

研究简报

杨树WRKY基因家族鉴定及其干旱胁迫响应模式分析

周静[#] 曾玫艳[#] 安新民^{*}

(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要 WRKY是近年来研究较广泛的植物转录因子, 其序列的氨基(N)末端含有高度保守的七肽WRKYGQK, 能够与顺式作用元件W盒[(T)(T)TGAC(C/T)]发生特异性结合, 从而调控下游靶基因的表达。该研究利用生物信息学方法, 对杨树WRKY转录因子进行了序列鉴定、结构分析、染色体定位、结构域分析、系统进化分析和胁迫响应模式分析, 鉴定出杨树WRKY基因家族有122个成员, 分为3大类(34个I类成员、78个II类成员和10个III类成员); WRKY基因染色体定位分析发现, 位于每条染色体的数目各不相同, 并且在9号染色体上没有分布, 表明WRKY基因在染色体上呈现出不均匀分布; 系统发育分析表明, WRKY家族成员形成3个主要进化支, 此外, 结合基因结构分析发现, 位于相同进化支的WRKY基因通常具有相似的基序组成和外显子/内含子结构模式, 表明WRKY基因的功能相似性; 转录组分析发现, 62个家族成员表现出上调或下调的差异表达, 可将其划分为5个基因聚类(I、II、III、IV、V), 其中I、III、IV、V这4个聚类中绝大多数基因在干旱胁迫8 h左右表现明显上调, II类在干旱胁迫2~4 h表现明显上调, 而*PtWRKY70*、*PtWRKY81*、*PtWRKY104*、*PtWRKY108*等在干旱胁迫处理后开始明显下调, 表明WRKY基因在响应干旱胁迫的过程中具有重要作用。通过上述研究, 极大丰富了杨树WRKY基因家族以及其对于干旱胁迫的功能, 并为杨树抗旱育种计划提供了候选基因。

关键词 杨树; WRKY转录因子; 生物信息学; 干旱胁迫

Identification of *Populus trichocarpa* WRKY Gene Family and Its' Response to Drought Stress

ZHOU Jing[#], ZENG Meiyang[#], AN Xinmin^{*}

(College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract WRKY is a widely studied plant transcription factor in recent years. Its amino (N-) terminus contains a highly conserved heptapeptide WRKYGQK, which can interact with the cis-acting element W-box [(T)(T)TGAC(C/T)]

收稿日期: 2019-06-28 接受日期: 2019-09-03

转基因生物新品种培育重大专项(批准号: 2018ZX08020002-002-004)、国家自然科学基金(批准号: 31870652、31570661)和国家林业局科技发展中心项目(批准号: KJZXSA2018030)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 010-62336248, E-mail: anxinmin@bjfu.edu.cn

Received: June 28, 2019 Accepted: September 3, 2019

This work was supported by the Major Projects for the Cultivation of New Varieties of Genetically Modified Organisms (Grant No.2018ZX08020002-002-004), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31870652, 31570661), Science and Technology Development Center of the State Forestry Administration (Grant No.KJZXSA2018030)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-10-62336248, E-mail: anxinmin@bjfu.edu.cn

网络出版时间: 2019-12-11 11:00:39 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191211.1100.014.html>

(T)TGAC(C/T)] specific binding occurs, thereby regulating the expression of downstream target genes. In this study, the bioinformatics method was used to identify the WRKY transcription factors of poplar, sequence analysis, chromosomal localization, domain analysis, phylogenetic analysis and tissue expression analysis. The result suggested that 122 members of the poplar *WRKY* family were identified, and classed into 3 major categories (34 class I members, 78 class II members, and 10 class III members). Chromosomal localization analysis indicated that the number of *WRKY* genes located on each chromosome was different, and no distribution on chromosome 9, it presented an uneven distribution. Further phylogenetic analysis revealed that the *WRKY* family members formed three major clades. In addition, combined with gene structure analysis, the *WRKY* genes located in the same clades usually have similar motifs and exons/intron structure pattern, indicating the functional similarity of *WRKY* gene. Finally, we performed analysis, found that 62 family members were involved in response to drought stress, it can be divided into five gene clusters (I, II, III, IV, V), and most of the four clusters I, III, IV and V are significantly up-regulated under drought stress for about 8 h. Class II was significantly up-regulated during drought stress for 2 to 4 h, while *PtWRKY70*, *PtWRKY81*, *PtWRKY104*, and *PtWRKY108* were significantly down-regulated after drought stress treatment, it indicates that *WRKY* gene plays an important role in response to drought stress. In this study, we performed a comprehensive identification of poplar *WRKY* gene family, this work enriched our understanding of *WRKY* gene family, and provided valuable candidate genes information for the poplar drought-resistant breeding.

Keywords *Populus trichocarpa*; WRKY transcription factor; bioinformatics; drought stress

转录因子(transcription factor, TF)是一类调节所有生物体中基因表达的蛋白质,它们与基因启动子区域中的特定DNA序列结合,以激活或抑制多个靶基因的转录。WRKY是一种最先在植物中发现的转录因子^[1],该转录因子具有一段由60个氨基酸组成的高度保守的结构域,该结构域N-端含有1到2个由WRKYGQK组成的保守氨基酸序列,而C-端含有一段锌指结构^[2]。WRKY转录调控因子能够和靶基因启动子区域的DNA序列[(T)TGAC(C/T)]特异性结合,调控目的基因的表达,在病原体防御、非生物胁迫和植物激素信号传导中起着至关重要的作用^[3]。基于WRKY结构域的数量和锌指基序的类别,把WRKY转录因子分为3类: I类成员含有2个WRKY结构域,其锌指型结构为C2H2(CX4-5-C-X22-23-H-X1-H)型; II类成员含有单个WRKY结构域,其锌指型结构为C2H2(CX4-5-C-X22-23-H-X1-H)型,分为IIa、IIb、IIc、IId和IIe 5个亚家族; III类成员含有单个WRKY结构域,其锌指型结构为C2HC(C-X7-C-X23-HX)型^[4-5]。

WRKY转录因子参与植物的多种生物与非生物胁迫过程,尤其在受到外界干旱胁迫时,它可以作为正向或负向调控因子,调节相关基因的表达^[6]。Ishiguro等^[7]首次在甘薯中发现第一个WRKY转录因子并命名为SPF1(sweet potato factor 1),之后从多种植物中也鉴定出大量的WRKY转录因子。例如,

在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中鉴定出74个WRKY基因^[8],其中*AtWRKY46*的同源基因*TaWRKY146*过表达可导致拟南芥对干旱和盐胁迫的超敏感性^[9];在水稻(*Oryza sativa* L.)中鉴定出109个WRKY基因,其中*OsWRKY47*的过表达提高了产量和耐旱性^[10],而*OsWRKY13*可以与*SNAC1*和*WRKY45-1*启动子区域的WBOX1(TTGACT)和WBOXa(TTGAC)序列特异性结合,抑制*SNAC1*和*WRKY45-1*的表达,负调控水稻的抗干旱过程^[8];在大豆(*Glycine max* L.)中鉴定出197个WRKY基因,其中*GmWRKY6*、*GmWRKY46*、*GmWRKY56*、*GmWRKY106*和*GmWRKY149*基因在胁迫条件下的耐旱性与易感大豆基因型之间差异表达^[11]。此外,还在芝麻^[10]、黄瓜^[6]、玉米^[2]、番茄^[12]、棉花^[13]中鉴定出参与干旱胁迫的相关基因。

杨树具有基因组小、适应性强、易于遗传转化等特性,自2006年杨树基因组测序完成以来,杨树已经被广泛用作研究林木分子育种及逆境抗性育种的模式植物^[14],因此对杨树WRKY(*Populus trichocarpa* WRKY, *PtWRKY*)基因家族进行鉴定,研究其抗旱机理对改良抗逆性和遗传育种具有重要意义^[15]。目前,WRKY基因家族在拟南芥、烟草等模式植物中研究得比较深入,在杨树WRKY基因家族的研究也取得了一定的进展^[16-17],但随着杨树基因组数据的不断补充,关于杨树WRKY家族基因组学信息急需更新。因

此本文利用拟南芥 WRKY 转录因子从杨树(毛果杨, *Populus trichocarpa*)数据库 Phytozome v 12.1 中鉴定出杨树 WRKY 基因家族, 并通过生物信息学技术, 对杨树 WRKY 转录因子进行了序列鉴定、基因结构分析、染色体定位、结构域分析、系统进化分析和胁迫响应模式的综合分析, 为 WRKY 转录因子后续的研究, 尤其是应答干旱胁迫方面奠定了工作基础。

