛋白与柿 WRKY14 蛋白的亲缘关系最近。SmWRKY14 基因在丹参中各器官中为组成型表达, 且该基因与丹参酮合成关键酶基因 DXS、GGPPS、CPS 的表达模式相似, 且受茉莉酸甲酯、脱落酸、赤霉素等植物激素及机械损伤的强烈诱导。结论 获得丹参 SmWRKY14 基因序列、生物信息及表达特征, 为研究 WRKY 家族成员调控丹参酮类化合物的合成、应答植物激素及参与防御反应的分子机制提供理论依据。

关键词: WRKY 基因; 序列分析; 表达模式; PCR; 丹参

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)21-5590-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.024

Cloning and expression analysis of WRKY family member SmWRKY14 in *Salvia miltiorrhiza*

CHEN Chen^{1,2}, ZHANG Yan¹, LI Lin², WANG Zhe-zhi², LI Shu-juan¹

1. Shaanxi Engineering Research Centre for Conservation and Utilization of Botanical Resources, Xi'an Botanical Garden of Shaanxi Province, Institute of Botany of Shaanxi Province, Xi'an 710061, China

2. National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest of China, Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China

Abstract: Objective To clone a WRKY protein gene SmWRKY14 with full length cDNA from *Salvia miltiorrhiza* and carry out bioinformatics and expression analysis in different tissues and response to environmental factors and phytohormone. **Methods** The PCR was performed based on the sequence of Unigene (c50007_g1) searched from our transcriptome database, and characteristics of physiochemical properties, conserved domains and structure prediction of the protein were determined using a series of bioinformatics tools. The analyses of multiple alignment and phylogenetic tree were performed using DNAMAN and MEGA 6.0, respectively. Real-time quantitative PCR was used for gene expression analysis. **Results** In this study, the full length cDNA of SmWRKY14 was 1103 bp in size, encoding a 244-aa protein with a molecular weight of 27.6 KDa and an isoelectric point of 8.19. SmWRKY14 was an unstable hydrophilic protein containing characteristic and conserved WRKY domain without signal peptide or transmembrane domain. The main secondary structure of the amino acid sequences was random coil. Moreover, multiple sequence alignments and phylogenetic trees showed that SmWRKY14 protein had high homology with WRKY14 of *Diospyros kaki*. Quantitative real-time PCR indicated that SmWRKY14 constitutively expressed in the roots, stems, leaves and flowers of *S. miltiorrhiza* and was strongly induced by methyl jasmonate, abscisic acid, gibberellins, and mechanical wound, which indicated

收稿日期: 2020-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31800259); 国家自然科学基金资助项目 (31670299); 陕西省科技厅陕西省自然科学基金基础研究计划资助项目 (2018JQ3033); 陕西省科技厅重点研发项目 (2017NY-028); 陕西省科学院重大项目 (2016K-08)

作者简介: 陈 尘 (1988 年—), 女, 陕西西安人, 助理研究员, 博士, 研究方向为药用植物资源开发与分子育种。E-mail: chenchen@xab.ac.cn
***通信作者** 李淑娟, 女, 研究员, 研究方向为宿根类药用植物资源开发应用。Tel/Fax: (029)85251750 E-mail: lishujuanxbg@163.com

SmWRKY14 could participate in regulation of biosynthesis of tanshinones and defense process. **Conclusion** The gene sequences of SmWRKY14 was successfully cloned and the bioinformatics and expression pattern analysis was carried out, which will provide a foundation for further research on the molecular mechanism of regulation of tanshinones synthesis and response to defense process in *S. miltiorrhiza*.

Key words: WRKY gene; sequence analysis; expression pattern; PCR; *Salvia miltiorrhiza* Bge.

