

芥菜型油菜转录因子*BjWRKY33*基因克隆和表达分析

袁玉辉 王舸泓 华之梦 彭玉林 聂蔓麒 刘显军*

(宜春学院, 生命科学与资源环境学院, 江西省作物生长发育调控重点实验室, 宜春 336000)

摘要 植物WRKY基因家族是最大的转录因子家族之一, 在非生物胁迫反应中起重要的调控作用。该研究利用RT-PCR技术分离获得芥菜型油菜WRKY转录因子基因(*WRKY33*)的完整开放阅读框(ORF)序列, 对其进行了生物信息学分析, 并通过荧光定量PCR研究了其表达特性。分离到的芥菜型油菜WRKY转录因子命名为*BjWRKY33*, 其ORF序列长度为1 470 bp, 编码489个氨基酸组成的蛋白质, 预测其分子量和等电点分别为 54.036 kDa和8.56, 未发现信号肽和跨膜结构, 二级结构中无规则卷曲、 α -螺旋、延伸直链和 β -转角各占76.89%、10.43%、10.22%、2.45%。进化树分析表明, *BjWRKY33*蛋白质与甘蓝型油菜、白菜、甘蓝等十字花科植物亲缘关系较近。荧光定量PCR分析发现, *BjWRKY33*基因在不同组织皆有表达, 其中在茎和蕾中表达量最低, 激素(ABA)、低温(4 °C)以及盐(NaCl)均能诱导叶片中*BjWRKY33*基因表达水平的升高。这些研究结果表明, *BjWRKY33*基因在维持植物正常生长发育和非生物逆境胁迫中可能发挥重要作用。

关键词 芥菜型油菜; *WRKY33*转录因子; 表达分析; 非生物胁迫

Cloning and Expression Analysis of *WRKY33* Transcription Factor Gene in *Brassica juncea*

Yuan Yuhui, Wang Kehong, Hua Zhimeng, Peng Yulin, Nie Manqi, Liu Xianjun*

(College of Life Sciences, Resources and Environment Sciences, Key Laboratory of Crop Growth and Development Regulation, Jiangxi Province, Yichun University, Yichun 336000, China)

Abstract In plants, WRKY gene family, one of the largest families of transcription factors, play an important regulatory role in abiotic stress response. In this study, the full open reading frame (ORF) sequence of *BjWRKY33* gene was cloned by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from *Brassica juncea*, which was named as *BjWRKY33*. The sequence was analyzed by bioinformatics tools. The expression characteristics of *BjWRKY33* gene were identified by qRT-PCR. The open reading frame of *BjWRKY33* gene contained 1 470 bp that encoded 489 amino acids. It is predicted that molecular weight of *BjWRKY33* was 54.036 kDa, which had an isoelectric point of 8.56. This protein lacked the signal peptides and membrane-spanning domains. The secondary and tertiary protein structures were predicted, which consisted of 76.89% random coils, 10.43% α -helices, 10.22% extended strands, and 2.45% β -turns. Phylogenetic analysis illustrated that *BjWRKY33* had high similarity to the *WRKY33* of *Cruciferous* plants such as *Brassica napus*, *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. The results of fluorescence quantitative PCR analysis revealed that *BjWRKY33* was expressed in roots, stems, leaves, buds, flow-

收稿日期: 2019-03-01 接受日期: 2019-04-24

国家自然科学基金(批准号: 31560404)和江西省作物生长发育调控重点实验室开放课题(批准号: KFJJ201801)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0795-3202591, Email: xjliu82@126.com

Received: March 1, 2019 Accepted: April 24, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31560404) and Key Laboratory of Crop Growth and Development Regulation of Jiangxi Province Open Fund Project (Grant No.KFJJ201801)

*Corresponding author. Tel: +86-795-3202591, Email: xjliu82@126.com

网络出版时间: 2019-08-12 14:51:03 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190812.1450.006.html>

ers and siliques, and the lowest expression was found in stems and buds. Higher expression of *BjWRKY33* in leaves was induced by the treatments of the hormone (ABA), low temperature (4 °C) or salt (NaCl). These results indicated that *BjWRKY33* might play an important role in maintaining normal growth and development of plants and responding to abiotic stresses.