基因组数据来源

杨树全基因组数据来源于毛果杨数据库 Phytozome v 12.1 (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Ptrichocarpa)。

杨树 WRKY 转录因子家族鉴定与染色体定位

在 Pfam 中获得 WRKY 转录因子家族蛋白特征结构域, 利用 KMMER 构建隐马尔可夫模型, 从而获得 WRKY 转录因子家族候选蛋白, 并进一步利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 检测获得的候选蛋白是否含有 WRKY 结构域, 最终得到 122 个含有 WRKY 结构域的蛋白, 再利用 DNAMAN 5.0 软件, 将最后得到的 WRKY 蛋白的氨基酸序列进行理化性质分析, 得到 WRKY 蛋白的分子量、长度和等电点等。在 Phytozome v 12.1 数据库中找到 WRKY 基因的染色体定位信息, 通过染色体定位工具 MapInspect 作出杨树 WRKY 转录因子染色体物理定位图, 并根据在染色体上的位置对其进行命名。

杨树 WRKY 转录因子的系统进化关系分析

选取获得的杨树 WRKY 转录因子的保守结构域, 通过 MAGA 7 构建系统进化树, 并对拟南芥的 14 个 III 类基因与杨树的 10 个 III 类基因进行发育关系比对。采用邻接法 (neighbor-joining), 参数设置为默认, 自展值 (bootstrap tests) 为 1 000^[18]。

杨树 WRKY 转录因子的保守基序和基因结构

将本地建立的 WRKY 蛋白数据库导入在线软件 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 对 WRKY 蛋白保守域结构进行分析^[19]。在 Phytozome v 12.1 中进行 Blast 分析, 获得 WRKY 转录因子的 CDS 序列和基因序列, 将这两个序列导入到 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) 在线网站^[10], 对 WRKY 基因的内含子和外显子进行系统分析, 获得所有 WRKY 基因的结构示意图。

杨树 WRKY 基因的应答干旱胁迫分析

利用第二代测序技术和序列信息统计学处理, 分别用浓度为 25% 的聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG6000) 处理河北杨组培苗 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h, 与未经干旱处理的对照组对比, 提取上述样本 RNA, 送由北京源宜基因科技股份有限公司进行转录组测序, 研究干旱胁迫下 WRKY 基因转录水平的变化趋势, 采用 FPKM 法分析基因表达水平^[20], 并进一步对 WRKY 基因的表达情况进行聚类分析。

杨树 WRKY 转录因子家族鉴定

在杨树基因组中最终筛选出 122 个 WRKY 基因, 根据其在染色体上的位置命名: PtWRKY1~PtWRKY122, 并进行鉴定和分析 (表 1)。结果显示, 122 个 WRKY 转录因子蛋白大小在 165~732 aa 之间, PtWRKY39 编码的蛋白序列最长 (732 aa); PtWRKY43 编码的蛋白序列最短 (165 aa), PtWRKY 41 和 PtWRKY43 的 WRKY 结构域为变异类型 WRKYGKK, 锌指结构为 C2H2, 其他序列的 WRKY 结构域均为 WRKYGQK, PtWRKY 113~PtWRKY122 的锌指结构为 C2HC 形式。

杨树 WRKY 基因家族的染色体定位

运用染色体定位绘图软件 MapInspect, 获得 122 个杨树 WRKY 基因的染色体位置信息图 (图 1)。其中 PtWRKY64 没有定位到任何染色体上, 剩余 121 个 WRKY 基因在 19 条染色体上呈不均等分布, 1 号染色体含有最多的 WRKY 基因, 共有 17 个成员分布, 占总数的 14%, 19 号染色体仅有 1 个基因, 不足总数的 1%。个别基因没有在 19 条染色体上分布, 如 9 号染色体没有 WRKY 基因的定位信息。

WRKY 基因在杨树染色体上的分布存在着基因簇现象, 由图可知, 在 121 个 WRKY 基因中共找到 30 个基因簇, 包含 77 条 PtWRKY 基因。其中 14 号染色体上分布的基因簇最多, 共有 4 个基因簇 12 个基因, 表明 14 号染色体上可能存在着 WRKY 基因聚集热点, 该位点可能在长期进化过程中发生过 WRKY 基因的大规模复制, 从而导致该类型基因有如此高的密度^[16]。

杨树 WRKY 转录因子系统进化关系分析

为了明确杨树 WRKY 转录因子的分类情况, 本研究使用 MAGA 7 对 122 个杨树 WRKY 转录因子

表1 杨树WRKY转录因子基因家族

Table 1 The WRKY transcript factor gene family in *Populus trichocarpa*

基因名称 Gene name	蛋白序列名称 TF ID	定位 Location	类别 Group	WRKY区域 WRKY domain	锌指结构 Zinc-finger	大小/aa Size /aa	分子量Da MW /Da	等电点 pI
<i>PtWRKY1</i>	Potri.016G083600.4	Chr16:6510114..6514741	I	WRKYGQK	C2H2	353	39 174	9.00
<i>PtWRKY2</i>	Potri.016G083600.8	Chr16:6510114..6513283	I	WRKYGQK	C2H2	469	51 478	9.54
<i>PtWRKY3</i>	Potri.016G083600.2	Chr16:6510114..6514760	I	WRKYGQK	C2H2	382	42 169	10.07
<i>PtWRKY4</i>	Potri.016G083600.1	Chr16:6509598..6514741	I	WRKYGQK	C2H2	469	51 478	9.54
<i>PtWRKY5</i>	Potri.006G133200.2	Chr06:10970146..10974788	I	WRKYGQK	C2H2	359	39 889	7.98
<i>PtWRKY6</i>	Potri.006G133200.1	Chr06:10969866..10974789	I	WRKYGQK	C2H2	475	51 956	9.27
<i>PtWRKY7</i>	Potri.013G153400.1	Chr13:15672152..15675074	I	WRKYGQK	C2H2	591	64 859	7.39
<i>PtWRKY8</i>	Potri.006G105300.1	Chr06:8125329..8128097	I	WRKYGQK	C2H2	546	60 267	8.97
<i>PtWRKY9</i>	Potri.016G128300.1	Chr16:13096393..13099016	I	WRKYGQK	C2H2	579	63 902	6.19
<i>PtWRKY10</i>	Potri.008G091900.1	Chr08:5759575..5763061	I	WRKYGQK	C2H2	492	54 084	8.61
<i>PtWRKY11</i>	Potri.010G163000.1	Chr10:16770595..16774139	I	WRKYGQK	C2H2	499	54 477	8.53
<i>PtWRKY12</i>	Potri.011G169300.1	Chr11:18450851..18455892	I	WRKYGQK	C2H2	725	78 360	5.78
<i>PtWRKY13</i>	Potri.011G169300.2	Chr11:18450668..18455252	I	WRKYGQK	C2H2	708	76 488	5.88
<i>PtWRKY14</i>	Potri.001G361600.1	Chr01:37367919..37373720	I	WRKYGQK	C2H2	558	60 507	6.55
<i>PtWRKY15</i>	Potri.001G361600.2	Chr01:37367548..37373720	I	WRKYGQK	C2H2	557	60 355	6.55
<i>PtWRKY16</i>	Potri.011G087900.1	Chr11:10507794..10514869	I	WRKYGQK	C2H2	561	60 791	7.00
<i>PtWRKY17</i>	Potri.011G087900.2	Chr11:10508420..10514869	I	WRKYGQK	C2H2	442	48 188	6.78
<i>PtWRKY18</i>	Potri.004G120800.1	Chr04:11338804..11343998	I	WRKYGQK	C2H2	543	59 493	7.40
<i>PtWRKY19</i>	Potri.004G120800.2	Chr04:11338805..11343998	I	WRKYGQK	C2H2	482	53 037	6.80
<i>PtWRKY20</i>	Potri.017G088300.1	Chr17:10559295..10564769	I	WRKYGQK	C2H2	535	58 597	8.00
<i>PtWRKY21</i>	Potri.017G088300.2	Chr17:10559234..10564794	I	WRKYGQK	C2H2	532	58 210	7.81
<i>PtWRKY22</i>	Potri.013G086000.1	Chr13:8100301..8104436	I	WRKYGQK	C2H2	716	78 379	6.63
<i>PtWRKY23</i>	Potri.002G221600.2	Chr02:20862009..20864972	I	WRKYGQK	C2H2	316	35 021	8.05
<i>PtWRKY24</i>	Potri.014G164300.4	Chr14:12986031..12989438	I	WRKYGQK	C2H2	485	53 339	5.96
<i>PtWRKY25</i>	Potri.014G164300.1	Chr14:12985555..12989438	I	WRKYGQK	C2H2	485	53 339	5.96
<i>PtWRKY26</i>	Potri.014G164300.3	Chr14:12985663..12989438	I	WRKYGQK	C2H2	327	36 242	7.27
<i>PtWRKY27</i>	Potri.014G164300.5	Chr14:12986954..12989438	I	WRKYGQK	C2H2	485	53 339	5.96
<i>PtWRKY28</i>	Potri.006G184800.1	Chr06:19846841..19852326	I	WRKYGQK	C2H2	522	56 862	6.31
<i>PtWRKY29</i>	Potri.006G184800.3	Chr06:19846931..19852326	I	WRKYGQK	C2H2	506	55 031	6.20
<i>PtWRKY30</i>	Potri.018G107000.2	Chr18:13340741..13347701	I	WRKYGQK	C2H2	523	57 419	5.75
<i>PtWRKY31</i>	Potri.018G107000.1	Chr18:13340738..13347744	I	WRKYGQK	C2H2	531	58 308	5.60
<i>PtWRKY32</i>	Potri.018G107000.3	Chr18:13340738..13347701	I	WRKYGQK	C2H2	520	57 121	5.68
<i>PtWRKY34</i>	Potri.018G019000.1	Chr18:1444549..1447195	I	WRKYGQK	C2H2	466	51 055	8.94
<i>PtWRKY35</i>	Potri.016G099900.1	Chr16:9770417..9772150	IIa	WRKYGQK	C2H2	309	34 650	5.75
<i>PtWRKY36</i>	Potri.001G472800.5	Chr01:50403473..50406166	IIa	WRKYGQK	C2H2	533	57 616	6.40
<i>PtWRKY37</i>	Potri.001G472800.6	Chr01:50403473..50405665	IIa	WRKYGQK	C2H2	513	55 598	6.39
<i>PtWRKY38</i>	Potri.001G472800.2	Chr01:4503179..4509102	IIa	WRKYGQK	C2H2	731	78 653	6.15
<i>PtWRKY39</i>	Potri.001G472800.1	Chr01:3209312..3211607	IIa	WRKYGQK	C2H2	732	78 819	6.24
<i>PtWRKY40</i>	Potri.001G472800.3	Chr01:7812739..7813453	IIa	WRKYGQK	C2H2	731	78 713	6.15
<i>PtWRKY41</i>	Potri.005G085200.1	Chr01:33209754..33213251	IIa	WRKYGKK	C2H2	206	22 848	6.06
<i>PtWRKY42</i>	Potri.007G079800.2	Chr07:10382370..10385056	IIa	WRKYGQK	C2H2	190	21 650	6.50
<i>PtWRKY43</i>	Potri.006G224100.1	Chr01:36029746..36031662	IIa	WRKYGKK	C2H2	165	18 780	5.35
<i>PtWRKY44</i>	Potri.002G138900.1	Chr02:9218413..9220464	IIa	WRKYGQK	C2H2	203	23 399	7.61
<i>PtWRKY45</i>	Potri.014G050000.1	Chr14:4012998..4017289	IIa	WRKYGQK	C2H2	228	26 381	6.27
<i>PtWRKY46</i>	Potri.005G086400.1	Chr05:6445488..6450574	IIa	WRKYGQK	C2H2	223	25 445	9.08