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 是我国重要的药用植物之一, 属唇形科鼠尾草属, 其根和根茎可入药^[1-2]。丹参含有丰富的活性成分, 以丹参酮 II_A、丹参酮 I 等为代表的丹参酮类化合物被广泛应用于心脑血管疾病、炎症甚至癌症的治疗^[3-5]。作为“模式药用植物”, 丹参基因组及多个转录组数据被报道, 其遗传背景逐步解析。在此基础上, 大量丹参酮和丹酚酸合成途径上关键酶基因被克隆^[6-10], 多个具有调控功能的转录因子家族如 MYB、bHLH、SPL 等被报道^[11-14], 这些研究成果为运用分子生物学技术调控丹参的次生代谢过程提供了研究依据。

植物特有的 WRKY 转录因子家族参与调控植物响应多种环境因子及生物胁迫, 例如干旱、高温、盐胁迫、病虫害入侵等生理过程^[15-16]。WRKY 转录因子家族最重要的结构特点是含有保守的 DNA 结合区域, 该结构域由大约 60 个保守的氨基酸序列组成, 其中由 WRKYGQK 构成 WRKY 的核心保守区^[17]。并且, WRKY 蛋白能够特异识别并结合基因启动子区域的顺式作用元件 W-box 发挥其转录调节作用^[16,18]。

Ishiguro 最先从红薯中克隆 WRKY 基因^[19], 随后, 绿藻、苔藓、拟南芥、玉米、水稻、葡萄、番茄、大豆等多种植物的 WRKY 基因纷纷报道^[20-26]。研究表明, WRKY 基因能够响应环境中生物因子和非生物因子的胁迫。过表达 GmWRKY27 基因的拟南芥耐寒性显著提高; 过表达 GmWRKY54 显著提高了拟南芥对盐胁迫和干旱的耐受力^[27]。同时 WRKY 基因还参与植物响应 UV-B、强光照等非生物胁迫^[28-29]。另外, WRKY 基因在植物次生代谢产物合成和植物的防御反应中发挥调控作用。例如, 棉花中 WRKY1 参与棉花中棉酚的合成^[30]; 长春花 WRKY1 参与长春花碱的合成^[31]; 烟草中的 WRKY6 则参与挥发性萜类物质的合成, 可能与防御过程相关^[32]; 辣椒中的 WRKY40 参与抵御 *Ralstonia solanacearum* 入侵的过程^[33]。此外, WRKY 基因也参与调控种子萌发、开花、果实成熟等发育过程^[34-37]。

为研究转录因子 WRKY 在丹参次生代谢合成

以及应答环境胁迫中的功能, 本研究在对丹参进行转录组测序的基础上^[38], 经分析比对获得 unigene c50007_g1。以此序列为模板设计引物, 克隆得到丹参 WRKY 基因 cDNA 序列, 命名为 SmWRKY14, 并对其编码蛋白理化性质、蛋白结构、进化树等进行生物信息学分析, 并对其在丹参不同部位以及不同处理下的表达模式进行研究, 为进一步深入研究该基因功能提供研究依据。

1 材料

丹参种子采自陕西省植物研究所药用植物园, 经陕西省西安植物园黎斌副研究员鉴定为唇形科鼠尾草属植物 *S. miltiorrhiza* Bge. 的种子。

pMD-19T Simple 载体购自大连 TaKaRa 生物公司, DH5 α 为实验室保存。植物 Total RNA 提取试剂 RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue、反转录试剂盒 PrimeScriptTM II Reverse Transcriptase、T4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa); FastStart Universal SYBR Green Master, 购自上海罗氏制药有限公司; 质粒提取试剂盒购自 OMEGA Engineering, Inc.; 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、高纯度质粒大提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