Keywords *Brassica juncea*; *WRKY33* transcription factor; expression analysis; abiotic stress

WRKY家族蛋白由一个高度保守的结构域组成, 该结构域具有约60个氨基酸残基, 其中包含一个或两个高度保守的短肽WRKYGQK以及一个保守的C₂H₂-或C₂HC-型锌指结构^[1-3], 保守短肽还包括几种类型, 如WRKYGKK、WRKYDQK和WRKY-DHK。根据WRKY结构域的数量和锌指结构的类型, WRKY家族蛋白可分为3类^[2-3]: I类包含两个WRKY结构域和一个C₂H₂型锌指结构(C-X4-5-C-X22-23-H-X1-H); II类包含一个WRKY结构域和一个C₂H₂型锌指结构; III类有一个WRKY结构域和一个C₂HC型锌指结构(C-X7-C-X23-H-X1-C)。WRKY蛋白广泛分布于所有植物中, 是最大的转录因子家族之一。在过去的几十年里, 人们发现这些蛋白质在各种生理和生化过程中发挥着越来越多的功能作用^[4-8]。特别是参与了响应各种非生物胁迫, 如盐、干旱、低温、高温和脱落酸(ABA)信号^[9-13]。在拟南芥研究中, *AtWRKY40*、*AtWRKY18*和*AtWRKY60*与*ABAR*相互作用在种子萌发和发芽后对ABA信号起负调控作用^[10]; *AtWRKY8*与VQ9蛋白通过拮抗作用调节盐胁迫的耐受性^[14]; *AtWRKY46*、*AtWRKY54*和*AtWRKY70*等基因参与油菜素内酯调节植物的生长和抗旱响应^[15]。在水稻中, *OsWRKY45-1*和*OsWRKY45-2*等位基因在ABA信号传导和耐盐胁迫方面发挥着不同的作用^[16]; *OsWRKY71*通过调节下游靶基因在耐寒性方面起调控作用^[17]。将白菜中的冷诱导基因*BcWRKY46*转入烟草中可提高转基因烟草的耐寒性、耐盐性和耐脱水性^[18]。

芥菜型油菜(*Brassica juncea*)是一种重要的油料作物, 在中国西部、印度北部、澳大利亚、加拿大等国家和地区广泛种植, 具有耐贫瘠、抗旱、耐热、抗裂夹等特点^[19]。虽然芥菜型油菜的基因组序列已公布^[20-21], 但相对于拟南芥、水稻等作物中的WRKY基因的研究, 对芥菜型油菜的WRKY转录因子功能研究鲜有报道。本研究基于转录组测序的序列信息, 克隆了芥菜型油菜的*BjWRKY33*基因, 对其进行生物信息学分析, 并采用实时荧光定量PCR技术检测了

不同组织中及不同胁迫处理条件下该基因在叶中的表达情况, 为进一步研究该基因的功能奠定基础。

材料和方法

以芥菜型油菜‘紫叶芥’为供试材料, 2017~2018年宜春学院江西省作物生长发育调控重点实验室科研温室内和实验基地种植。生长3周后, 选生长健壮并且长势相同的苗, 分为3组, 每组3株, 放置于人工气候箱中进行不同的胁迫处理。分别采用激素(100 μmol/L ABA)、低温(4 °C)和盐(200 mmol/L NaCl)进行胁迫处理0、1、3、6、12和24 h, 取处理后的叶片为材料, 同时选取在盛花期的芥菜型油菜‘紫叶芥’的根、茎、叶、蕾、花和角果, 以上所有样品均独立取样3次, 用液氮速冻后放置-80 °C冰箱保存。

芥菜型油菜总RNA的提取和cDNA的克隆

芥菜型油菜各种备用材料的总RNA的提取参照TaKaRa公司RNAiso plus产品说明书进行, 琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性, 样品浓度由英国Biodrop uLITE分光光度计测定。cDNA第一链合成参照TaKaRa公司PrimeScriptII 1st Strand cDNA合成试剂盒产品说明书进行。将合成的cDNA放置于-80 °C冰箱备用。