续表1

基因名称 Gene name	蛋白序列名称 TF ID	定位 Location	类别 Group	WRKY区域 WRKY domain	锌指结构 Zinc-finger	大小/aa Size /aa	分子量Da MW /Da	等电点 pI
<i>PtWRKY47</i>	Potri.007G078200.1	Chr07:10194776..10198496	IIa	WRKYGQK	C2H2	233	26 349	9.50
<i>PtWRKY48</i>	Potri.001G328000.1	Chr03:15201353..15202963	IIa	WRKYGQK	C2H2	267	30 671	8.95
<i>PtWRKY49</i>	Potri.T043800.1	Chr03:17915557..17918119	IIa	WRKYGQK	C2H2	186	21 227	9.96
<i>PtWRKY50</i>	Potri.012G101000.1	Chr02:15398964..15402809	IIa	WRKYGQK	C2H2	186	21 471	8.98
<i>PtWRKY51</i>	Potri.015G099200.1	Chr15:11835261..11837075	IIa	WRKYGQK	C2H2	178	20 368	9.68
<i>PtWRKY52</i>	Potri.002G164900.1	Chr02:12450751..12452084	IIa	WRKYGQK	C2H2	193	21 869	9.22
<i>PtWRKY53</i>	Potri.002G193000.1	Chr01:50403473..50408934	IIa	WRKYGQK	C2H2	317	35 363	6.78
<i>PtWRKY54</i>	Potri.014G118200.1	Chr14:9188997..9190859	IIa	WRKYGQK	C2H2	319	35 854	7.34
<i>PtWRKY55</i>	Potri.008G103300.1	Chr02:2783127..2786060	IIa	WRKYGQK	C2H2	368	40 848	7.34
<i>PtWRKY56</i>	Potri.008G094000.1	Chr08:5884501..5889490	IIa	WRKYGQK	C2H2	293	32 219	5.81
<i>PtWRKY57</i>	Potri.010G160100.1	Chr10:16599809..16606223	IIa	WRKYGQK	C2H2	293	32 560	6.43
<i>PtWRKY58</i>	Potri.002G059100.1	Chr01:50403473..50407630	IIa	WRKYGQK	C2H2	325	36 541	7.28
<i>PtWRKY59</i>	Potri.002G059100.2	Chr02:3993054..3995674	IIa	WRKYGQK	C2H2	324	36 454	7.28
<i>PtWRKY60</i>	Potri.005G203200.1	Chr05:21797854..21801101	IIa	WRKYGQK	C2H2	322	36 271	7.34
<i>PtWRKY61</i>	Potri.001G352400.1	Chr01:50403473..50408374	IIa	WRKYGQK	C2H2	312	34 855	6.34
<i>PtWRKY62</i>	Potri.011G079300.1	Chr11:7865659..7867200	IIa	WRKYGQK	C2H2	306	33 899	7.67
<i>PtWRKY63</i>	Potri.001G208600.1	Chr01:20898737..20901171	IIb	WRKYGQK	C2H2	519	56 452	5.88
<i>PtWRKY64</i>	Potri.002G228400.3	Chr02:21820126..21822589	IIb	WRKYGQK	C2H2	613	66 262	6.12
<i>PtWRKY65</i>	Potri.011G007800.2	Chr11:575924..578528	IIc	WRKYGQK	C2H2	590	64 114	6.64
<i>PtWRKY66</i>	Potri.011G007800.3	Chr11:576073..578528	IIc	WRKYGQK	C2H2	438	47 496	8.37
<i>PtWRKY67</i>	Potri.011G007800.1	Chr05:6324424..6327310	IIc	WRKYGQK	C2H2	593	64 455	6.64
<i>PtWRKY68</i>	Potri.004G007500.1	Chr04:479125..481848	IIc	WRKYGQK	C2H2	578	62 371	6.73
<i>PtWRKY69</i>	Potri.014G111900.1	Chr05:3917572..3920158	IIc	WRKYGQK	C2H2	502	54 005	6.99
<i>PtWRKY70</i>	Potri.014G155100.1	Chr05:11954643..11956649	IIc	WRKYGQK	C2H2	624	67 396	5.78
<i>PtWRKY71</i>	Potri.002G228400.1	Chr02:21820126..21822588	IIc	WRKYGQK	C2H2	617	66 773	6.34
<i>PtWRKY72</i>	Potri.002G228400.2	Chr02:21819882..21822588	IIc	WRKYGQK	C2H2	576	62 053	6.17
<i>PtWRKY73</i>	Potri.002G186600.2	Chr02:14641652..14644811	IIc	WRKYGQK	C2H2	366	38 918	8.27
<i>PtWRKY74</i>	Potri.015G064100.1	Chr05:23151059..23153203	IIc	WRKYGQK	C2H2	628	67 455	6.21
<i>PtWRKY75</i>	Potri.017G079500.1	Chr17:9321138..9323815	IIc	WRKYGQK	C2H2	538	58 296	6.26
<i>PtWRKY76</i>	Potri.018G019700.1	Chr18:1491298..1492943	IIc	WRKYGQK	C2H2	271	30 441	7.52
<i>PtWRKY77</i>	Potri.001G044500.2	Chr01:3209319..3211607	IIc	WRKYGQK	C2H2	252	28 673	9.03
<i>PtWRKY78</i>	Potri.003G182200.1	Chr03:18904988..18907381	IIc	WRKYGQK	C2H2	319	35 634	8.48
<i>PtWRKY79</i>	Potri.001G044500.1	Chr06:5375343..5377292	IIc	WRKYGQK	C2H2	318	35 092	8.85
<i>PtWRKY80</i>	Potri.006G263600.1	Chr06:23609786..23611128	IIc	WRKYGQK	C2H2	320	35 376	8.34
<i>PtWRKY81</i>	Potri.018G019800.1	Chr06:26679119..26680878	IIc	WRKYGQK	C2H2	320	35 530	9.27
<i>PtWRKY82</i>	Potri.018G019800.4	Chr18:1505147..1507003	IIc	WRKYGQK	C2H2	259	28 521	9.49
<i>PtWRKY83</i>	Potri.007G047400.1	Chr17:15509535..15511261	IId	WRKYGQK	C2H2	335	36 762	9.97
<i>PtWRKY84</i>	Potri.005G141400.1	Chr17:12179899..12182330	IId	WRKYGQK	C2H2	331	36 592	9.56
<i>PtWRKY85</i>	Potri.014G024200.1	Chr18:587550..590270	IId	WRKYGQK	C2H2	388	42 890	9.61
<i>PtWRKY86</i>	Potri.014G024200.2	Chr14:2074654..2077158	IId	WRKYGQK	C2H2	361	39 823	9.55
<i>PtWRKY87</i>	Potri.014G024200.3	Chr14:2074706..2077146	IId	WRKYGQK	C2H2	360	39 736	9.55
<i>PtWRKY88</i>	Potri.018G008500.1	Chr18:1505147..1507026	IId	WRKYGQK	C2H2	338	36 782	9.73
<i>PtWRKY89</i>	Potri.006G072400.1	Chr18:15890044..15892257	IId	WRKYGQK	C2H2	301	32 861	10.21
<i>PtWRKY90</i>	Potri.018G139300.1	scaffold_41:135129..137486	IId	WRKYGQK	C2H2	300	32 972	10.19
<i>PtWRKY91</i>	Potri.002G043500.1	Chr14:8765075..8768810	IId	WRKYGQK	C2H2	351	38 872	10.07
<i>PtWRKY92</i>	Potri.005G219500.1	Chr14:9270774..9272792	IId	WRKYGQK	C2H2	347	38 513	9.93

