

梅花 2 个 *PmWRKY2* 基因克隆及在逆境胁迫下的表达模式

王楠楠^{1,2,3}, 董彬^{1,2,3}, 杨丽媛^{1,2,3}, 赵宏波^{1,2,3}

(1. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 浙江省园林植物种质创新与利用重点实验室, 浙江 杭州 311300; 3. 浙江农林大学 南方园林植物种质创新与利用国家林业和草原局重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】低温是影响梅花 *Prunus mume* 栽培应用的重要环境因素。*WRKY* 基因是一类主要存在于植物中的转录因子, 参与响应非生物胁迫等过程。了解梅花 *WRKY* 基因对非生物和脱落酸 (ABA) 胁迫的响应, 对梅花定向育种具有重要的意义。【方法】以梅花 ‘骨红朱砂’ *Prunus mume* ‘Guhong Zhusha’ 为材料, 通过反转录 PCR(RT-PCR) 克隆获得了 2 个 *WRKY2* 转录因子, 命名为 *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2*; 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 分析 *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 基因在低温和干旱下的表达模式。【结果】*PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 的编码区长度分别为 2 223 和 2 220 bp, 分别编码 740 和 739 个氨基酸, 包含 2 个 *WRKY* 结构域和 C_2H_2 型锌指结构; *PmWRKY2-1* 与 *PmWRKY2-2* 亲缘关系较远, 但两者与蔷薇科 *Rosaceae* 植物欧洲甜樱桃 *P. avium*、桃 *P. persica*、李 *P. dulcis* 的亲缘关系较近。qRT-PCR 结果显示: 在低温和干旱处理下, *PmWRKY2-1* 与 *PmWRKY2-2* 都能被诱导; 脱落酸 (ABA) 处理后, *PmWRKY2-1* 与 *PmWRKY2-2* 的表达显著降低。【结论】*PmWRKY2-1* 与 *PmWRKY2-2* 可能参与调控梅花低温和干旱响应, 并可能受到 ABA 的调控。图 6 表 1 参 28

关键词: 梅花; *WRKY* 转录因子; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S685.17 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2021)04-0812-08

Cloning and expression analysis under adversity stress of 2 *PmWRKY2* in *Prunus mume*

WANG Nannan^{1,2,3}, DONG Bin^{1,2,3}, YANG Liyuan^{1,2,3}, ZHAO Hongbo^{1,2,3}

(1. School of Landscape Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization for Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 3. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Germplasm Innovation and Utilization for Southern Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] Low temperature is a main environmental factor that influences the cultivation and application of *Prunus mume* whereas *WRKY* gene is a plant-specific transcription factor which participates in the response to abiotic stress process. This study, with an investigation of how *WRKY* gene responds to low temperature and drought stress, is aimed to provide guidance for the directional breeding of *P. mume*. [Method] With the *P. mume* ‘Guhong Zhusha’ cDNA template selected as the substance, two *WRKY2* genes

收稿日期: 2020-11-11; 修回日期: 2021-03-12

基金项目: “十三五”国家重点研发计划资助项目 (2019YFD1001505, 2018YFD1000402); 浙江省农业新品种选育重点项目 (2016C02056-12)

作者简介: 王楠楠 (ORCID: 0000-0002-2571-5980), 从事抗寒分子机制研究。E-mail: 1780192738@qq.com。通信作者: 赵宏波 (ORCID: 0000-0003-4714-8240), 教授, 博士, 博士生导师, 从事观赏植物遗传育种等研究。E-mail: zhaohb@zafu.edu.cn

were cloned by means of RT-PCR, named as *PmWRKY2-1* and *PmWRKY2-2* before their expression patterns were under low temperature and in the condition of drought employing real-time quantitative PCR (qRT-PCR). [Result] a) *PmWRKY2-1* and *PmWRKY2-2*, with respective coding area lengths of 2 223 and 2 220 bp, encode 740 and 739 amino acids respectively, both including 2 WRKY domains and a C₂H₂ zinc finger structure; b) though with a distant genetic relationship with each other, both *PmWRKY2-1* and *PmWRKY2-2* had a close relationship with *P. avium*, *P. persica* and *P. dulcis*; c) according to the results of the real-time quantitative PCR (qRT-PCR), both *PmWRKY2-1* and *PmWRKY2-2* could be induced by low temperature and drought treatment And d) the expressions of *PmWRKY2-1* and *PmWRKY2-2* were significantly reduced after abscisic acid (ABA) treatment. [Conclusion] *PmWRKY2-1* and *PmWRKY2-2* are likely to participate in the regulation of low temperature and drought response of *P. mume*, yet might be subject to the regulation by ABA. [Ch, 6 fig. 1 tab. 28 ref.]