2 方法

2.1 植物材料

将种子置于铺湿滤纸的培养皿上萌发, 之后转入培养基质(蛭石: 草木灰 1: 1.5)中进行培养, 培养条件: 每日光照 16 h, 温度 (25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C; 光照强度 2 000 lx; 湿度 80%; 黑暗 8 h, 温度 (25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 湿度 60%。培养 30 d 后的丹参幼苗用于核酸提取及赤霉素 (GA₃)、脱落酸 (ABA)、机械伤害、茉莉酸 (JA) 处理^[39]。丹参根、叶、茎、花组织取自温室培育的两年生丹参植株, 采集后立即用液氮速冻; 将根组织的周皮、韧皮部及木质部分离, 立即液氮速冻; 将速冻的植物材料放在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2.2 总 RNA 提取与反转录

按照 RNAiso Plus 植物总 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa 公司, 中国) 说明书所述方法提取丹参根、

茎、叶、花等各组织总 RNA, 利用 NanoDrop™ 2000c 分光光度计 (Thermo Fisher 公司, 美国) 检测所提总 RNA 的浓度与纯度; 将样品总 RNA 按照 PrimeScript™ II Reverse Transcriptase 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司, 中国) 进行 cDNA 第一链的合成。

2.3 SmWRKY14 基因的克隆

搜索实验室保存的丹参转录组数据库中的序列信息获得 1 条 Unigene (c50007_g1), 经比对为丹参 WRKY 家族基因。在 Unigene c50007_g1 的 ORF 两端设计扩增完整编码区的引物, 上游引物 SmWRKY-F: 5'-ATGTCTGATGCAGACAATTAC-AAGA-3', 下游引物 SmWRKY-R: 5'-TGGGTGTTGAAGAAAAGATGAA-3'。以丹参叶片 cDNA 为模板, 扩增 SmWRKY14 基因全长。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 反应结束后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司, 中国] 回收目的条带, 并将其连接 pMD19-T simple 载体 (TaKaRa 公司, 中国) 后转化至大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆进行 PCR 验证, 无误后送至上海生工测序公司测序。获得的序列经过拼接、比对, 获得基因全长序列信息。

2.4 SmWRKY14 基因生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件将测序所得 SmWRKY14 核酸序列翻译成氨基酸序列, 并用 DNASTar 软件及 ProtParam 分析核酸及氨基酸序列的组成成分、理化性质。利用 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/>) 进行氨基酸序列的同源性比对; 利用 Signal P 和 TMHMM 分析蛋白的信号肽及跨膜结构域; 利用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 分析预测蛋白质的二级、三级结构。运用 MEGA 6.0 软件采用相邻连接法 (Neighbour-Joining) 构建多种植物 WRKY 蛋白的分子进化树。

2.5 SmWRKY14 基因表达模式分析

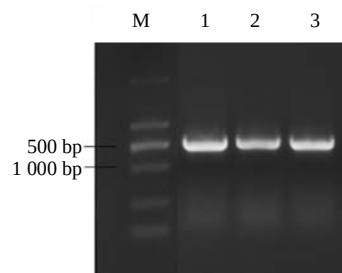
提取丹参各组织器官以及赤霉素、脱落酸、茉莉酸甲酯、伤害处理后的 RNA, 经过反转录后用作实时荧光定量 PCR 反应的模板。实时荧光定量 PCR 反应体系 20 μ L 中包含 10 μ L FastStart Universal SYBR Green Master Mix (Roche 公司, 美国), 5 μ L 稀释后 cDNA 模板, 3 μ L H₂O, 以及待扩增基因上下游引物各 1 μ L (10 mmol/L); 反应条件为 95 °C

预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C、1 min, 循环 40 次。以丹参 β -actin 基因 (注册号 DQ243702) 作为内参基因检测丹参 SmWRKY14 基因在不同样本中的表达量, 每个反应组设置 3 个平行。数据根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析处理, 用 SPSS 12.0 软件进行统计分析。

3 结果与分析

3.1 SmWRKY14 基因克隆及测序

提取新鲜的丹参叶片 RNA 并反转录成 cDNA, 以此为 PCR 扩增模板用引物 SmWRKY-F/R 进行扩增, 将扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得大小约为 700 bp 的特异条带 (图 1), 将该电泳条带进行切胶回收后测序。测序结果去除引物序列获得大小为 732 bp 的片段, 经比对命名为 SmWRKY14。