根据前期的芥菜型油菜种皮转录组测序的序列信息^[22], 采用Primer Primer 5.0软件设计WRKY33基因扩增引物。WRKY33F: 5'-ATG GCT GCT TCT TCC CTT CTT CA-3', WRKY33R: 5'-TCAV GAC AAR AAC GAA TCM AAR AA-3'。引物由上海生工合成。以上述合成的cDNA为模板, PCR扩增条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 58 °C退火35 s, 72 °C延伸80 s, 36个循环; 72 °C延伸10 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测; 参照OMEGA琼脂糖凝胶DNA纯化回收试剂盒说明书对目的片段回收; 采用pMD18-T载体连接回收产物; 转化至大肠杆菌DH5α; 采用PCR鉴定阳性菌落送上海铂尚生物有限公司测序。

芥菜型油菜*BjWRKY33*蛋白的生物信息学分析

使用DNAMAN6.0推导芥菜型油菜*WRKY33*基因的氨基酸序列并与其他物种*WRKY33*蛋白进行序列多重比对; 利用在线网站ProtParam、ProtScale分析和预测*BjWRKY33*蛋白的基本理化性质; TMHMM Server2.0和SignalP4.1在线预测*BjWRKY33*蛋白的跨膜结构和信号肽; 利用SPOMA和SWISS-MODEL预测*BjWRKY33*蛋白的二级结构及三维结构; 使用软件MEGA5.1采用N-J法构建基因的进化树。

芥菜型油菜*BjWRKY33*基因的荧光定量PCR分析

设计芥菜型油菜*BjWRKY33*基因荧光定量引物, 上游引物为: 5'-TTC AGT CAC TCT GAT TCC CTT GC-3', 下游引物为: 5'-GGT TCA CTC CCA CAT TCT TCT TC-3'。以芥菜型油菜*GAPDH*蛋白基因为内参基因^[23], 上游引物为: 5'-TCA GTT GTT GAC CTC ACG GTT-3', 下游引物为: 5'-CTG TCA CCA ACG AAG TCA GT-3'。采用ABI StepOnePlus实时定量系统进行芥菜型油菜*BjWRKY33*基因表达分析, 使用TaKaRa公司的SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus)试剂盒。PCR反应程序: 95 °C预变性4 min; 95 °C变性5 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸10 s, 共计40个循环。设置3个生物学重复。采用2^{-ΔΔCt}方法分析基因相对表达量。

芥菜型油菜*BjWRKY33*基因全长cDNA序列的克隆

以芥菜型油菜叶的总RNA反转录的cDNA为模

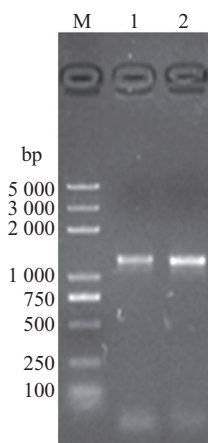
板进行PCR扩增, 经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, 目的DNA条带大小约1 500 bp左右与预计大小一致(图1)。测序后序列分析发现, 序列完整的ORF长度为1 470 bp, 编码489个氨基酸(图2)。Blastp比对结果显示, 该基因属于*WRKY*基因家族, 命名为*BjWRKY33*。

芥菜型油菜*BjWRKY33*蛋白质结构分析

ProtParam在线软件分析表明, *BjWRKY33*蛋白的分子式为C₂₃₀₉H₃₅₈₂N₆₉₆O₇₈₉S₁₀, 相对分子量为54.036 kDa, 理论等电点为8.56, 带正电荷的氨基酸残基数为54, 带负电荷的氨基酸残基数为50, 不稳定系数为59.41, 属于不稳定的蛋白质, 总平均疏水指数(GRAVY)为-0.961, 推测该蛋白质为亲水性蛋白。利用SOPMA在线预测分析*BjWRKY33*蛋白多肽链的二级结构, 该蛋白的以无规则卷曲为主, α-螺旋、延伸直链和β-转角为辅, 比率分别为76.89%、10.43%、10.22%、2.45%。三级结构预测见图3。采用TMHMM Server 2.0和SignalP4.1在线分析软件均未发现蛋白*BjWRKY33*具有跨膜结构和信号肽。

芥菜型油菜*BjWRKY33*蛋白同源性及进化分析

将*BjWRKY33*基因编码的氨基酸序列在NCBI上做Blast序列比对分析, 结果表明, 芥菜型油菜*BjWRKY33*基因与甘蓝型油菜、白菜、甘蓝、萝卜和芥菜等植物的同源性均在80%以上, 其中与甘蓝型



M: Trans2K plus; 1、2: PCR产物。

M: Trans2K plus; 1,2: PCR products.