Key words: *Prunus mume*; WRKY transcription factor; gene cloning; expression analysis of genes

梅花 *Prunus mume* 是中国十大传统名花, 在中国有 3 000 多年栽培历史, 江南地区花期为 2 月左右^[1]。梅花适应性较强, 耐高温、较耐低温和干旱。在年均气温为 16~23 ℃ 的地区生长最好, 根系不耐-8 ℃ 以下的低温^[2-3]。梅花适栽范围介于自然分布区和历史分布区之间, 北界为西藏经四川至甘肃天水, 陕西宝鸡、西安, 河南洛阳, 最后到山东烟台, 通过海岸线与自然分布区相接, 以长江流域为集中赏梅地带^[2,4]。在华北、东北和西北等北方地区不能露地越冬, 在江南地区, 春季的极端低温 (低于-3 ℃) 则会对花 (蕾) 造成伤害, 极大地影响观赏价值。因此, 抗寒育种一直是梅花育种的重要方向^[4-6]。WRKY 转录因子是一类主要存在于植物中的锌指型转录因子, 在植物响应生物胁迫与非生物胁迫的过程中起着重要作用。根据 WRKY 结构域数量和锌指结构特征, WRKY 家族可分为 3 类: I 类包含 2 个 WRKY 结构域和 1 个 CX₄₋₅CX₂₂₋₂₃HXH (C₂H₂) 型锌指结构; II 类包含 1 个 WRKY 结构域和 1 个 CX₄₋₅CX₂₂₋₂₃HXH (C₂H₂) 型锌指结构; III 类包含 1 个 WRKY 结构域和 1 个 CX₇CX₂₃HXC (C₂HC) 型锌指结构^[7]。WRKY 家族参与了广泛的生物过程, 包括种子萌发、植物发育和植物激素信号传递等^[8]。研究表明: *WRKYs* 最重要的功能之一是参与防御非生物胁迫^[9], 可显著提高小麦 *Triticum aestivum*^[10]、水稻 *Oryza sativa*^[11] 等的耐寒性和香蕉 *Musa acuminata*^[12]、棉花 *Gossypium hirsutum*^[13] 等的抗旱性。近年来, 随着梅花基因组正式公布^[14], 关于梅花抗寒和抗旱基因的挖掘和研究逐渐展开, 这为深入研究梅花抗寒、抗旱等机制提供了重要的基础。梅花中共鉴定出 58 个 WRKY 成员, *PmWRKYs* 在梅花的不同组织 (根、茎、叶、花和果实) 中有不同程度的表达, 其中 17 个 *PmWRKYs* 可能是调控梅花抗寒性的潜在转录因子^[15]。本研究以梅花品种 ‘骨红朱砂’ ‘Guhong Zhusha’ 为材料, 采用反转录 PCR (RT-PCR) 技术克隆获得了 2 个 *PmWRKY2* 转录因子, 通过生物信息学分析和同源基因序列比对, 检测 *PmWRKY2* 基因在不同非生物胁迫下的表达模式, 以期后续开展 WRKY 转录因子在梅花抗寒和抗旱方面的作用机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

梅花 ‘骨红朱砂’ 来自浙江农林大学梅花种质资源圃。采集生长势一致, 无病虫害的 1 年生枝条, 插于加入清水的培养瓶中, 参照 PENG 等方法^[16] 处理, 湿度为 50%, 光周期为 16 h/8 h。低温 (2 ℃) 处理组取样时间为 0 (ck)、1、2、4、6、12、24、48、72 h。采用 200 mmol·L⁻¹ 的甘露醇溶液模拟干旱处理, 取样时间为 0 (ck)、3、6、12、24、36、48 h。采用 100 μmol·L⁻¹ 脱落酸 (ABA) 处理, 取样时间为 0 (ck)、3、6、12、24、36、48 h。所有新鲜样品采集后立即用液氮速冻, 保存于-80 ℃, 3 次生物学重复。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 合成 RNA 的提取采用购自天津诺禾致源公司的 UltraClean Polysaccharide and Phenol Plant RNA Purification Kit, 方法参照试剂盒的提取说明书。cDNA 的合成根据 TAKARA PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) 说明书在冰上进行。

1.2.2 基因的克隆 通过梅花基因组和表达谱数据获得 *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 序列, 利用 Prime 5.0 设计特异性引物 (表 1), 以 ‘骨红朱砂’ 叶片 cDNA 为模板, 利用 r-Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。扩增条件为: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s, 54 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 3 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经切胶回收试剂盒回收后连接到 pMD18-T 载体 (Takara 公司, 大连) 中, 转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞后挑取阳性克隆, 经 PCR 验证后送往杭州有康科技有限公司测序。