M-Marker 1~3-SmWRKY14 基因开放读码框扩增产物
M-Marker 1—3-PCR products of ORF of SmWRKY14

图 1 SmWRKY14 开放读码框扩增产物

Fig. 1 PCR amplification of ORF of SmWRKY14

3.2 SmWRKY14 蛋白理化特性

经 DNASTar 软件及在线工具 ProtParam 预测, SmWRKY14 蛋白分子式为 C₁₂₂₆H₁₈₄₅N₃₃₅O₃₇₁S₁₁, 由 244 个氨基酸组成, 相对分子质量为 27 600, 理论等电点 (PI) 为 8.19。SmWRKY14 蛋白含有 28 个碱性氨基酸和 26 个酸性氨基酸, 分别占 11.5% 和 10.6%, 色氨酸、脯氨酸和赖氨酸出现频率最高, 分别为 0.6%、9.4% 和 7.8%。SmWRKY14 蛋白含 63 个疏水性氨基酸和 80 个极性氨基酸, 蛋白表面带正电荷。SmWRKY14 蛋白总平均疏水性 (GRAVY) 为 -0.827, 脂肪系数为 46.63, 蛋白不稳定指数 (instability index II) 为 68.07, 提示 SmWRKY14 蛋白在细胞内为不稳定的亲水性蛋白。

3.3 SmWRKY14 蛋白结构域及高级结构预测

运用在线工具 SMART 分析 SmWRKY14 氨基

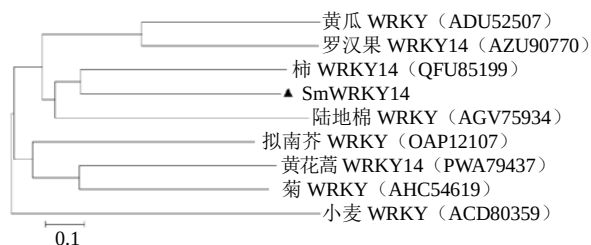


图 4 SmWRKY14 与其他 WRKY 家族蛋白进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree between SmWRKY14 and other WRKY family protein sequences

