



大豆 *GmWRKY52* 生物信息学分析及与 *GmNF-YA13* 互作研究

刘 灿¹, 聂天明², 于月华², 倪志勇¹

(1. 新疆农业大学 生命科学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆农业大学 农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要: WRKY 转录因子在植物生长发育及逆境调控过程发挥着重要作用。前期通过酵母双杂交筛选干旱处理后的大豆 cDNA 文库时发现 *GmWRKY52* (NP_001237726.2) 可能与 *GmNF-YA13* 蛋白存在互作, 为明确二者是否存在互作, 本研究克隆 *GmWRKY52* 基因并进行生物信息学分析, 利用酵母双杂交系统鉴定 *GmWRKY52* 和 *GmNF-YA13* 之间的互作关系。结果显示: *GmWRKY52* 基因全长 1 163 bp, 编码 1 个由 265 个氨基酸组成的蛋白质, 多序列比对和系统发育树分析结果说明 *GmWRKY52* 基因与野生大豆 *GsWRKY69* (XP_028186817.1) 亲缘关系较近。酵母双杂交结果表明 *GmWRKY52* 和 *GmNF-YA13* 蛋白不存在相互作用。研究结果说明 *GmWRKY52* 与 *GmNF-YA13* 蛋白在酵母细胞内并不发生互作。

关键词: 大豆; *GmWRKY52*; 生物信息学分析; 酵母双杂交; *GmNF-YA13*

Bioinformatics Analysis of Soybean *GmWRKY52* and Studies of Interaction with *GmNF-YA13*

LIU Can¹, NIE Tian-ming², YU Yue-hua², NI Zhi-yong¹

(1. College of Life Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: WRKY transcription factor plays an important role in the regulation of plant growth and stress response. A WRKY protein *GmWRKY52* (NP_001237726.2), which may interact with *GmNF-YA13*, was found by screening the soybean cDNA library after drought treatment by yeast two-hybrid. For identifying any potential interactions between the two, this study cloned *GmWRKY52* and carried out bioinformatics analysis, identified the interaction between *GmWRKY52* and *GmNF-YA13* by yeast two-hybrid. The results showed that the *GmWRKY52* gene was 1 163 bp in full length and encoded a protein composed of 265 amino acids. And the multi-sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that *GmWRKY52* was closely related to wild soybean *GsWRKY69* (XP_028186817.1). Yeast two-hybrid results showed no interaction between the *GmWRKY52* and *GmNF-YA13* proteins. The results show that *GmWRKY52* and the *GmNF-YA13* protein do not interact within yeast cells.

Keywords: soybean; *GmWRKY52*; bioinformatics analysis; yeast two-hybrid; *GmNF-YA13*

WRKY 转录因子家族是植物中最大的转录因子家族之一, 因含有保守的 WRKY 结构域而得名, 广泛分布于多种植物中。WRKY 结构域包含 60 个氨基酸, 其中 N-端包含保守的氨基酸序列 WRKYGQK, C-端包含 C2H2 (CX_{4.5}CX₂₂₋₂₃HX1H) 型或 C2HC (CX₇CX₂₃HXC) 型锌指基序^[1]。1994 年 Ishiguro 等^[2]从甘薯 (*Ipomoea batatas*) 中分离获得了第一个植物 WRKY 家族基因 SWEET POTATO FACTORS1 (SPF1)。随着测序技术的发展, 近年来许多物种中的 WRKY 家族成员接连被发现和鉴定, 其中拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中 74 个^[3]、水稻 (*Oryza sativa*) 中 109 个^[4]、玉米 (*Zea mays*) 中 119 个^[5]、番茄 (*Solanum lycopersicum*) 中 81 个^[6]、谷子 (*Setaria italica*) 中 105 个^[7]、大豆 (*Glycine max*) 中