表 1 基因克隆及表达所用引物序列

Table 1 Primers used in Gene clone and Quantitative real-time PCR

用途	引物名称	序列(5'→3')
基因克隆	PmWRKY2-1F	ATGGCTGGCATCGATGA
	PmWRKY2-1R	CTACATCTGTGGTCCAAG
	PmWRKY2-2F	ATGGGATTTTAAAGAACC
	PmWRKY2-2R	CTAGTACGATTGATGACTGCTTC
实时荧光定量PCR	QPmWRKY2-1F	GTCCCCTTATCTGACAATACCTC
	QPmWRKY2-1R	AAAGCGAATGAAGTATTTATGTCCT
	QPmWRKY2-2F	TCCGTTGCTTCTCCCAATGATGAC
	QPmWRKY2-2R	CAAAATCTATTGGTTGTTGCTCC
	QPmEF1 α S	CGGATTCAATGTAAAGAATGTTGC
	QPmEF1 α A	AGAACTGGAGCATATCCGTTACC

1.2.3 序列的生物信息学分析 采用在线软件 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行基因序列比对分析, 用 ORF finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 在线分析开放阅读框, 运用 ProtParam 在线软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测编码蛋白质的分子量、理论等电点; 利用 SOPMA 在线工具 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 分析 PmWRKY2 蛋白质的二级结构组成; 利用 WOLFP SORT 在线软件 (<https://psort.hgc.jp/cgi-bin/runpsort.pl>) 预测基因的亚细胞定位; 利用 DNAMAN 9.0 软件对梅花 PmWRKY2 蛋白质与其他物种 WRKY 蛋白质进行比对分析; 使用 ClustalX-v1.83 程序进行多序列比对, 然后将比对结果输入到 MEGA 6.0 软件中, 利用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, Bootstrap 值取 1 000 次。

1.2.4 基因表达分析 以不同处理的叶片为模板, 反转录为 cDNA, 并进行实时荧光定量 PCR。利用 Prime 5.0 设计 *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 的特异性引物, 以梅花 *PmEF1 α* 为内参基因。反应体系为 SYBR Premix Ex Taq 酶 (Takara, 大连) 10.0 μ L, cDNA 2.0 μ L, 上下游引物 (10 μ M $\cdot$ L⁻¹) 各 0.8 μ L, 双蒸水 6.4 μ L, 每个样品设置 3 次重复。反应程序为两步法: 95 ℃ 预变性 30 s, 95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 复性 30 s, 共 40 个循环; 然后以 95 ℃ 持续 5 s, 60 ℃ 持续 1 min, 95 ℃ 持续 15 s 作为溶解曲线分析程序, 最后根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 梅花 *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 基因的克隆及生物信息学分析

利用特异性引物进行 PCR 扩增, 经过连接、转化、测序后获得编码序列 (CDS)。测序结果显示: *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 的 CDS 长度分别为 2 223 和 2 220 bp (图 1), 编码的氨基酸数目分别为 740 和 739 个, 蛋白质分子量分别为 79.94 和 80.98 kD, 理论等电点分别为 5.65 和 5.82。不稳定系数分别为 53.93 和 53.82, 脂肪指数分别为 54.18 和 59.53, 预测它们为不稳定蛋白质。总平均亲水系数 (GRAVY) 分别为 -0.774 和 -0.743, 属于亲水性蛋白质。亚细胞定位预测结果显示: *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 均位于细胞核。

氨基酸序列比对结果显示 (图 2): 梅花 *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 的同源性仅为 45.87%, 与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 AtWRKY2 相似性分别为 51.26% 和 32.07%; 其中 *PmWRKY2-1* 与欧洲甜樱桃 *P. avium* (XP_021826759.1)、桃 *P. persica* (XP_007206427.1) 的 WRKY2 同源性分别为 98.65%, 98.78%;

PmWRKY2-2 与甜李 *P. dulcis*(XP_034218428.1)、桃 (XP_007207009.2) 的 WRKY2 同源性分别为 98.51%, 98.11%, 与月季 *Rosa chinensis*(XP_024188041.1) WRKY2 同源性为 77.97%。进一步分析发现: 梅花 *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 氨基酸序列与其他植物氨基酸序列一样, 均包含 2 个 WRKY 结构域和 1 个 CX₄₋₅CX₂₂₋₂₃ HXH(C₂H₂) 型锌指结构, 属于 Group I (图 3)。

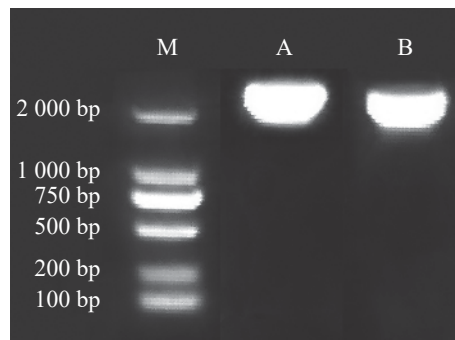
2.2 梅花 *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 蛋白的二级结构预测

蛋白质二级结构预测结果显示 (图 4):

PmWRKY2-1 蛋白质的二级结构中包含 75.68% 的无规则卷曲、10.81% 的 α 螺旋、10.41% 的扩展长链和 3.11% 的 β 转角结构; *PmWRKY2-2* 蛋白质的二级结构中包含 74.02% 的无规则卷曲、13.80% 的 α 螺旋、8.80% 的扩展长链和 3.38% 的 β 转角结构。