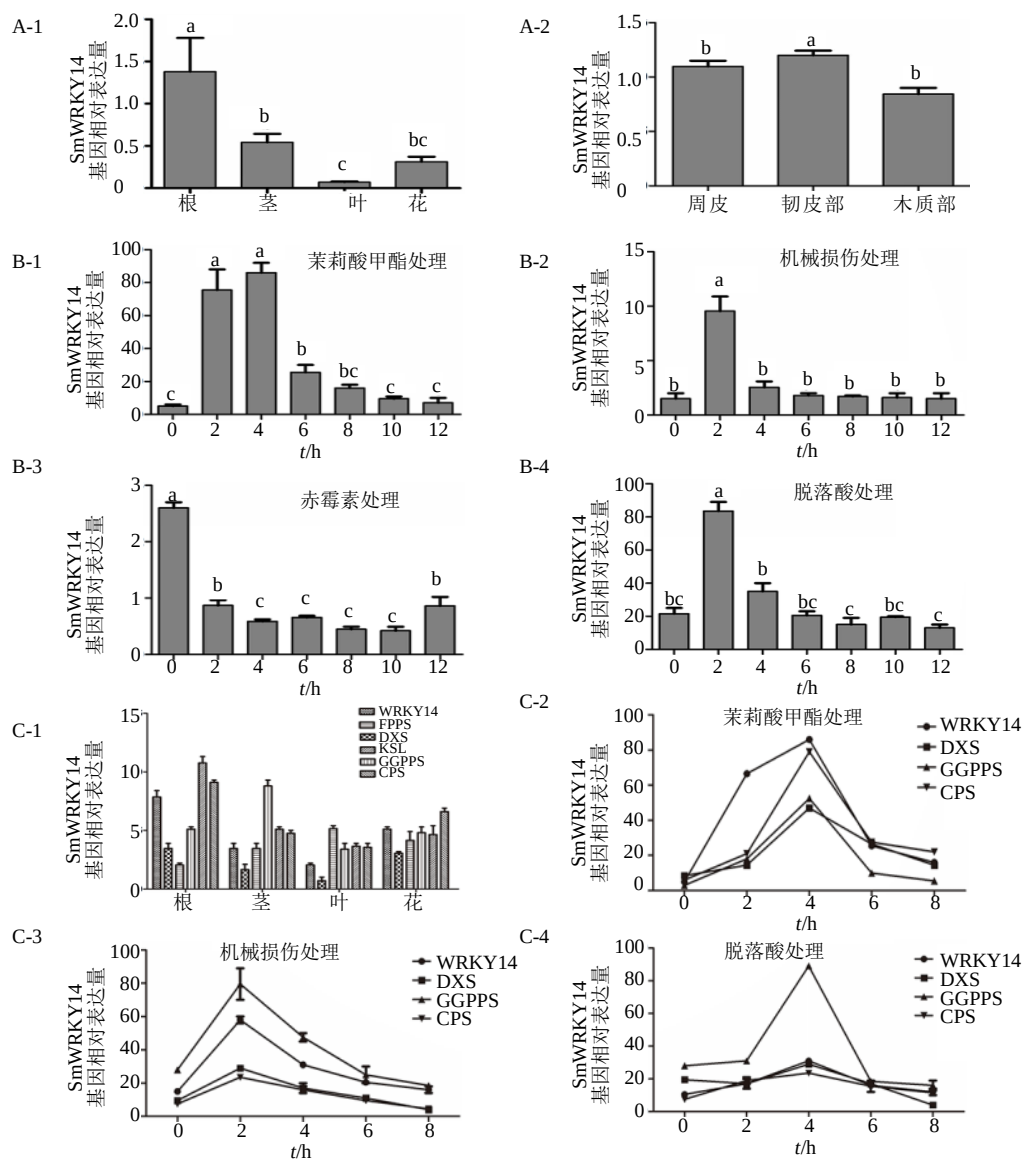
A-SmWRKY14 基因在不同组织器官中的表达模式 B-SmWRKY14 基因在不同处理下的表达模式 C-SmWRKY14 基因与 DXS、GGPPS 和 CPS 表达模式的一致性 不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ A-Expression pattern of SmWRKY14 in different tissues B-Expression pattern of SmWRKY14 under different treatments C-Expression consistence of SmWRKY14 and DXS, GGPPS, and CPS. Different letter represents significant difference, $P < 0.05$

图 5 SmWRKY14 基因表达模式

Fig. 5 Expression pattern of SmWRKY14

同时, SmWRKY14 受到植物激素的强烈诱导(图 5-B), 例如茉莉酸甲酯、脱落酸、赤霉素等, 同时也受机械损伤的诱导表达, 表明 SmWRKY14 基因参与丹参植物激素应答和防御过程, 同时也提示 SmWRKY14 有可能参与茉莉素与其他植物激素代谢调控网络的交互调控(Cross-talking), 显示出十分重要的生理功能。此外, SmWRKY14 基因与丹参酮合成途径关键酶基因 DXS、FPPS、GGPPS、CPS、KSL 在组织器官和不同诱导下的表达模式相似(图 5-C), 提示 SmWRKY14 与酶基因之间有潜在相关性。