续表1

基因名称 Gene name	蛋白序列名称 TF ID	定位 Location	类别 Group	WRKY区域 WRKY domain	锌指结构 Zinc-finger	大小/aa Size /aa	分子量Da MW /Da	等电点 pI
<i>PtWRKY93</i>	Potri.005G055300.1	Chr14:12072684..12075554	IId	WRKYGQK	C2H2	353	39 651	10.02
<i>PtWRKY94</i>	Potri.013G042600.1	Chr15:8835584..8840603	IId	WRKYGQK	C2H2	354	40 034	10.11
<i>PtWRKY95</i>	Potri.001G121300.1	Chr01:9788352..9790660	IId	WRKYGQK	C2H2	314	35 150	9.72
<i>PtWRKY96</i>	Potri.003G111900.1	Chr14:7118925..7121224	IId	WRKYGQK	C2H2	310	35 031	9.77
<i>PtWRKY97</i>	Potri.003G111900.2	Chr03:13552524..13555165	IId	WRKYGQK	C2H2	304	34 367	9.77
<i>PtWRKY98</i>	Potri.011G070100.1	Chr14:2074611..2077146	Ile	WRKYGQK	C2H2	268	30 018	5.74
<i>PtWRKY99</i>	Potri.002G164400.2	Chr02:12421400..12423249	Ile	WRKYGQK	C2H2	310	33 774	7.99
<i>PtWRKY100</i>	Potri.014G090300.2	Chr14:7098996..7100670	Ile	WRKYGQK	C2H2	322	35 287	7.90
<i>PtWRKY101</i>	Potri.002G164400.1	Chr10:15695587..15697571	Ile	WRKYGQK	C2H2	354	38 804	6.15
<i>PtWRKY102</i>	Potri.001G099000.1	Chr07:4352721..4355025	Ile	WRKYGQK	C2H2	167	18 805	5.77
<i>PtWRKY103</i>	Potri.003G132700.1	Chr08:6548117..6549941	Ile	WRKYGQK	C2H2	330	36 992	5.36
<i>PtWRKY104</i>	Potri.017G149000.1	Chr11:6568512..6570537	Ile	WRKYGQK	C2H2	412	45 573	5.60
<i>PtWRKY105</i>	Potri.004G072000.1	Chr04:6057099..6058855	Ile	WRKYGQK	C2H2	430	46 958	4.92
<i>PtWRKY106</i>	Potri.001G460600.1	Chr01:49433744..49436406	Ile	WRKYGQK	C2H2	423	45 979	5.61
<i>PtWRKY107</i>	Potri.011G157100.1	Chr11:17485027..17487804	Ile	WRKYGQK	C2H2	450	48 539	5.39
<i>PtWRKY108</i>	Potri.014G119800.1	Chr13:2993743..2996226	Ile	WRKYGQK	C2H2	262	29 866	5.11
<i>PtWRKY109</i>	Potri.014G119800.2	Chr14:9270953..9272792	Ile	WRKYGQK	C2H2	235	26 809	4.89
<i>PtWRKY110</i>	Potri.002G195300.1	Chr12:12608185..12609465	Ile	WRKYGQK	C2H2	245	27 662	5.67
<i>PtWRKY111</i>	Potri.002G195300.2	Chr02:15629980..15631893	Ile	WRKYGQK	C2H2	245	27 662	5.67
<i>PtWRKY112</i>	Potri.002G195300.3	Chr02:15629985..15631893	Ile	WRKYGQK	C2H2	245	27 886	5.94
<i>PtWRKY113</i>	Potri.001G092900.1	Chr01:7326486..7329009	III	WRKYGQK	C2HC	338	37 925	5.74
<i>PtWRKY114</i>	Potri.003G138600.1	Chr03:15656901..15658916	III	WRKYGQK	C2HC	342	38 349	5.09
<i>PtWRKY115</i>	Potri.012G031700.1	Chr12:2820069..2822264	III	WRKYGQK	C2HC	371	41 314	5.46
<i>PtWRKY116</i>	Potri.002G168700.1	Chr02:12778165..12781030	III	WRKYGQK	C2HC	363	40 894	5.77
<i>PtWRKY117</i>	Potri.014G096200.1	Chr14:7526597..7529192	III	WRKYGQK	C2HC	365	41 134	4.93
<i>PtWRKY118</i>	Potri.013G090300.1	Chr13:9541636..9543313	III	WRKYGQK	C2HC	324	36 651	5.15
<i>PtWRKY119</i>	Potri.006G109100.1	Chr06:8522038..8524071	III	WRKYGQK	C2HC	333	37 646	6.05
<i>PtWRKY120</i>	Potri.016G137900.1	Chr16:14049379..14051741	III	WRKYGQK	C2HC	321	36 005	5.81
<i>PtWRKY121</i>	Potri.013G090400.1	Chr13:9549330..9551441	III	WRKYGQK	C2HC	352	38 989	5.67
<i>PtWRKY122</i>	Potri.019G059300.1	Chr19:9106420..9108112	III	WRKYGQK	C2HC	252	26 661	6.38

进行系统进化树构建(图2)。杨树WRKY基因家族可分为I、II和III 3种类型, II组可进一步分为IIa、IIb、IIc、IId和Ile亚组, 分别有28、2、18、15和15个成员。34个WRKY转录因子被聚类在I组, 占杨树WRKY转录因子总家族的27.88%; II组和III组分别占WRKY转录因子总家族的63.93%和8.20%; III组所包含的WRKY转录因子最少, 仅仅有10个: *PtWRKY113~PtWRKY122*。由进化树可看到各个组与亚组进化关系的远近, I组和II组处在同一分支, 其亲缘关系可能比较相近, IId亚组和Ile亚组是由同一个进化支分裂而成, 进化关系也比较近, 最后独立的一个分支是III组。