2.3 系统进化分析

利用 MEGA 6.0 软件构建梅花 *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 氨基酸序列的系统进化树 (图 5)。结果显示: 梅花 *PmWRKY2-1* 与 *PmWRKY2-2* 的相似性较低, 但与一些蔷薇科 Rosaceae 植物的亲缘关系都较近; 其中 *PmWRKY2-1* 与桃 (XP_007206427.1)、欧洲甜樱桃 (XP_021826759.1) 的 WRKY 亲缘关系较近, *PmWRKY2-2* 与甜李 (XP_034218428.1)、桃 (XP_007207009.2) 的 WRKY 氨基酸聚为一类, 与麻



M. DL2000; A. *PmWRKY2-1*; B. *PmWRKY2-2*

图 1 2 个 *PmWRKY2* 基因的扩增

Figure 1 PCR amplification of 2 *PmWRKY2* genes in *P. mume*

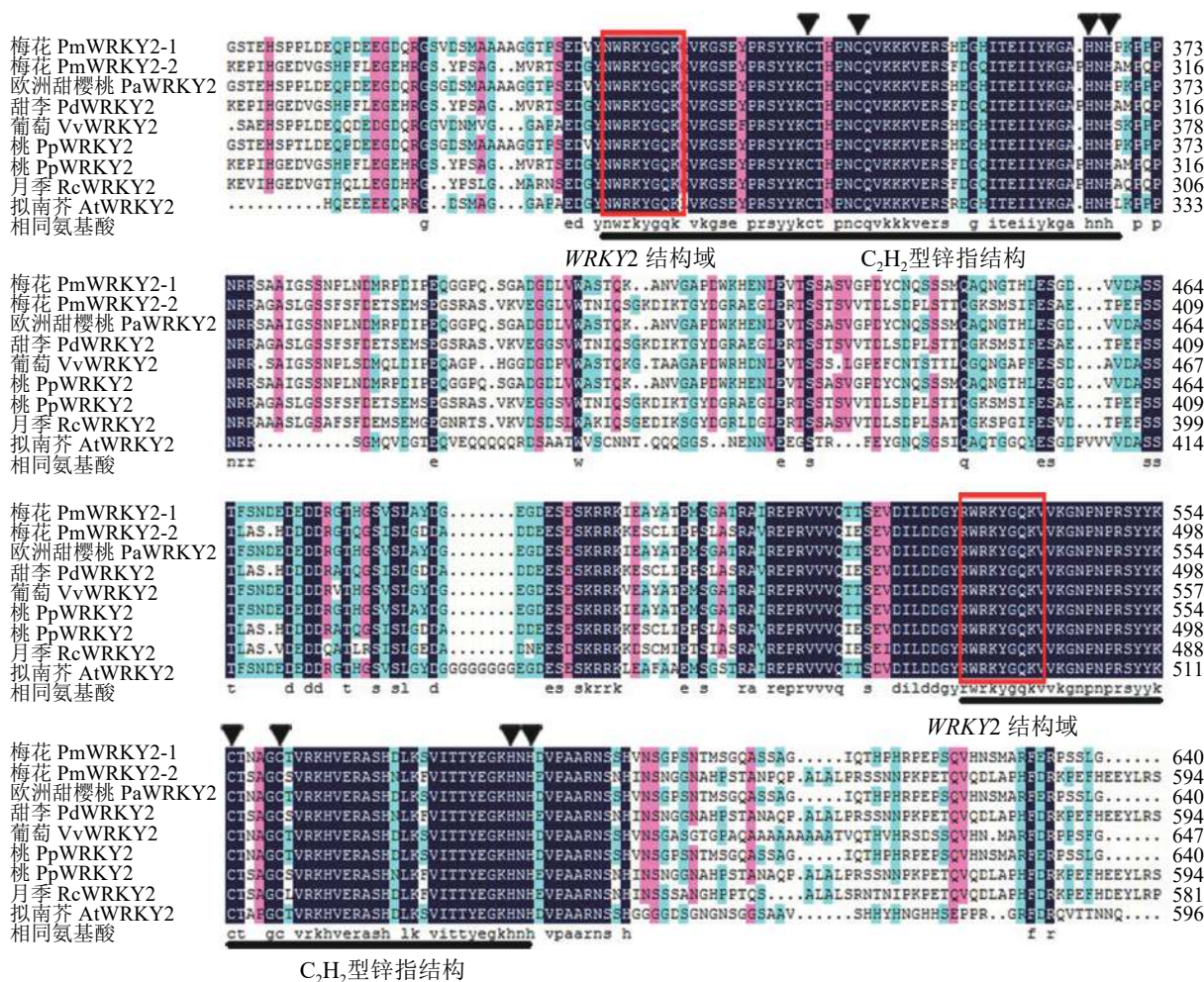


图 2 梅花与其他物种 WRKY 氨基酸序列的比对

Figure 2 Amino acid sequence of WRKY between *P. mume* and other species

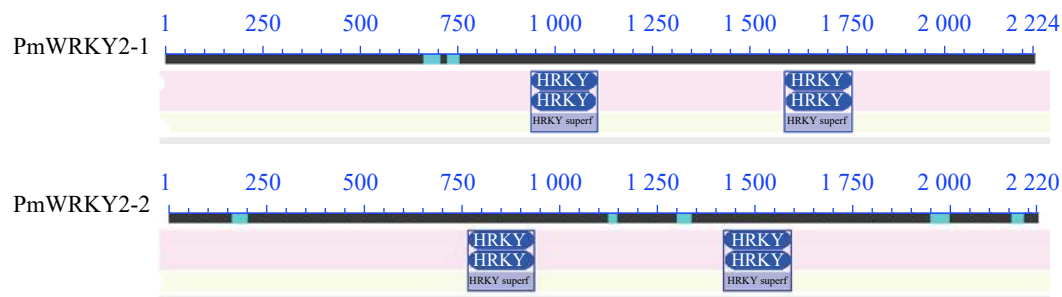


图3 PmWRKY2-1和PmWRKY2-2的WRKY结构域