176 个^[8]、油菜 (*Brassica napus*) 中 343 个^[9]、小麦 (*Triticum aestivum*) 中 171 个^[10]和甘蔗 (*Saccharum spontaneum*) 中 154 个^[11]。WRKY 转录因子可以结合 W-box [(T)(T)TGAC(C/T)] 元件以调节下游基因表达, 也可以作为转录活化子特异性地结合糖反应元件 SURE^[12]。已知 WRKY 转录因子参与植物生长发育的各个过程, 包括促进细胞及细胞器构成^[13]、调控植株矮化^[14-15]、诱导植物开花^[16]、调控植物果实成熟^[17-18]、调控植物休眠与衰老^[19-20]等。同时, WRKY 家族成员在植物响应逆境胁迫的过程中起着关键作用, 既参与对病原菌和植食性昆虫的防御反应, 也参与对干旱、盐碱、高温、低温、营养缺失等非生物逆境胁迫的应答^[21]。可见, WRKY 转录因子在植物应对逆境胁迫中的作用不可忽视。

收稿日期: 2022-09-19

基金项目: 国家自然科学基金 (32160446); 新疆农业大学研究生创新项目 (XJAUGRI2022041)。

第一作者: 刘灿 (1998—), 男, 硕士研究生, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: liuc1998@qq.com。

通讯作者: 倪志勇 (1981—), 男, 博士, 教授, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: nizhiyong@126.com;

于月华 (1981—), 女, 博士, 高级实验师, 主要从事作物抗逆分子育种研究。E-mail: yuyuehua1213@sina.com。

虽然关于 WRKY 蛋白的功能已经有了大量的研究成果,但仍存在一些薄弱之处:第一,目前对 WRKY 转录因子参与非生物胁迫响应的研究主要集中在干旱、高盐、低温等胁迫,关于 WRKY 转录因子参与响应高温胁迫的研究相对较少;第二,大部分 WRKY 转录因子的研究尚处于基因克隆、功能鉴定和表达分析等层面上,在植物逆境应答作用机理方面的研究相对较少;第三,对 WRKY 转录因子的研究主要集中于水稻和拟南芥等模式作物,在其他植物中的研究还不够深入。因此本研究一方面为植物抗逆基因工程提供新的基因源,另一方面希望从转录因子互作蛋白鉴定的方面为探索大豆 WRKY 转录因子发挥功能的分子机制提供一定基础。

大豆是重要的粮食和经济作物,但由于我国的大豆产量远低于需求,进口大豆长期占据中国粮食进口的主导地位。放眼全球,中国的大豆进口量约占大豆贸易的 60%^[22]。各种生物与非生物胁迫影响是造成大豆产量与品质严重受损的主要原因之一,据报道,非生物胁迫会对农作物造成 6%~20% 的损失^[23-24]。研究显示,大豆中有多个 WRKY 转录因子参与调控生物胁迫与非生物胁迫的应答。Yu 等^[25]发现,在大豆根系中有 65 个 WRKY 基因在盐胁迫后表达上调,只有 1 个 WRKY 基因—*GmWRKY71* 表达下调;在整个大豆植株中,这 66 个基因在盐胁迫下表现出不同的表达模式,其中 12 个表达量没有明显变化,35 个表达下降,19 个被诱导。Shi 等^[26]发现,在正常生长的大豆组织中,*GmWRKY12* 基因的表达量较低,但在盐和干旱胁迫条件下表达量升高,进一步研究发现在大豆毛状根中 *GmWRKY12* 的过表达增强了耐旱性和耐盐性,说明 *GmWRKY12* 对干旱与盐胁迫具有正调控作用。这些结果为今后研究大豆 WRKY 基因在逆境条件下的作用机理提供了重要线索。

实验室发现大豆中的 NF-YA 基因 *GmNFYA13* 受到盐、干旱、ABA 和过氧化氢的强烈诱导,报道显示,过表达 *GmNFYA13* 增强了大豆植株的耐盐性和耐旱性^[27],以大豆 GmNF-YA13 蛋白为诱饵蛋白,通过酵母双杂交筛选干旱处理后的大豆 cDNA 文库,筛选出一个 WRKY 蛋白 GmWRKY52。本研究克隆大豆 *GmWRKY52* 基因,利用生物信息学方法分析该蛋白的理化性质、蛋白结构及其与其他物种 WRKY 蛋白间的亲缘关系,并通过酵母双杂交系统进一步验证 GmWRKY52 与 GmNF-YA13 蛋白之间是否存

在互作关系。以期在今后大豆 WRKY 蛋白作用机理的深入研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种为 Williams 82。