图1 芥菜型油菜*BjWRKY33*基因扩增结果

Fig.1 PCR products of *BjWRKY33* gene from cDNA

油菜WRKY33基因一致性高达99%，同时通过比对分析发现，BjWRKY33包含2个典型的WRKY结构域和2个C₂H₂锌指结构，属于I类WRKY转录因子(图2)。

选取21个不同植物的WRKY33蛋白质与芥菜型油菜BjWRKY33蛋白进行系统进化树的构建(图4)，结果表明，芥菜型油菜、甘蓝型油菜、白菜、萝卜、



AtWRKY33: 拟南芥(AAM34736.1); BnWRKY33: 甘蓝型油菜(XP_013734676.1); BoWRKY33: 甘蓝(XP_013625082.1); BrWRKY33: 白菜(XP_009133259.1); ChWRKY33: 海甘蓝(AVK51635.1); Cswrky33: 芥蓝(XP_010517143.1); EwWRKY33: 芝麻菜(AVK51649.1); RsWRKY33: 萝卜(XP_018476020.1); 黑框部分为WRKY结构域，“*”标记锌指结构的C、H残基。

AtWRKY33: *Arabidopsis thaliana*(AAM34736.1); BnWRKY33: *Brassica napus*(XP_013734676.1); BoWRKY33: *Brassica oleracea*(XP_013625082.1); BrWRKY33: *Brassica rapa*(XP_009133259.1); ChWRKY33: *Crambe hispanica*(AVK51635.1); Cswrky33: *Camelina sativa*(XP_010517143.1); EwWRKY33: *Eruca vesicaria*(AVK51649.1); RsWRKY33: *Raphanus sativus*(XP_018476020.1); WRKY domain are shaded in black frame, C and H residues of zinc finger structure labeled by asterisks.

图2 芥菜型油菜与不同物种的WRKY33转录因子氨基酸序列比对

Fig.2 Amino acid sequence alignment of WRKY33 transcription factor between *Brassica juncea* and different species