Figure 3 WRKY domain displays of PmWRKY2-1 and PmWRKY2-2

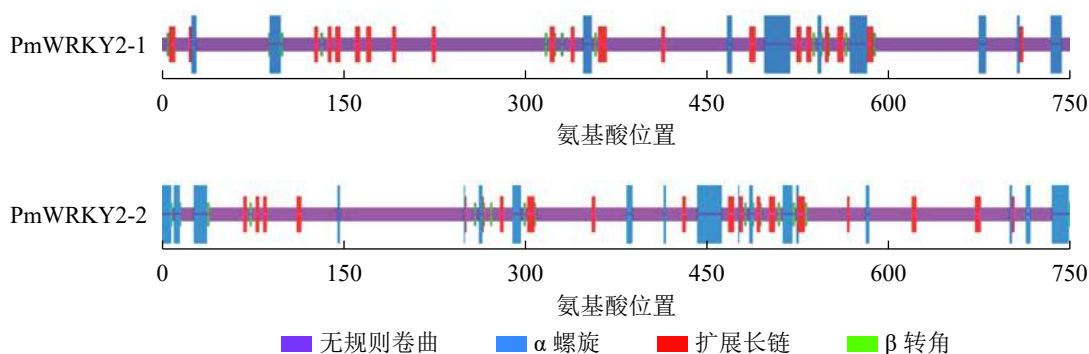


图4 PmWRKY2-1和PmWRKY2-2蛋白质的二级结构

Figure 4 Secondary protein structure of PmWRKY2-1 and PmWRKY2-2

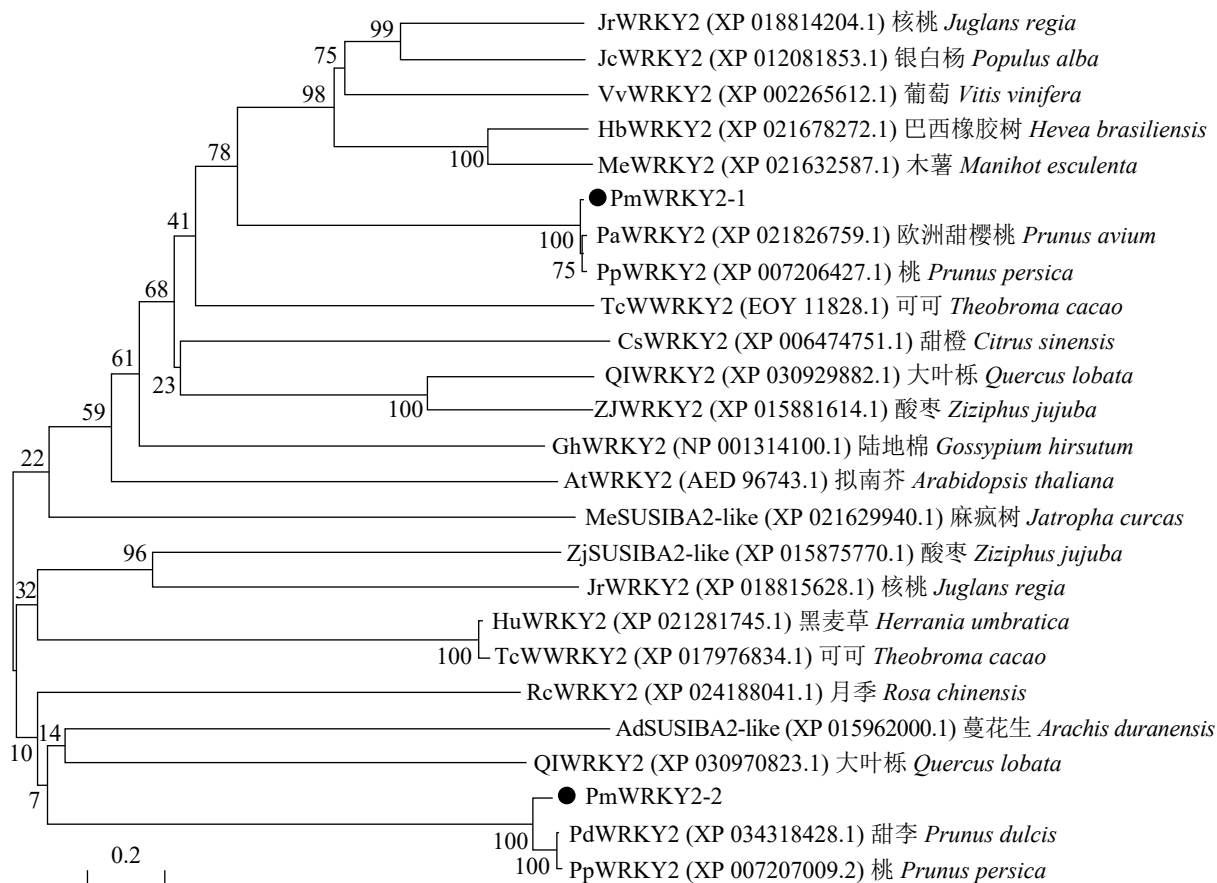


图5 梅花与其他物种WRKY氨基酸序列系统进化树分析

Figure 5 Phylogenetic tree analysis of the amino acid sequence of *P. mume* and other species

树 *Jatropha curcas* (XP_021629940.1)、酸枣 *Ziziphus jujube* (XP_015875770.1)、蔓花生 *Arachis duranensis* (XP_015962000.1) 等 SUSIBA2-Like (sugar signaling in barley) 基因的氨基酸序列也有一定的相似性。

2.4 *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 在非生物胁迫和脱落酸处理下的表达