4 讨论

WRKY 基因家族是植物特有的一类转录因子家族,参与植物的防御、抗逆、发育等生理过程调控,其家族成员众多,功能各异。菊花中 CmWRKY1 和 CmWRKY10 参与调节菊花耐旱性:在菊花中过表达 CmWRKY10 基因后诱导干旱相关基因表达;而 CmWRKY1 基因通过诱导 ABA 信号通路中的 PP2C、ABI1、MYB2、PYL2 等基因参与调控菊花耐旱过程^[40-41]。BcWRKYII、GhWRKY17、GsWRKY15 等基因分别提高了棉花、苜蓿对高盐的耐受性^[42-44]。茶树的 CsWRKY2 基因通过调控植物 ABA 信号,参与对冷胁迫的调控;在拟南芥中过表达葡萄 VpWRKY1 和 VpWRKY2 基因能提高拟南芥对冷的耐受,其中 VpWRKY2 还能提高拟南芥对盐胁迫和霜霉病害的抗性^[45-46]。

众多 WRKY 家族成员的报道中,关于 WRKY14 基因功能的研究较少。在水稻衰老过程中,WRKY14 基因作为关键成员参与了甲醇诱导的色氨酸及色氨酸衍生物的代谢过程^[47];棕榈的 WRKY14 基因在害虫 *Rhynchophorus ferrugineus* 的啃噬后被显著诱导,推测该基因参与棕榈的防御反应^[48];这些结果显示 WRKY14 基因可能参与植物的衰老过程及防御应答。Li 等^[49]基于丹参基因组数据发现 SmWRKY 家族基因成员众多,表达模式及响应模式都各不相同;茉莉酸甲酯处理后的转录组分析表明,9 条 SmWRKY 基因可能参与丹参酮合成过程^[50];Cao 等^[51]发现 SmWRKY1 在茎叶中表达量高,且调节丹参酮合成途径 DXR 基因的表达从而调控丹参酮合成过程;然而 SmWRKY14 基因的功能尚未见报道。

本研究以前期实验室测序获得的转录组数据为基础,克隆了 SmWRKY14 基因。该基因全长 732 bp,其编码蛋白序列含有 244 个氨基酸,包含 C2H2 型 WRKY 保守结构域,与陈尘^[39]基于丹参基因组数据库的预测基本一致。利用生物信息学工具预测丹参 WRKY14 为不稳定亲水蛋白,不含信号肽,为非跨膜蛋白,符合其作为转录因子调控基因表达的基本特征。进一步,利用 Realtime PCR 分析其表达模式,结果显示 SmWRKY14 基因在丹参酮合成部位韧皮部中表达最丰,并且与丹参酮合成途径关键酶基因 FPPS、GGPPS、CPS 和 KSL 等的表达具有相关性;推测其与丹参酮合成的调控相关。此外,SmWRKY14 基因受多种植物激素诱导表达,其可能