普通 DNA 产物纯化回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购于天根生物公司。高保真酶购自全式金生物公司,T₄DNA 连接酶和限制性内切酶(*EcoR* I, *Xho* I) 购自 Thermofisher 生物公司。引物合成与 DNA 测序服务由生工生物公司(上海)完成。

AH109 酵母菌株、pGBKT7、pGADT7 酵母表达载体及 pGBKT7-NFYA13 诱饵载体为本实验室保存;各种酵母培养基均购自泛基诺公司。

1.2 方法

1.2.1 大豆总 RNA 提取与反转录 采用 Trizol 法^[28]提取大豆叶片总 RNA,使用赛默飞世尔超微量核酸蛋白浓度测定仪 NanoDrop ONCE 分析总 RNA 浓度和纯度,进一步采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量,选择满足后续实验需求的 RNA。按照天根生物公司反转录试剂盒说明书的具体操作步骤将提取的 RNA 反转录合成 cDNA 第一链,将所得产物存于 -20℃ 冰箱以备用。

1.2.2 WRKY52 基因克隆 根据 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 *GmWRKY52* (登录号:NM_001250797.2) 序列,使用 Primer 5.0 软件设计特异性引物:WRKY52-AD-F (5'-CCGGAATTCATGCATCACCGTAGATTTCAGC-3',下划线表示 *EcoR* I 识别位点);WRKY52-AD-R (5'-CCGCTCGAGTTATCCTGTGATGCCGCC-3',下划线表示 *Xho* I 识别位点)。以大豆叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为 10 × Buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μL、2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs 2.0 μL、上下游引物各 2.0 μL、cDNA 模板 1.0 μL、*Taq* 酶 0.5 μL、最后加入超纯水至总体积为 25 μL。PCR 反应条件为:98℃ 5 min;98℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 1 min,循环 35 次;72℃ 10 min。使用天根公司的产物纯化回收试剂盒纯化回收 PCR 扩增产物,送至生工生物公司(上海)进行测序。

1.2.3 生物信息学分析 利用在线网站及软件对 *GmWRKY52* 进行生物信息学分析,具体方法参考万会娜等^[24]。采用 NCBI 网站的在线工具 BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行相

似序列搜索,利用 DNAMAN8.0 进行多序列比对,并利用 clustalx 和 MEGA5 建立系统进化树。

1.2.4 酵母双杂交 使用 *EcoR* I 和 *Xho* I 将目的基因片段和 pGADT7 载体酶切,使用 T_4 连接酶切片段,得到重组载体 pGADT7-WRKY52(prey 载体)。

将 pGADT7-WRKY52 载体与 pGBKT7-NFYA13 (bait 载体) 共转化 AH109 酵母菌株,并分别在 SD-Leu-Trp、SD-Leu-Trp-His 和 SD-Leu-Trp-His-Ade 培养基上培养。分别以 pGADT7-WRKY52 和 pGBKT7、pGBKT7-NFYA13 和 pGADT7、pGADT7 和 pGBKT7 共转化的 AH109 酵母菌株作为阴性对照,观察酵母共转化子在不同缺陷型培养基上的生长情况,分析 *GmWRKY52* 和 *GmNFYA13* 蛋白的互作情况。

2 结果与分析

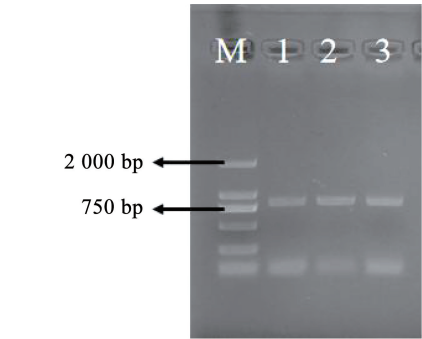
2.1 *GmWRKY52* 基因克隆

以大豆叶片 cDNA 为模板进行特异性扩增,电泳检测得到 1 条略大于 750 bp 的条带(图 1),测序结果表明:该片段与 Williams 82 的 *GmWRKY52* 基因序列的相似度为 99.9%,包含一段长度为 795 bp 的 ORF 序列,编码 265 个氨基酸的蛋白序列。