本文采用邻近法, 对拟南芥的14个III类基因与

杨树的10个III类基因进行了发育关系比对(图3)。从图上可看出大多数同一物种的WRKY蛋白序列相似性较高, 如拟南芥AT5G01900.1、AT1G66550.2、AT1G66600.1、AT1G80590.1、AT1G66560.1、AT1G66550.1、AT5G22570.1聚集在一个进化支上。此外, 从图上可以看出, 杨树所有的III类基因与拟南芥III类有些基因进化关系比较近, 因为许多杨树基因和拟南芥基因是由同一个支进化而来, 因此我们能够通过拟南芥WRKY基因的信息与功能来预测杨树相似基因的信息和功能。

杨树WRKY转录因子保守基序分析

除了WRKY外显子/内含子结构外, 其他保守基

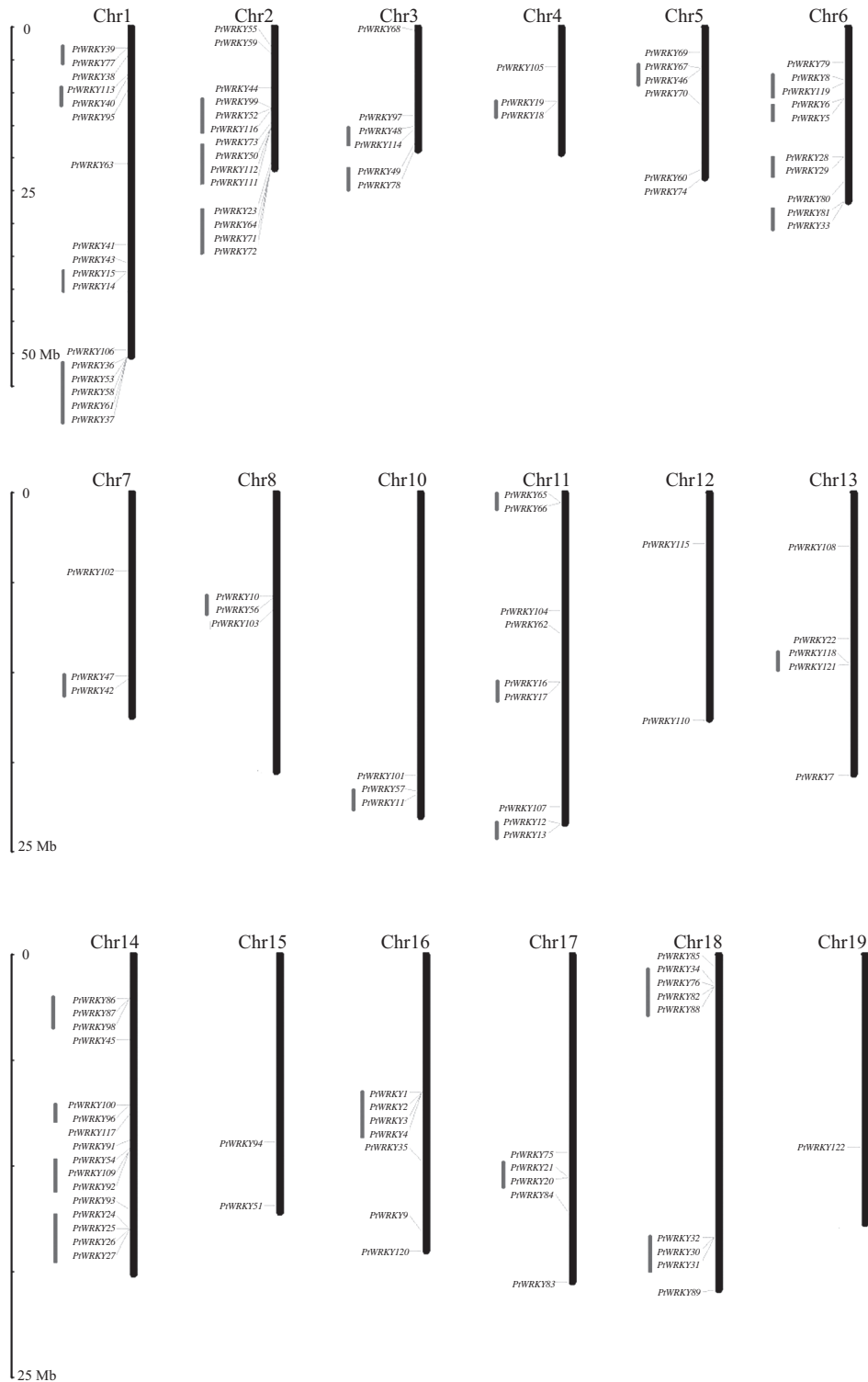


图1 杨树WRKY基因家族染色体定位
Fig.1 Chromosomal locations of PtWRKY gene family

序对于杨树WRKY蛋白的多样化功能也很重要。因此,利用在线软件MEME鉴定杨树WRKY基因的保守结构域(图4和图5)。结果显示,杨树的所有WRKY基因都有保守功能域,且包含3个保守元件: N-端的WRKY结构域由元件1和元件2构成;而C-端的

WRKY结构域由元件3构成。I组中全部基因都由3个元件组成,即含有2个WRKY结构域; II组中 *PtWRKY36*、*PtWRKY37*、*PtWRKY38*、*PtWRKY39*、*PtWRKY40*由3个元件组成,但从整体趋势来看只有1、2元件,即含有1个WRKY结构域; III组中全部基