参与茉莉酸、水杨酸等应答信号通路,提示该基因具有应答植物激素的诱导并调控丹参次生代谢合成、抗逆、衰老等生理过程的潜在基础。

参考文献

- [1] 黄璐琦,戴住波,吕冬梅,等.探讨道地药材研究模式生物及模型[J].中国中药杂志,2009,34(9):1063-1066.
- [2] 宋经元,罗红梅,李春芳,等.丹参药用模式植物研究探讨[J].药学报,2013,48(7):1099-1106.
- [3] Kim S Y, Moon T C, Chang H W, et al. Effects of tanshinone I isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge on arachidonic acid metabolism and *in vivo* inflammatory responses[J]. *Phytother Res*, 2002, 16(7): 616-620.
- [4] Woo K S, Yip T W, Chook P, et al. Cardiovascular protective effects of adjunctive alternative medicine (*Salvia miltiorrhiza* and *Pueraria lobata*) in high-risk hypertension[J]. *Evidence-based Comple Alter Medi*, 2013, 26: 132912-132920.
- [5] 张金虎.丹参治疗冠心病的疗效及对患者载脂蛋白、内皮功能及炎症氧化指标的影响[J].基因组学与应用生物学,2017,36(12):4886-4892.
- [6] 高伟.丹参酮类化合物生物合成相关酶基因克隆及功能研究[D].北京:中国中医科学院,2008.
- [7] 王敬.丹参酮生物合成途径相关酶基因的克隆和特征分析[D].上海:上海师范大学,2009.
- [8] 邸鹏.丹参酚酸类成分生源途径的探索及相关基因的克隆与功能研究[D].上海:第二军医大学,2012.
- [9] 段艳冰.丹参中迷迭香酸生物合成途径的苯丙氨酸支路基因的克隆及研究[D].上海:第二军医大学,2006.
- [10] 侯学敏.丹参迷迭香酸合成途径关键酶基因的鉴定与分析[D].临汾:山西师范大学,2013.
- [11] Zhang X, Luo H M, Xu Z C, et al. Genome-wide characterisation and analysis of bHLH transcription factors related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11244-11256.
- [12] Li C L, Lu S F. Genome-wide characterization and comparative analysis of R2R3-MYB transcription factors shows the complexity of MYB-associated regulatory networks in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 277-286.
- [13] Ding K, Pei T L, Bai Z Q, et al. SmMYB36, a novel R2R3-MYB transcription factor, enhances tanshinone accumulation and decreases phenolic acid content in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5104-5109.
- [14] Zhang L S, Wu B, Zhao D G, et al. Genome-wide analysis and molecular dissection of the SPL gene family in *Salvia*

- miltiorrhiza* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2014, 56(1): 38-50.
- [15] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, *et al.* WRKY transcription factors [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15: 247-258.
- [16] 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.
- [17] 杨树, 陈尘, 王喆之, 等. 丹参 WRKY 家族成员 TRANSPARENT TESTA GLABRA2 (TTG2) 基因克隆与生物信息学分析 [J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2017, 45: 79-86.
- [18] Ciolkowski I, Wanke D, Birkenbihl R P, *et al.* Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 68(1/2): 81-92.
- [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]. *Mol Gen Genet*, 1994, 244(6): 563-571.
- [20] Zhang Y J, Wang L J. The WRKY transcription factor superfamily: Its origin in eukaryotes and expansion in plants [J]. *BMC Evol Biol*, 2005, 5: 1.
- [21] Ryu H S, Han M, Lee S K, *et al.* A comprehensive expression analysis of the WRKY gene superfamily in rice plants during defense response [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(8): 836-847.
- [22] Wang Q S, Wang M H, Zhang X Z, *et al.* WRKY gene family evolution in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetica*, 2011, 139(8): 973-983.
- [23] Huang S X, Gao Y F, Liu J K, *et al.* Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum* [J]. *Mol Genet Genomics*, 2012, 287(6): 495-513.
- [24] Wei K F, Chen J, Chen Y F, *et al.* Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in maize [J]. *DNA Res*, 2012, 19(2): 153-164.
- [25] Yin G J, Xu H L, Xiao S Y, *et al.* The large soybean (*Glycine max*) WRKY TF family expanded by segmental duplication events and subsequent divergent selection among subgroups [J]. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 148-152.
- [26] Wang M, Vannozzi A, Wang G, *et al.* Genome and transcriptome analysis of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family [J]. *Hortic Res*, 2014, 1: 14016.
- [27] 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.
- [28] Kilian J, Whitehead D, Horak J, *et al.* The AtGenExpress global stress expression data set: Protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses [J]. *Plant J*, 2007, 50(2): 347-363.
- [29] Zhao H S, Lou Y F, Sun H Y, *et al.* Transcriptome and comparative gene expression analysis of *Phyllostachys edulis* in response to high light [J]. *BMC Plant Biol*, 2016, 16: 34.
- [30] Xu Y H, Wang J W, Wang S, *et al.* Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)-delta-cadinene synthase-A [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(1): 507-515.
- [31] Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, *et al.* The transcription factor CrWRKY1 positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(4): 2081-2093.
- [32] Skibbe M, Qu N, Galis I, *et al.* Induced plant defenses in the natural environment: *Nicotiana attenuata* WRKY3 and WRKY6 coordinate responses to herbivory [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(7): 1984-2000.
- [33] Dang F F, Wang Y N, Yu L, *et al.* CaWRKY40, a WRKY protein of pepper, plays an important role in the regulation of tolerance to heat stress and resistance to *Ralstonia solanacearum* infection [J]. *Plant Cell Environ*, 2013, 36(4): 757-774.
- [34] Johnson C S, Kolevski B, Smyth D R. TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(6): 1359-1375.
- [35] Robatzek S, Somssich I E. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(9): 1139-1149.
- [36] Besseau S, Li J, Palva E T. WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(7): 2667-2679.
- [37] Yu Y C, Hu R B, Wang H M, *et al.* MIWRKY12, a novel *Miscanthus* transcription factor, participates in pith secondary cell wall formation and promotes flowering [J]. *Plant Sci*, 2013, 212: 1-9.
- [38] Hua W P, Zhang Y, Song J, *et al.* De novo transcriptome sequencing in *Salvia miltiorrhiza* to identify genes involved in the biosynthesis of active ingredients [J].