2.2 *GmWRKY52* 基因生物信息学分析

生物信息学预测结果显示:*GmWRKY52* 蛋白包含 1 个 WRKY 结构域(图 2),具有 WRKY 转录因子的显著特征,是大豆 WRKY 转录因子家族成员;*GmWRKY52* 蛋白由 20 种氨基酸组成,其中丝氨酸(Ser)占比最高,达到了 12.5%,谷氨酸(Gln)占比最少,仅为 0.8%;蛋白质等电点为 5.89,分子量为 28.73 kD,带正电荷的氨基酸残基(Arg + Lys)总数

为 32,带负电荷的氨基酸残基(Asp + Glu)总数为 39,蛋白偏酸性;不稳定指数(instability index)为 57.98,属于不稳定蛋白;蛋白 N 端为亲水端,C 端为疏水端,总平均疏水性为 -0.697,是亲水蛋白(图 3);*GmWRKY52* 蛋白不含信号肽,无跨膜区域。二级结构预测结果显示,*GmWRKY52* 蛋白包含 6 个 α -螺旋,2 个 β -折叠(图 4)。蛋白三维结构同源模拟的结果如图 5 所示。



注:M. 2 kb DNA Marker;1~3. 目的条带。
Note: M. 2 kb DNA Marker; 1-3. Target band.

图 1 *GmWRKY52* 基因片段琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *GmWRKY52* gene sequence