图3 芥菜型油菜*BjWRKY33*蛋白质三维结构预测

Fig.3 Predicted 3-D structure for the *BjWRKY33* protein of *B.juncea*

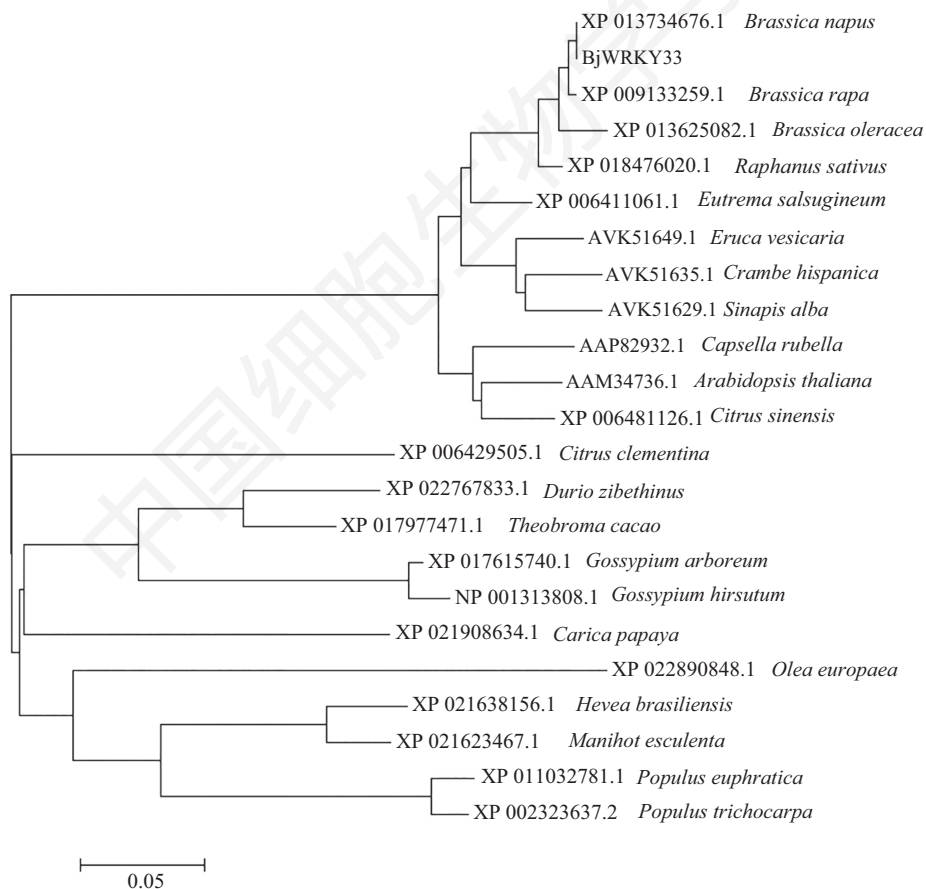


图4 芥菜型油菜WRKY33与其他植物WRKY33转录因子基因的蛋白同源序列的进化树分析

Fig.4 Phylogenetic tree of *BjWRKY33* transcription factor and WRKY33 transcription factor of other plants

拟南芥和芥菜等植物的*BjWRKY33*蛋白在进化树中聚为一类,表现出同科属作物WRKY33的亲缘关系较近。

芥菜型油菜*BjWRKY33*基因在不同组织中的表达分析

利用荧光定量PCR技术分析*BjWRKY33*基因

在芥菜型油菜不同组织中的表达,结果表明,在芥菜型油菜的根、茎、叶、花蕾、花和角果中均有 *BjWRKY33* 基因的表达,但表达量差异显著 ($P < 0.05$),依次为根>花>叶>角果>茎>花蕾。*BjWRKY33* 基因在花蕾中表达量最低,在角果、叶和花中的表达显著增加,根中表达量最高,是花蕾中的表达量的13.0倍(图5)。该基因在植物组织中的表达模式与拟南芥同源基因 *AtWRKY33* 在不同组织中的表达基本一致^[24]。

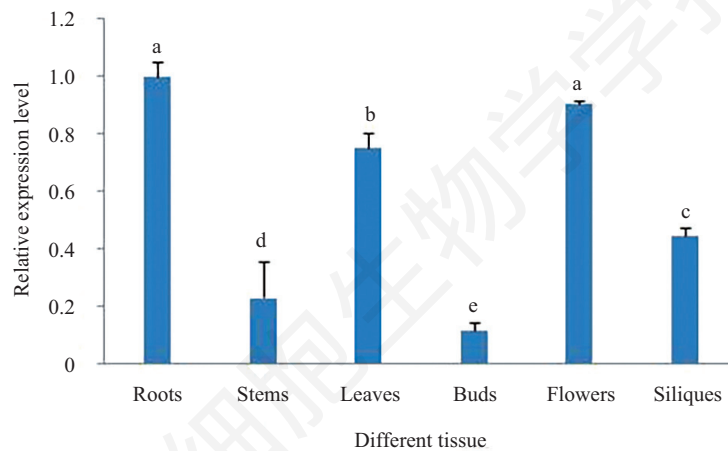
芥菜型油菜 *BjWRKY33* 基因胁迫表达分析

利用 qRT-PCR 分析芥菜型油菜 *BjWRKY33* 基因在各种非生物逆境胁迫下的叶片中的表达。*BjWRKY33* 基因用 100 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理后, 1~6 h

的相对表达量增加缓慢,处理 12 h 后达到对照的 2.7 倍, 24 h 后提高到 7.5 倍(图6)。用 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温处理后,芥菜型油菜 *BjWRKY33* 基因在 1 h 时相对表达量显著提高,是对照的 27.2 倍,在 3 h 和 6 h 降低至 8.9 倍和 4.0 倍, 12 h 后基因的相对表达量相对稳定,提高至 13.6 倍(图6)。用 200 mmol/L NaCl 溶液处理后,芥菜型油菜 *BjWRKY33* 基因的相对表达量呈现先增高后降低,再增高再降低的趋势,在 3 h 时是对照的 37.9 倍然后降至 6 h 的 11.5 倍; 12 h 时又提高至 60.9 倍,而 24 h 时降低至 39.1 倍(图6)。

关于 *BjWRKY33* 基因结构和功能的讨论

WRKY 转录因子是植物中一个重要的转录因



不同小写字母表示差异达显著水平 ($P < 0.05$)。

The different small letters indicate significant differences at the 0.05 level.