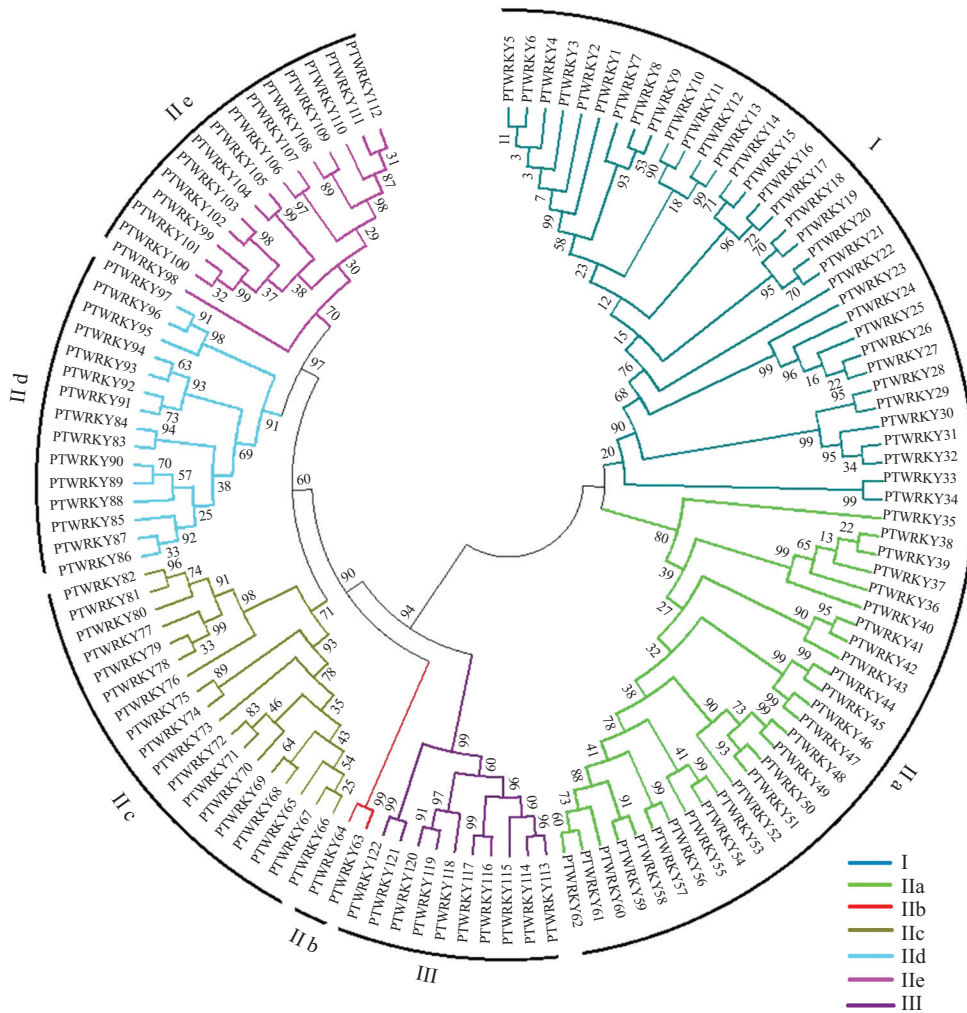


图2 杨树WRKY转录因子的系统发生树

Fig.2 Phylogenetic tree of PtWRKY transcript factor

因都只由1、2元件组成,即只含有1个WRKY结构域。

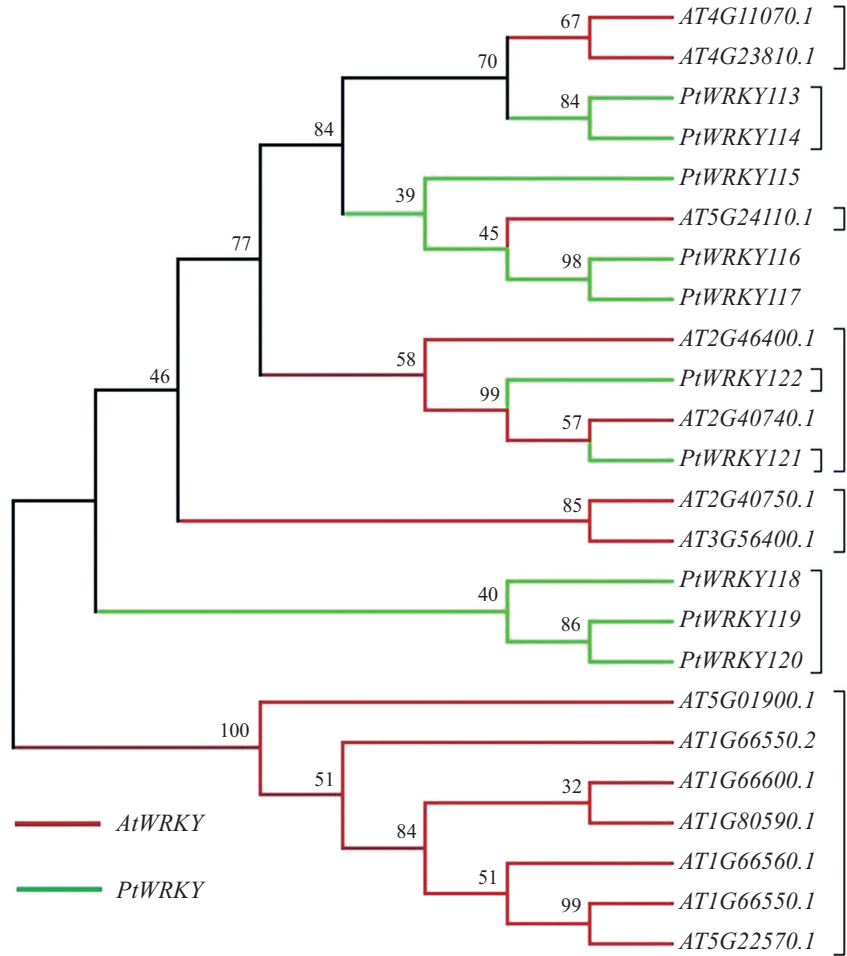
杨树WRKY转录因子结构分析

为了进一步研究WRKY基因的结构,利用GSDS(<http://gsds1.cbi.pku.edu.cn/>)绘制杨树WRKY基因家族的结构图(图6)。发现大多数WRKY基因的核苷酸序列包含以下三个部分:UTR(非翻译区,即信使RNA分子两端的非编码片段)、内含子区域和外显子区域。少数WRKY基因,如*PtWRKY102*、*PtWRKY106*、*PtWRKY107*、*PtWRKY121*、*PtWRKY122*等,缺少UTR,内含子把WRKY基因的核苷酸序列分割成多个部分,且数目不固定,由1个到6个不等。属于同一类的基因其核苷酸结构比较相像,例如:*PtWRKY20*和*PtWRKY21*同属于I组,由2个UTR、4个外显子和3个内含子构成;*PtWRKY36*、*PtWRKY37*和

*PtWRKY38*同属于IIa亚组,由2个UTR、5个外显子和4个内含子构成,表明WRKY蛋白之间的功能相似性^[1]。

杨树WRKY基因家族响应干旱胁迫的表达分析

利用第二代测序技术和序列信息统计学处理,分别用浓度为25%的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG6000)处理河北杨1 h、2 h、4 h、6 h、8 h,未处理组作为对照。通过GO分类预测,共有62个WRKY基因的Unigene被注释上,为了更直观地分析62个WRKY基因的表达趋势,对不同干旱胁迫条件下WRKY基因的表达情况进行聚类分析,得到聚类表达分析谱(图7)。根据图中基因的表达情况,可将其划分为5个基因聚类(I、II、III、IV、V),相同的聚类反映了具有相同表达特征的基因。从图中可以直

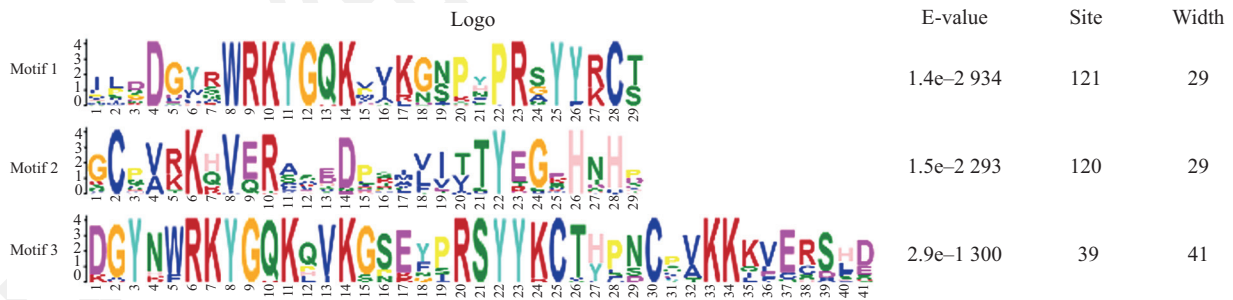


AtWRKY: 拟南芥的14个III类WRKY基因; *PtWRKY*: 杨树的10个III类WRKY基因。

AtWRKY: 14 class III WRKY genes in *Arabidopsis*; *PtWRKY*: 10 class III WRKY genes in *poplar trichocarpa*.

图3 毛果杨和拟南芥III类WRKY结构域的系统进化关系

Fig.3 Phylogenetic relationships of WRKY conserved domain in type III of *Populus trichocarpa* and *Arabidopsis* WRKY proteins



图中字母代表氨基酸, 颜色不代表任何含义, 由软件自动合成, 且字母高低代表基序保守性, 字母越高保守性越高, 反之越低。

In the figure, the letters represent amino acids, and the colors do not represent any meaning, they are automatically synthesized by the software, and the height of the letters represents the conserved motifs. The higher the letters, the higher the conservation, and vice versa.

图4 杨树WRKY基因家族基序

Fig.4 Discovered motifs of *PtWRKY* gene family

观的看出, 几乎所有的基因都呈现出明显的表达特异性。其中, I、III、IV、V这四个聚类中绝大多数基因在干旱胁迫8 h左右表现明显上调, II类在干旱胁迫2~4 h表现明显上调, 而*PtWRKY70*、*PtWRK81*、