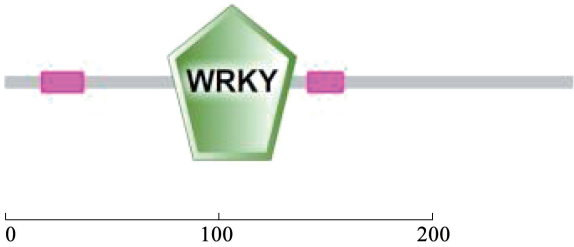


图 2 *GmWRKY52* 蛋白功能结构域分析

Fig. 2 Functional domain analysis of *GmWRKY52* protein

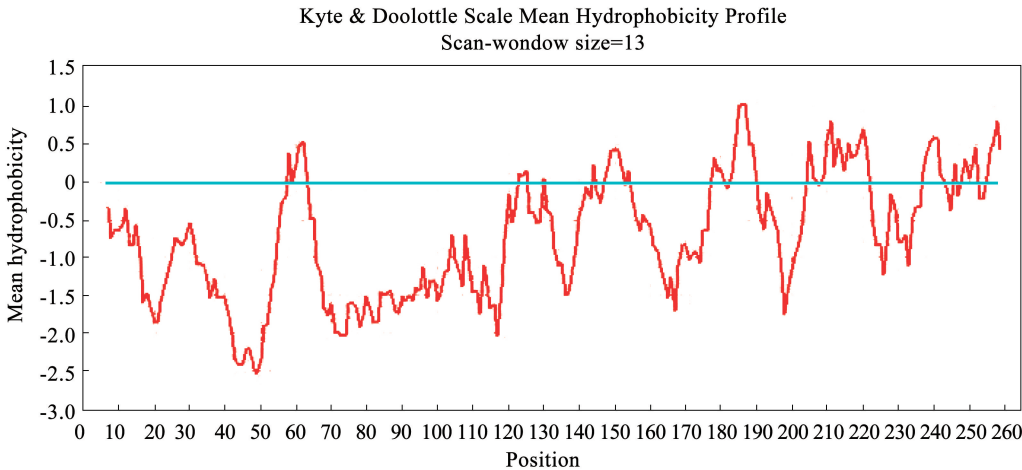


图 3 *GmWRKY52* 蛋白疏水性分布

Fig. 3 Hydrophobic distribution of *GmWRKY52* protein

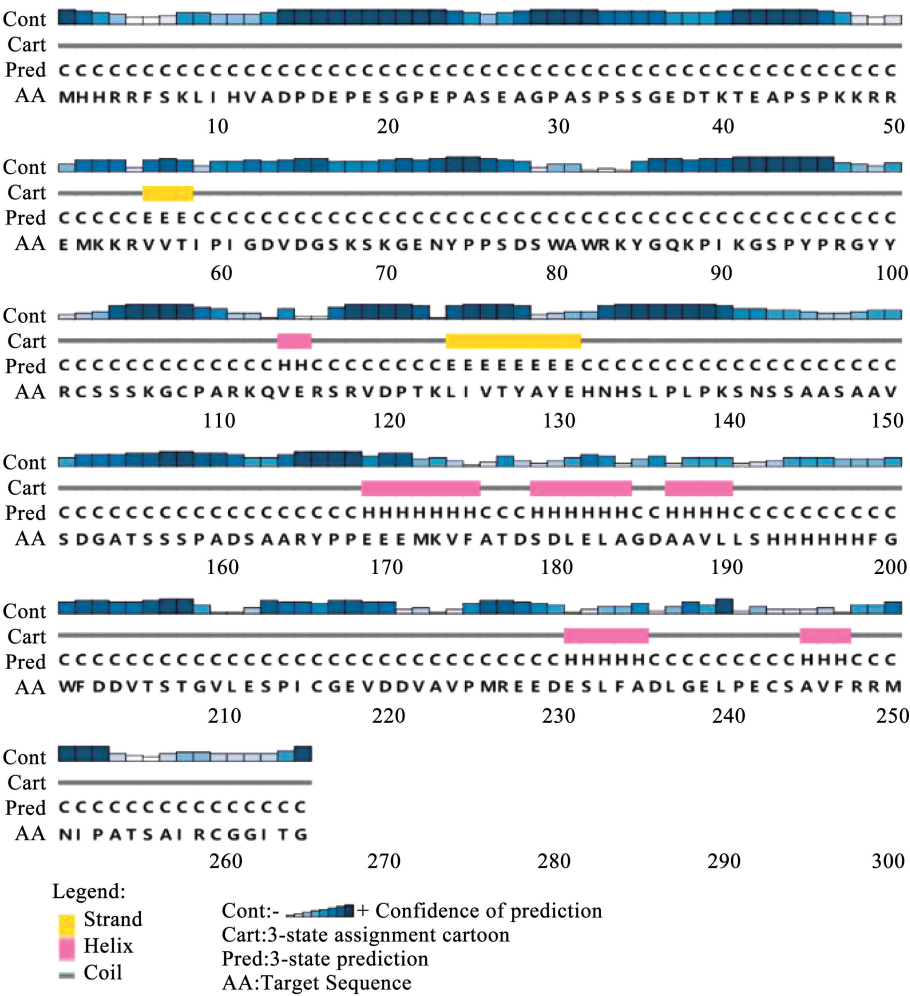


图 4 GmWRKY52 二级结构预测
Fig.4 Secondary structure prediction of GmWRKY52



图 5 GmWRKY52 三级结构预测
Fig.5 Tertiary structure prediction of GmWRKY52

2.3 同源性比较与系统发育树分析

经 BLAST 比对搜索,大豆 *GmWRKY52* 基因编码的蛋白与野大豆 WRKY 蛋白 (XP_028186817.1) 的相似性为 99.62%,与天鹅绒豆 WRKY 蛋白 (RDX74181.1) 的相似性为 83.02%,与芸豆 PHAVU 蛋白 (XP_007149724.1) 的相似性为 76.23%,与绿豆 WRKY 蛋白 (XP_014522007.1) 的相似性为 83.02%,

与拟南芥 WRKY 蛋白 (NP_567073.2) 的相似性为 50.00%。多序列比对结果显示,在 N 端具有很高的保守性,并且都包含 WRKY 结构域(图 6)。进而选取野生大豆、绿豆和芸豆等植物的 WRKY 蛋白序列构建系统进化树。系统进化树显示,*GmWRKY52* 与野生大豆 WRKY 转录因子亲缘关系最近,与拟南芥 WRKY 转录因子的亲缘关系较远(图 7)。