低温和干旱 (甘露醇) 处理后, *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 表达均发生显著变化 (图 6)。在低温处理下, *PmWRKY2-1* 在 2 和 12 h 时表达量最高, 分别是对照的 5.0 和 4.4 倍, 之后呈现下降的趋势; *PmWRKY2-2* 的表达量呈现先上升后下降的趋势, 在 6 h 时达到最大值, 是对照的 2.4 倍。在干旱处理下, *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 的表达模式均为先上升后下降的趋势, *PmWRKY2-1* 的表达量在 12 h 达到最大且为对照的 53.9 倍, 之后便呈现下降的趋势; *PmWRKY2-2* 的表达量在 6 h 处达到最大, 为对照的 9.7 倍, 之后呈现下降趋势。在脱落酸 (ABA) 处理下, 处理 48 h 前, *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 均显著下调 ($P < 0.05$), 说明其表达可被 ABA 抑制。

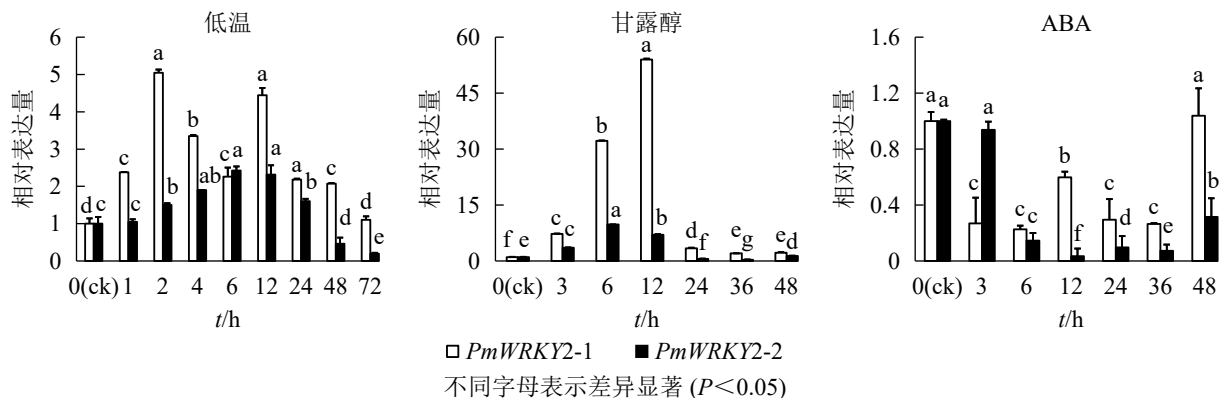


图 6 非生物和 ABA 处理下的 *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 的表达

Figure 6 Expression levels of *PmWRKY2-1* and *PmWRKY2-2* under abiotic stress and ABA