PtWRKY104、*PtWRKY108*等在干旱胁迫处理后开始明显下调, 结果表明这些基因在对不同干旱胁迫的响应中可能发挥不同的作用。

WRKY作为转录因子, 参与了多种生物和非生

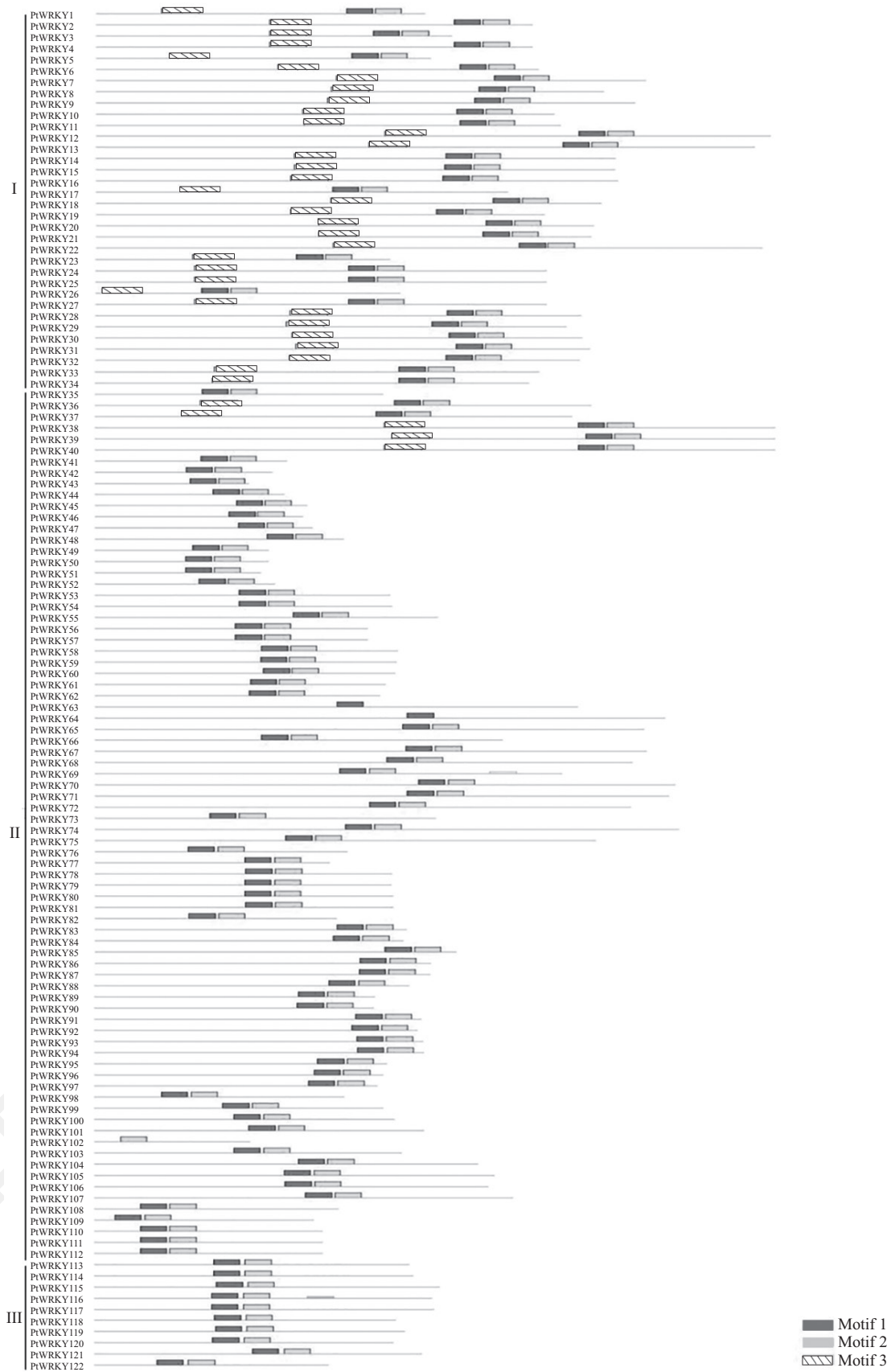


图5 杨树WRKY蛋白保守基序分析图

Fig.5 Distribution of conserved motifs in *PtWRKY* proteins



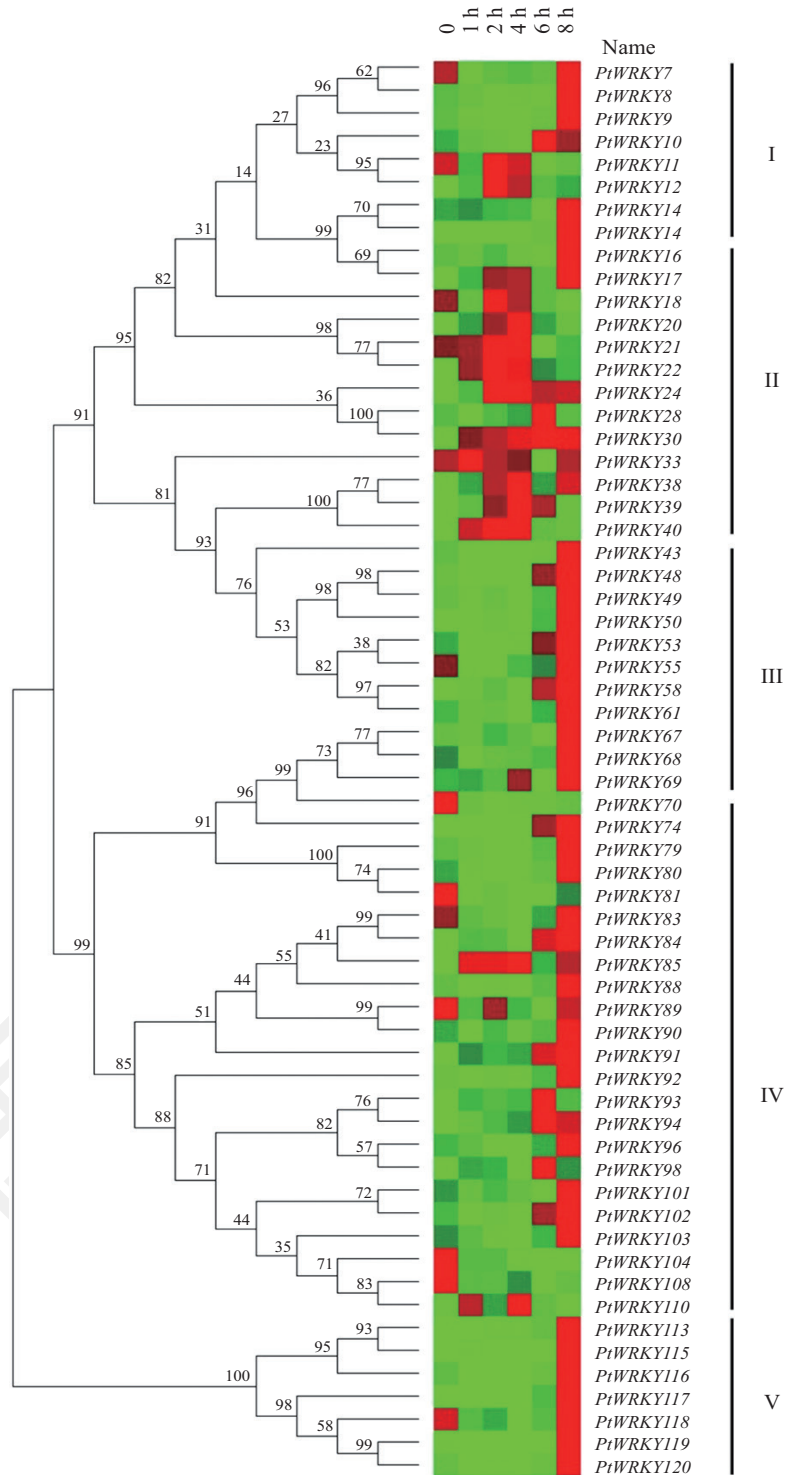
图6 杨树WRKY基因的结构分析

Fig.6 The structural analysis of *PtWRKY* genes

物胁迫介导的调节过程。在本研究中, 我们根据毛果杨数据库Phytozome v 12.1最新数据, 对木本植物杨树WRKY基因家族进行了全基因组分析, 鉴定了杨树基因组中的122个基因成员, 分析了杨树WRKY

基因家族的基因组结构, 染色体位置, 系统进化分析和逆境胁迫响应模式, 这些研究结果为进一步研究WRKY基因的功能奠定了基础^[21]。

为了探索WRKY基因家族如何进化, 我们对杨



图中不同颜色的小方块代表基因表达谱数据, 红色和绿色反映基因的转录水平是否在相同条件下上调或下调, 颜色深度表示绝对值的大小。

The small squares of different colors in the figure represent gene expression profile data, and the red and green reflect whether the transcription level of the gene is up- or down-regulated under the same conditions, and the color depth indicates the absolute value.