栽培大豆NP 001237726.2	MHRRRFSKLIHVADP EP SGPEPASEAG A GE T TEA S EMK TI G D SK N	75
野生大豆XP 028186817.1	MHRRRFSKLIHVADP EP SGPEPASEAG A GE T TEA S EMK TI G D SK N	75
天鹅绒豆EDX74181.1	MHRRRFNKPIYVADP EP ..PEPASEAG A GE T AEA S EMK TI G D GK A	73
芸豆XP 007149724.1	MYHRRFNKPIHVANP EP PEP..TSEAG A CD T AEA S EMK TV G D SK T	73
绿豆XP 014522007.1	MYHRRFNKPIQVANP EP PEPEPTSEPG A CD T TEA S EIK TI G D SK T	75
拟南芥NP 567073.2MHRRAAIQES DE ..DETYNDVV E CE S ISK T NVE SV A E SR V	68
Consensus	d e p spss d k p pkrr krvv pi dv gsk ge yp	
栽培大豆NP 001237726.2	T IV YE SL LPKS SSAASAAV	150
野生大豆XP 028186817.1	T IV YE SL LPKS SSAASAAV	150
天鹅绒豆EDX74181.1	T IV YE SL LAKS SAAAPAAV	148
芸豆XP 007149724.1	T IV ND SI LPKS SFAVSAAS	148
绿豆XP 014522007.1	T IV ND SV LPKS SSAVSAAA	150
拟南芥NP 567073.2	S MI CD PF SSSA TKSHRRSS	143
Consensus	psdswawrkygqkpgikgspypgrgyrcssskgcparkqversrvdp kl tya hnh p n	
栽培大豆NP 001237726.2	SDGATSSSPADSAARYPP E.MK FATDS...DLE AG. AAV SHHH...HHH G D VTSTGVLESP..IC	216
野生大豆XP 028186817.1	SDGATSSSPADSAARYPP E.MK FATDS...DLE AG. AAV SHHH...HHH G D VTSTGVLESP..IC	216
天鹅绒豆EDX74181.1	GDGAAS.TPPEPAARFPP ...MT FATHS...DLE AG. SAV S..H...HHH G D VASTGVLESP..IC	210
芸豆XP 007149724.1SPPEASARFPP E.MV FATHT...DFE AG. AAV S....HHH R D VASTGVLEIP..IC	204
绿豆XP 014522007.1SPAESAARFPP E.MA FSTHS...DFE AG. AAV S.....QYH R D VASTGVLESP..IC	206
拟南芥NP 567073.2VVLKTAKKEEYEE EELT TAAEEPPAGLD SHV SPL GGCYSEIGE G Y ASISSSSGSSNFLD	214
Consensus	ee v l d ll f wf d	
栽培大豆NP 001237726.2	GEVDDVAVPMR S A GE E SA MNIPATSAI CGGITG.....	265
野生大豆XP 028186817.1	GEVDDVAVPMR S A GE E SA LNIPATSAI CGGITG.....	265
天鹅绒豆EDX74181.1	GEVDDVAMTMR S A GE E SA RNIPRASAI CGGITG.....	259
芸豆XP 007149724.1	GEVDDVAMPMR L A DE E SV RNIPRSSAI CGGITG.....	253
绿豆XP 014522007.1	GEVDDVAMPMR S A DE E SV GNIPRSSAI CGGITG.....	255
拟南芥NP 567073.2	VTLGRGFSVGQ S G GD D AS GTVATEEQH RCDFGAIPFCDSS	270
Consensus	ee de lf dl lp c vfrr r	