- Genomics*, 2011, 98(4): 272-279.
- [39] 陈 尘. 丹参茉莉素信号通路关键成员COI1基因功能研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2017.
- [40] Jaffar M A, Song A P, Faheem M, *et al.* Involvement of CmWRKY10 in drought tolerance of *Chrysanthemum* through the ABA-signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): E693.
- [41] Fan Q Q, Song A P, Jiang J F, *et al.* CmWRKY1 enhances the dehydration tolerance of *Chrysanthemum* through the regulation of ABA-associated genes [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150572. doi:10.1371/journal.pone.0150572.
- [42] 曹士亮. BcWRKYII基因对玉米的转化及提高玉米抗逆性研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- [43] Yan H R, Jia H H, Chen X B, *et al.* The cotton WRKY transcription factor GhWRKY17 functions in drought and salt stress in transgenic *Nicotiana benthamiana* through ABA signaling and the modulation of reactive oxygen species production [J]. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55(12): 2060-2076.
- [44] 朱娉慧, 陈冉冉, 于 洋, 等. 碱胁迫相关基因GsWRKY15的克隆及其转基因苜蓿的耐碱性分析 [J]. *作物学报*, 2017, 43(9): 1319-1327.
- [45] Wu Z J, Li X H, Liu Z W, *et al.* Transcriptome-wide identification of *Camellia sinensis* WRKY transcription factors in response to temperature stress [J]. *Mol Genet Genomics*, 2016, 291(1): 255-269.
- [46] Li H E, Xu Y, Xiao Y, *et al.* Expression and functional analysis of two genes encoding transcription factors, VpWRKY1 and VpWRKY2, isolated from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* [J]. *Planta*, 2010, 232(6): 1325-1337.
- [47] Kang K, Park S, Natsagdorj U, *et al.* Methanol is an endogenous elicitor molecule for the synthesis of tryptophan and tryptophan-derived secondary metabolites upon senescence of detached rice leaves [J]. *Plant J*, 2011, 66(2): 247-257.
- [48] Verde G L, Fileccia V, Bue P L, *et al.* Members of the WRKY gene family are upregulated in Canary palms attacked by Red Palm Weevil [J]. *Arthropod-Plant Interactions*, 2019, 13(1): 109-116.
- [49] Li C L, Li D Q, Shao F J, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of WRKY transcription factor genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 200-209.
- [50] Yu H Z, Guo W L, Yang D F, *et al.* Transcriptional profiles of SmWRKY family genes and their putative roles in the biosynthesis of tanshinone and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): E1593.
- [51] Cao W Z, Wang Y, Shi M, *et al.* Transcription factor SmWRKY1 positively promotes the biosynthesis of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 554-559.