图5 *BjWRKY33* 基因在不同组织中的表达

Fig.5 Expressions of *BjWRKY33* gene in different issues of *B. juncea*

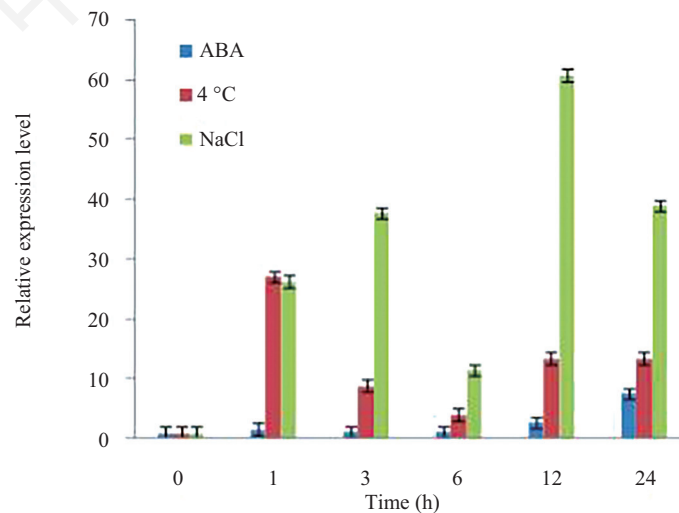


图6 不同胁迫处理条件下 *BjWRKY33* 基因表达分析

Fig.6 Expression levels of *BjWRKY33* in leaves after stress treatment

子家族, 参与调控植物生长发育, 还参与生物胁迫和非生物胁迫反应, 如种子发育^[25]、种子休眠和发芽^[26]、衰老^[27]、发育^[28]、植物免疫应答^[29]和病原体防御^[30-31]。在模式植物拟南芥和水稻中有大量研究结果, 而在油料作物芥菜型油菜中研究的WRKY蛋白很少, 更不用说与非生物胁迫功能相关的WRKY转录因子。本研究利用转录组序列信息同源克隆并通过生物信息学分析获得了与拟南芥转录因子基因*WRKY33*同源的基因, 命名为*BjWRKY33*, 属于WRKY家族I类转录因子, 与甘蓝型油菜(XP_013734676.1)蛋白序列相似度达99%, 进化树分析结果进一步证明该基因与甘蓝型油菜*BnWRKY33*具有最近的遗传进化关系。

*BjWRKY33*在芥菜型油菜各组织器官中均有表达, 但在蕾中表达水平和其他组织的表达水平差异较明显, 蕾中表达量最低, 而在花中表达又显著性提高, 推测其逆境响应与开花时间有关, *BjWRKY33*很可能是一个与开花期发育有关的关键因子, 为进一步研究油菜在逆境中的开花结实的成熟机制提供可能。

近年来, 大量研究表明, WRKY转录因子在参与植物的非生物胁迫反应过程中起重要作用, 有的WRKY转录因子只参与一种非生物胁迫因子的诱导表达, 如*AtWRKY34*介导拟南芥成熟花粉的冷敏性^[32]; 有的同时受多种非生物胁迫因子的诱导表达, 如: *AtWRKY63*参与植物对ABA和抗旱性的响应^[33]; *AtWRKY33*与*AtWRKY25*同时作用参与响应NaCl诱导的非生物胁迫, 又与*AtWRKY25*和*AtWRKY26*共同参与诱导拟南芥的耐热性^[24,34]。本研究发现, *BjWRKY33*表达也同时受激素(ABA)、冷害(4 °C)、盐害(NaCl)等非生物胁迫的诱导表达, 这与玉米*ZmWRKY33*的研究结果一致, 只是胁迫处理后基因表达的峰值的时间存在差异^[35]。这些结果暗示, *BjWRKY33*在响应非生物胁迫中可能发挥重要作用, 该基因可以作为芥菜型油菜的抗逆分子育种的候选基因。