3 讨论

植物在生长发育的过程中会受到多种因素的影响, 而低温与干旱是常见的影响植物生长发育、果实品质以及地理分布的非生物胁迫因素, 严重时可能会导致植物死亡。植物在长期适应进化的过程中逐渐形成了复杂而高效的应答机制, 从分子、生理、细胞和生化等多方面做出适应性调整, 以抵御和适应低温、干旱等胁迫。在植物响应低温、干旱胁迫过程中, 普遍存在于植物中的 WRKY 转录因子发挥了重要作用^[17], 目前已在拟南芥^[7]、番茄 *Solanum lycopersicum*^[18]、玉米 *Zea mays*^[19]、苹果 *Malus domestica*^[20]、水稻^[21] 等大多数物种中均有报道。

本研究克隆获得的 *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 基因都含有 2 个 WRKY 结构域, C 端都为 C₂H₂ 型锌指结构; 但 2 个蛋白质序列的差异较大, 相似性仅为 45.87%; 与一些蔷薇科植物的亲缘关系较近; *PmWRKY2-1* 与拟南芥 *AtWRKY2* 的相似性为 51.26%, *PmWRKY2-2* 为 32.07%。值得一提的是, *PmWRKY2-2* 与麻风树 (XP_021629940.1)、酸枣 (XP_015875770.1)、蔓花生 (XP_015962000.1) 等植物的 SUSIBA2-Like 氨基酸序列具有一定的相似性, 有研究^[22] 报道 SUSIBA2 属于 WRKY 转录因子超家族并参与碳水化合物合成代谢。

罗昌国等^[23] 发现: 低温处理下湖北海棠 *Malus hupehensis* *MhWRKY40b* 基因表达量呈现先上升后下降的趋势; 低温处理下黄瓜 *Cucumis sativus* *CsWRKY46*^[24] 和水稻 *OsWRKY76*^[11] 也呈现先上升后下降的表达趋势, 与本研究梅花 *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 基因对低温的响应趋势一致。干旱处理下 *PmWRKY2-1* 和 *PmWRKY2-2* 的表达量先显著上升后下降, 最高表达量分别上调了约 50 倍和 10 倍。ZHU 等^[25] 发现: 拟南芥中过表达甘薯 *Ipomoea batatas* *IbWRKY2* 和苦荞^[26] *Fagopyrum tataricum* *FtWRKY10* 能提高转基因植株的抗旱性; ZHANG 等^[27] 发现: 吲哚-3-乙酸 (indole-3-acetic acid) 处理白车轴草 *Trifolium repens*, 其 *WRKY2* 作为干旱响应基因可以提高白车轴草的耐旱性。JIANG 等^[28] 发现: *ABI5*、*ABI3*、*ABA2* 和 *ABA3* 等 ABA 途径基因诱导拟南芥 2 个 *WRKY2* 的表达从而介导种子萌发和萌发后的发育停滞。本研究中, ABA 处理下, 梅花 2 个 *PmWRKY2* 基因的表达都被抑制, 预测启动子序列中的

PmWRKY2-1 和 *PmWRKY2-2* 分别含有 1 个和 7 个 ABA 响应元件 ABRE, 推测这 2 个基因可能通过 ABA 调控低温相关基因的表达进而调控梅花的耐寒性, 但这些推论还需进一步验证。