图7 干旱胁迫下62个杨树WRKY基因的表达水平

Fig.7 Expression profile of 62 *PtWRKY* genes under drought stress

树的WRKY蛋白成员进行了全基因组比较,并对其进行了系统发育分析,122个WRKY蛋白成员分成三个进化支,发现属于相同进化支的成员通常具有相似的基序组成和外显子/内含子结构,表明它们可能具有相似的功能^[22];位于每个进化支中的特定序列基序可赋予WRKY蛋白特定的功能,不同分支中这些特征的差异表明WRKY基因在功能上的多样化。

对外显子和内含子的研究有助于了解基因的结构和功能上的差异^[23],它们的获得或丢失可能是由不同染色体之间的基因重复引起的^[24]。我们发现,122个WRKY基因含有不同数量的外显子和内含子,表明这3类基因存在一定的多样性。例如,WRKY基因*PtWRKY36*具有5个外显子和4个内含子,而*PtWRKY20*具有4个外显子和3个内含子。

基因的特异性表达通常反映其相应的功能。在葡萄中,干旱胁迫处理下的*VvWRKY24*和*VvWRKY49*表达量上升,其他基因无明显变化^[25];在茶树中,*CsWRKY1*、*CsWRKY2*、*CsWRKY20*和*CsWRKY44*在干旱胁迫处理过程中表达量显著降低,处理后期表达量有所上调,但仍显著低于处理前,表明干旱胁迫处理抑制其表达^[26]。本文通过聚类分析把与干旱胁迫相关的62个杨树WRKY基因分为5类,其中,I、III、IV、V这4个聚类中绝大多数基因在干旱胁迫8 h左右表现明显上调,II类在干旱胁迫2~4 h表现明显上调,而*PtWRKY70*、*PtWRKY81*、*PtWRKY104*、*PtWRKY108*等在干旱胁迫处理后开始明显下调,这些研究结果都表明,WRKY基因在对不同干旱胁迫的响应中可能发挥不同的作用。

杨树作为木本植物的模式植物,与拟南芥相比具有不同的生活史,并且在发育和基因调控网络方面可能更复杂。有大量证据表明,WRKY基因参与调节植物发育和生理过程,在非生物和生物应激诱导的防御信号通路的反应中起着至关重要的作用。干旱胁迫对植物生长发育造成的损害在所有非生物胁迫中占首位,但除了干旱胁迫,WRKY转录因子在其他非生物胁迫中也发挥了重要的功能,例如:盐碱胁迫、温度、无机元素、氧化、光照等其他非生物胁迫。此外,WRKY转录因子可参与多个非生物胁迫应答,与其他蛋白间相互作用也起到至关重要的影响。从应用的角度来看,WRKY基因在胁迫抗性中具有潜在价值,可以通过靶向这些基因来改善非生物和生物应激反应。该研究提供了对杨树基因组中该基因家族的综合分析,为之后关于应答干旱胁迫方向的研究

提供了候选基因信息。

参考文献 (References)

- 1 Wang Y, Feng L, Zhu Y, Li Y, Yan H, Xiang Y, *et al.* Comparative genomic analysis of the WRKY III gene family in populus, grape, arabidopsis and rice. *Biol Direct* 2015; doi: 10.1186/s13062-015-0076-3.
- 2 Wang CT, Ru JN, Liu YW, Li M, Zhao D, Yang JF, *et al.* Maize WRKY transcription factor ZmWRKY106 confers drought and heat tolerance in transgenic plants. *Int J Mol Sci* 2018; 19(10): pii: e3046.
- 3 Satapathy L, Kumar D, Kumar M, Mukhopadhyay K. Functional and DNA-protein binding studies of WRKY transcription factors and their expression analysis in response to biotic and abiotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *3 Biotech* 2018; 8(1): 40.
- 4 Song H, Sun W, Yang G, Sun J. WRKY transcription factors in legumes. *BMC Plant Biol* 2018; 18(1): 243.
- 5 贾彩红, 王卓, 张建斌, 王静毅, 苗红霞, 刘菊华, 等. 香蕉中8个WRKY转录因子的克隆及表达分析. *热带作物学报* (Jia Caihong, Wang Zhuo, Zhang Jianbin, Wang Jingyi, Miao Hongxia, Liu Juhua, *et al.* Cloning and expression analysis of eight WRKY transcription factors in bananas. *Chin J Trop Crops*) 2018; 39(11): 87-93.
- 6 Ling J, Jiang W, Zhang Y, Yu H, Mao Z, Gu X, *et al.* Genome-wide analysis of WRKY gene family in *Cucumis sativus*. *BMC Genomics* 2011; doi: 10.1186/1471-2164-12-471.
- 7 喻门. 小麦WRKY基因的克隆及其在逆境胁迫反应下的表达变化. 华中科技大学(硕士论文), 2009.
- 8 Birkenbihl RP, Kracher B, Ross A, Kramer K, Finkemeier I, Somssich IE. Principles and characteristics of the *Arabidopsis* WRKY regulatory network during early MAMP-triggered immunity. *Plant J* 2018; 96(3): 487-502.
- 9 Ma J, Gao X, Liu Q, Shao Y, Zhang D, Jiang L, *et al.* Overexpression of increases drought tolerance through inducing stomatal closure in. *Front Plant Sci* 2017; 8: 2036.
- 10 Li D, Liu P, Yu J, Wang L, Dossa K, Zhang Y, *et al.* Genome-wide analysis of WRKY gene family in the sesame genome and identification of the WRKY genes involved in responses to abiotic stresses. *BMC Plant Biol* 2017; 17(1): 152.
- 11 Dias LP, de Oliveira-Busatto LA, Bodanese-Zanettini MH. The differential expression of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] WRKY genes in response to water deficit. *Plant Physiol Biochem* 2016; 107: 288-300.
- 12 Huang S, Gao Y, Liu J, Peng X, Niu X, Fei Z, *et al.* Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*. *Mol Genet Genomics* 2012; 287(6): 495-513.
- 13 Dou L, Zhang X, Pang C, Song M, Wei H, Yu S. Genome-wide analysis of the WRKY gene family in cotton. *Mol Genet Genomics* 2014; 289(6): 1103-21.
- 14 Kersten B, Faivre Rampant P, Mader M, Le Paslier MC, Bounon R, Berard A, *et al.* Genome sequences of populus tremula chloroplast and mitochondrion: implications for holistic poplar breeding. *PLoS One* 2016; 11(1): e0147209.
- 15 Qiu Z, Yuan M, He Y, Li Y, Zhang L. Physiological and transcriptome analysis of He-Ne laser pretreated wheat seedlings in response to drought stress. *Sci Rep* 2017; 7(1): 6108.

- 16 何红升. 杨树全基因组WRKY基因的鉴定及表达分析. 安徽农业大学(硕士论文), 2012.
- 17 He H, Dong Q, Shao Y, Jiang H, Zhu S, Cheng B, *et al.* Genome-wide survey and characterization of the WRKY gene family in *Populus trichocarpa*. *Plant Cell Rep* 2012; 31(7): 1199-217.
- 18 Wei W, Hu Y, Han YT, Zhang K, Zhao FL, Feng JY. The WRKY transcription factors in the diploid woodland strawberry *Fragaria vesca*: identification and expression analysis under biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol Biochem* 2016; 105: 129-44.
- 19 Yao QY, Xia EH, Liu FH, Gao LZ. Genome-wide identification and comparative expression analysis reveal a rapid expansion and functional divergence of duplicated genes in the WRKY gene family of cabbage, *Brassica oleracea* var. *capitata*. *Gene* 2015; 557(1): 35-42.
- 20 Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 2010; 28(5): 511-5.
- 21 Hou L, Zhang Z, Dou S, Zhang Y, Pang X, Li Y. Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the expansin gene family in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). *Planta* 2018; 249(3): 815-29.
- 22 Xiao J, Hu R, Gu T, Han J, Qiu D, Su P, *et al.* Genome-wide identification and expression profiling of trihelix gene family under abiotic stresses in wheat. *BMC Genomics* 2019; 20(1): 287.
- 23 Zhang Z, Li X, Zhang C, Zou H, Wu Z. Isolation, structural analysis, and expression characteristics of the maize nuclear factor Y gene families. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 478(2): 752-8.
- 24 王鹏杰, 郑玉成, 林滢, 周珍, 杨江帆, 叶乃兴, 等. 茶树GRF基因家族的全基因组鉴定及表达分析. 西北植物学报(Wang Pengjie, Zheng Yucheng, Lin Yi, Zhou Zhen, Yang Jiangfan, Ye Naixing, *et al.* Geogenomic identification and expression analysis of GRF gene family of tea tree. *Acta Bot. Bor-Occid Sin*) 2019; 39(3): 413-21.
- 25 苏玲, 王鹏飞, 杨阳, 任凤山, 王咏梅, 陈万钧. 葡萄全基因组WRKY转录因子鉴定和分析. 黑龙江农业科学(Su Ling, Wang Pengfei, Yang Yang, Ren Fengshan, Wang Yongmei, Chen Wanjun. Identification and analysis of grape whole genome WRKY transcription factors. *Heilongjiang Agric Sci*) 2019; 295(1): 21-30.
- 26 王鹏杰, 陈笛, 林滢, 郑知临, 郑玉成, 杨江帆, 等. 8个茶树WRKY转录因子基因的克隆与表达分析. 中草药(Wang Pengjie, Chen Di, Lin Yi, Zheng Zhilin, Zheng Yucheng, Yang Jiangfan, *et al.* Cloning and expression analysis of WRKY transcription factor genes in 8 tea trees. *Chin Tradit Herbal Drugs*) 2019; 50(3): 685-93.