本研究克隆了芥菜型油菜WRKY转录因子基因*BjWRKY33*, 并初步探讨其不同组织和不同非生物胁迫下的表达特性。研究结果表明, *BjWRKY33*为典型的WRKY I类转录因子, 在芥菜型油菜不同组织(根、茎、叶、蕾、花和角果)中均有表达, 其中茎和蕾中表达量最低。激素(ABA)、冷害(4 °C)、盐

害(NaCl)等非生物胁迫均能诱导叶片中*BjWRKY33*基因表达提升, 我们推测, *BjWRKY33*基因可能在芥菜型油菜适应这3种非生物胁迫因子过程中起重要作用。本研究结果为进一步研究芥菜型油菜*BjWRKY33*基因功能, 培育抗逆性的芥菜型油菜种质资源奠定了理论基础。

参考文献 (References)

- 1 Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 2000; 5(5): 199-206.
- 2 Zhang YJ, Wang LJ. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evol Biol* 2005; 5: 1.
- 3 Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ. WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci* 2010; 15 (5): 247-58.
- 4 Lagace M, Matton DP. Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense*. *Planta* 2004; 219(1): 185-9.
- 5 Lai ZB, Li Y, Wang F, Cheng Y, Fan BF, Yu JQ, *et al*. Arabidopsis sigma factor binding proteins are activators of the WRKY33 transcription factor in plant defense. *Plant Cell* 2011; 23(10): 3824-41.
- 6 Rushton DL, Tripathi P, Rabara RC, Lin J, Ringler P, Boken AK, *et al*. WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signaling. *Plant Biotechnol J* 2012; 10(1): 2-11.
- 7 Rinerson CI, Rabara RC, Tripathi P, Shen QJ, Rushton PJ. The evolution of WRKY transcription factors. *BMC Plant Biol* 2015; 15: 66.
- 8 Kloth KJ, Wieggers GL, Busscher-Lange J, van Haarst JC, Kruijjer W, Bouwmeester HJ, *et al*. *AtWRKY22* promotes susceptibility to aphids and modulates salicylic acid and jasmonic acid signalling. *J Exp Bot* 2016; 67(11): 3383-96.
- 9 Jing ZB, Liu ZD. Genome-wide identification of WRKY transcription factors in kiwifruit (*Actinidia* spp.) and analysis of WRKY expression in responses to biotic and abiotic stresses. *Genes Genomics* 2018; 40(4): 1-18.
- 10 Shang Y, Yan L, Liu ZQ, Cao Z, Mei C, Xin Q, *et al*. The Mg-Chelatase H subunit of *Arabidopsis* antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. *Plant Cell* 2010; 22: 1909-35.
- 11 Antoni R, Rodriguez L, Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Rodriguez PL. News on ABA transport, protein degradation, and ABFs/WRKYs in ABA signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2011; 14(5): 547-53.
- 12 Liu ZQ, Yan L, Wu Z, Mei C, Lu K, Yu YT, *et al*. Cooperation of three WRKY-domain transcription factors *WRKY18*, *WRKY40*, and *WRKY60* in repressing two ABA-responsive genes *ABI4* and *ABI5* in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2012; 63(18): 6371-92.
- 13 Van Aken O, Zhang B, Law S, Narsai R, Whelan J. *AtWRKY40* and *AtWRKY63* modulate the expression of stress-responsive nuclear genes encoding mitochondrial and chloroplast proteins. *Plant Physiol* 2013; 162(1): 254-71.
- 14 Hu Y, Chen LG, Wang HP, Zhang LP, Wang F, Yu DQ. *Arabi-*