4 参考文献

- [1] 陈俊愉. 中国梅花[M]. 海口: 中国海南出版社, 1996.
- [2] 陈俊愉. 中国梅花品种图志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1989.
- [3] 张启翔. 梅花及其杂交种根系抗寒性研究初报[J]. 北京林业大学学报, 1992, **14**(增刊 4): 83 – 86.
ZHANG Qixiang. A preliminary study on cold resistance of root system of Mei and its hybrid cultivars [J]. *J Beijing For Univ*, 1992, **14**(suppl 4): 83 – 86.
- [4] 包满珠, 陈俊愉. 中国梅的变异与分布研究[J]. 园艺学报, 1994, **21**(1): 81 – 86.
BAO Manzhu, CHEN Junyu. Studies on the variation and distribution of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. [J]. *Acta Horti Sin*, 1994, **21**(1): 81 – 86.
- [5] 包满珠. 我国川、滇、藏部分地区梅树种质资源及其开发利用[J]. 华中农业大学学报, 1993, **12**(5): 498 – 501.
BAO Manzhu. The germplasm resources and exploitation of *Prunus mume* in partial area of Sichuan, Yunnan and Tibet of China [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 1993, **12**(5): 498 – 501.
- [6] 王白坡, 钱银才, 沈湘林, 等. 实生梅开花结果特性的研究[J]. 浙江林学院学报, 1992, **9**(1): 6 – 13.
WANG Baipo, QIAN Yincui, SHEN Xianglin, *et al.* Study on flowering and fruiting characters of seedling-mumeplant [J]. *J Zhejiang For Coll*, 1992, **9**(1): 6 – 13.
- [7] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, *et al.* The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, **5**(5): 199 – 206.
- [8] VIVES-PERIS V, MARMANEU D, GÓMEZ-CADENAS A, *et al.* Characterization of *Citrus* WRKY transcription factors and their responses to phytohormones and abiotic stresses [J]. *Biol Plant*, 2018, **62**(1): 33 – 44.
- [9] PAN Linjie, JIANG Ling. Identification and expression of the WRKY transcription factors of *Carica papaya* in response to abiotic and biotic stresses [J]. *Mol Boil Rep*, 2014, **41**: 1215 – 1225.
- [10] NIU Canfang, WEI Wei, ZHOU Qiqun, *et al.* Wheat WRKY genes *TaWRKY2* and *TaWRKY19* regulate abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Plant Cell Environ*, 2012, **35**: 1156 – 1170.
- [11] YOKOTANI N, SATO Y, TANABE S, *et al.* WRKY76 is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance [J]. *J Exp Bot*, 2013, **64**(6): 5085 – 5097.
- [12] LIU Guoyin, LI Bing, LI Xiang, *et al.* *MaWRKY80* positively regulates plant drought stress resistance through modulation of abscisic acid and redox metabolism [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2020, **156**: 155 – 166.
- [13] 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.
- [14] ZHANG Qixiang, CHEN Wenbin, SUN Lidan, *et al.* The genome of *Prunus mume* [J]. *Nat Commun*, 2012, **3**: 1318. doi: 10.1038/ncomms2290.
- [15] BAO Fei, DING Anqi, CHENG Tangren, *et al.* Genome-wide analysis of members of the WRKY gene family and their cold stress response in *Prunus mume* [J]. *Genes*, 2019, **10**(11): 911. doi: 10.3390/genes10110911.
- [16] PENG Ting, GUO Cong, YANG Jie, *et al.* Overexpression of Mei (*Prunus mume*) *CBF* gene confers tolerance to freezing and oxidative stress in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2016, **126**(3): 373 – 385.
- [17] 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.
LI Yuanyuan, GAO Zhiqiang, CAO Qinghe. Bioinformatics analysis of SPF1 transcription factor of sweet potato [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2017, **33**(4): 760 – 767.
- [18] CHEN Lin, YANG Yang, LIU Can, *et al.* Characterization of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum* reveals collinearity and their expression patterns under cold treatment [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, **464**(6): 962 – 968.
- [19] WEI Kaifa, CHEN Juan, CHEN Yanfeng, *et al.* Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in maize [J]. *DNA Res*, 2012, **19**: 153 – 164.
- [20] MENG Dong, LI Yuanyuan, BAI Yang, *et al.* Genome-wide identification and characterization of WRKY transcriptional

- factor family in apple and analysis of their responses to waterlogging and drought stress [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, **103**: 71 – 83.
- [21] ROSS C A, LIU Yue, SHEN Qingxi J. The WRKY gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. *J Integr Plant Biol*, 2007, **49**(6): 827 – 836.
- [22] SUN Chuanxin, SARA P, OLSSON H, *et al.* A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter [J]. *Plant Cell*, 2003, **15**(9): 2076 – 2092.
- [23] 罗昌国, 渠慎春, 张计育, 等. 湖北海棠 *MhWRKY40b* 在几种胁迫下的表达分析[J]. 园艺学报, 2013, **40**(1): 1 – 9.
- LUO Changguo, QU Shenchun, ZHANG Jiyu, *et al.* Expression analysis of *Malus hupehensis* (Pamp) Rehd. *MhWRKY40b* gene in response to several stresses [J]. *Acta Horti Sin*, 2013, **40**(1): 1 – 9.
- [24] ZHANG Ying, YU Hongjun, YANG Xueyong, *et al.* *CsWRKY46*, a WRKY transcription factor from cucumber, confers cold resistance in transgenic-plant by regulating a set of cold-stress responsive genes in an ABA-dependent manner [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, **108**: 478 – 487.
- [25] ZHU Hong, ZHOU Yuanyuan, ZHAI Hong, *et al.* A novel sweetpotato WRKY transcription factor, *IbWRKY2*, positively regulates drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Biomolecules*, 2020, **10**: 506. doi: 10.3390/biom10040506.
- [26] 王官凤, 吕兵兵, 王安虎, 等. 苦荞抗旱相关转录因子基因 *FtWRKY10* 的克隆及功能鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2020, **28**(4): 629 – 644.
- WANG Guanfeng, LÜ Bingbing, WANG Anhu, *et al.* Cloning and functional identification of drought resistance related transcription factor gene *FtWRKY10* from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J]. *J Agric Biotechnol*, 2020, **28**(4): 629 – 644.
- [27] ZHANG Youzhi, LI Yaping, HASSAN M J, *et al.* Indole-3-acetic acid improves drought tolerance of white clover via activating auxin, abscisic acid and jasmonic acid related genes and inhibiting senescence genes [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, **20**: 150. doi: 10.1186/s12870-020-02354-y.
- [28] JIANG Wenbo, YU Diqu. *Arabidopsis WRKY2* transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid [J]. *BMC Plant Biol*, 2009, **9**: 96. doi: 10.1186/1471-2229-9-96.