- dopsis* transcription factor *WRKY8* functions antagonistically with its interacting partner VQ9 to modulate salinity stress tolerance. *Plant J* 2013; 74(5): 730-45.
- 15 Chen JN, Nolan T, Ye HX, Zhang MC, Tong HN, Xin PY, *et al.* *Arabidopsis WRKY46, WRKY54 and WRKY70* transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought response. *Plant Cell* 2017; 29: 1425-39.
- 16 Tao Z, Kou YJ, Liu HB, Li XH, Xiao JH, Wang SP. *OsWRKY45* alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice. *J Exp Bot* 2011; 62(14): 4863-74.
- 17 Kim CY, Vo K TX, Nguyen CD, Jeong DH, Lee SK, Kumar M, *et al.* Functional analysis of a cold-responsive rice WRKY gene, *OsWRKY71*. *Plant Biotechnol Rep* 2016; 10: 13-23.
- 18 Wang F, Hou XL, Tang J, Wang Z, Wang SM, Jiang FL, *et al.* A novel cold-inducible gene from Pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*), *BcWRKY46*, enhances the cold, salt and dehydration stress tolerance in transgenic tobacco. *Mol Biol Rep* 2012; 39(4): 4553-64.
- 19 刘淑艳, 刘忠松, 官春云. 芥菜型油菜种质资源研究进展. 植物遗传资源学报(Liu Suyan, Liu Zongsong, Guan Chunyun. Advances in germplasm of oilseed *Brassica juncea*. *Journal of Plant Genetic Resources*) 2007; 8(3): 351-58.
- 20 Yang JH, Liu DY, Wang XW, Ji CM, Cheng F, Liu BN, *et al.* The genome sequence of allopolyploid *Brassica juncea* and analysis of differential homoeolog gene expression influencing selection. *Nature Genetics* 2016; 48(10): 1225-32.
- 21 Yang J, Zhang CT, Zhao N, Hu LL, Chen ZY, Zhang S, *et al.* Chinese root-type mustard provides phylogenomic insights into the evolution of the multi-use diversified allopolyploid *Brassica juncea*. *Molecular Plant* 2017; 152(5): S695.
- 22 Liu XJ, Lu Y, Yuan YH, Liu SY, Guan CY, *et al.* *De novo* transcriptome of *Brassica juncea* seed coat and identification of genes for the biosynthesis of flavonoids. *PLoS ONE* 2013; 8: e71110.
- 23 Chandna R, Augustine R, Bisht NC. Evaluation of candidate reference genes for gene expression normalization in *Brassica juncea* using real time quantitative RT-PCR. *PLoS One* 2012; 7: e36918.
- 24 Jiang YQ, Deyholos MK. Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible *WRKY25* and *WRKY33* transcription factors in abiotic stresses. *Plant Mol Biol* 2009; 69(1/2): 91-105.
- 25 Lagacé M, Matton DP. Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense*. *Planta* 2004; 219: 185-89.
- 26 Zentella R, Zhang ZL, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, *et al.* Global analysis of *della* direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; 19(10): 3037-57.
- 27 Silke R, Imre ES. Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev* 2002; 16: 1139-49.
- 28 Johnson CS, Kolevski B, Smyth DR. Transparent testa glabra2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* 2002; 14: 1359-75.
- 29 Pandey SP, Somssich IE. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol* 2009; 150(4):1648 -55.
- 30 Eulgem T, Somssich IE. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2007; 10: 366-371.
- 31 Birkenbihl RP, Diezel C, Somssich IE. *Arabidopsis WRKY33* is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiol* 2012; 159: 266-85.
- 32 Zou CS, Jiang WB, Yu DQ. Male gametophyte-specific *WRKY34* transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2010; 61(14): 3901-14.
- 33 Ren XZ, Chen ZZ, Liu Y, Zhang HR, Zhang M, Liu Q, *et al.* ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* 2010; 63(3): 417-29.
- 34 Li SJ, Fu QT, Chen LG, Huang WD, Yu DQ. *Arabidopsis thaliana WRKY25, WRKY26, and WRKY33* coordinate induction of plant thermotolerance. *Planta* 2011; 233(6): 1237-52.
- 35 Li H, Gao Y, Xu H, Dai Y, Deng DQ, Chen JM. *ZmWRKY33*, a WRKY maize transcription factor conferring enhanced salt stress tolerances in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul* 2013; 70: 207-16.