图 6 GmWRKY52 与其他植物 WRKY 蛋白的多序列比对

Fig. 6 Multiple sequence alignment of GmWRKY52 with other plant WRKY proteins

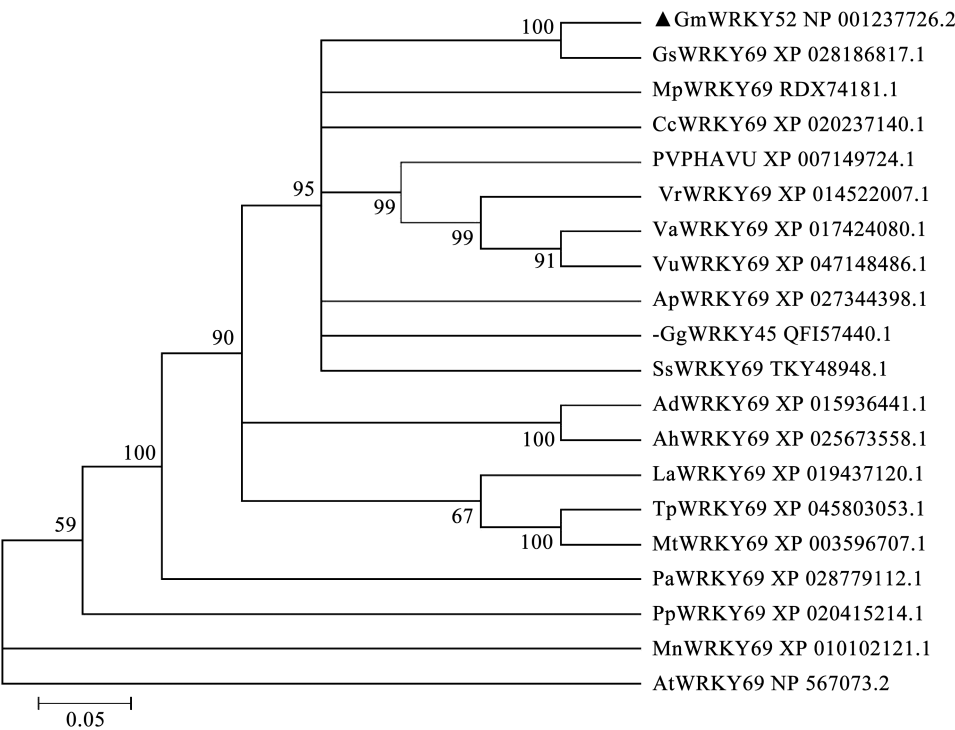
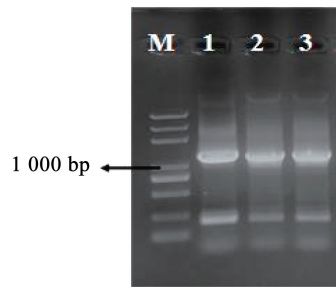


图 7 GmWRKY52 系统进化树分析

Fig. 7 Phylogenetic tree analysis of GmWRKY52

2.3 酵母双杂交

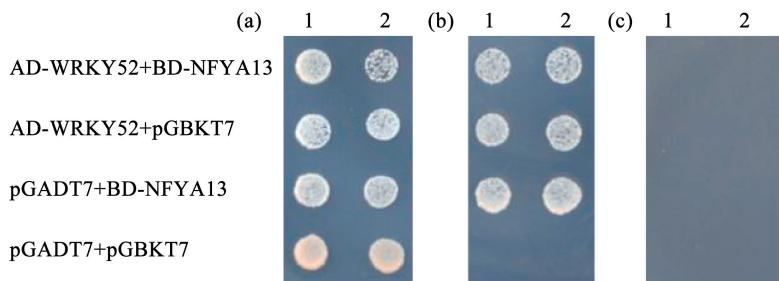
经电泳检测, *GmWRKY52* 基因重组 prey 载体 pGADT7-WRKY52 构建成功(图 8)。酵母双杂交结果显示, 共转化 pGADT7-WRKY52 和 pGBKT7-NFYA13、pGADT7-WRKY52 和 pGBKT7、pGADT7 和 pGBKT7-NFYA13 的酵母细胞在 SD-Leu-Trp 以及 SD-Leu-Trp-His 培养基上均能正常生长, 而在 SD-Leu-Trp-His-Ade 培养基上无法生长。共转化 pGADT7 和 pGBKT7 的 AH109 酵母细胞只能在 SD-Leu-Trp 培养基上生长, 在 SD-Leu-Trp-His 培养基与 SD-Leu-Trp-His-Ade 培养基上均无法生长(图 9), 由此推断 *GmWRKY52* 与 *GmNF-YA13* 之间并不存在互作关系。



注: M. DL2000 Plus DNA Marker; 1 ~ 3. pGADT7-WRKY52 质粒 PCR 产物。

Note: M. DL2000 Plus DNA Marker; 1-3. pGADT7-WRKY52 plasmid PCR products.

图 8 pGADT7-WRKY52 载体琼脂糖凝胶电泳
Fig.8 Agarose gel electrophoresis of pGADT7-WRKY52 vector



注: (a): SD-Leu-Trp 培养基; (b): SD-Leu-Trp-His 培养基; (c): SD-Leu-Trp-His-Ade 培养基。

Note: (a): SD-Leu-Trp medium; (b): SD-Leu-Trp-His medium; (c): SD-Leu-Trp-His-Ade medium.

图 9 酵母双杂交结果
Fig.9 Results of yeast two-hybrid

3 讨论

WRKY 转录因子是植物中特有的一类转录因子, 结构是高度保守的, 均包含 1 个或两个 WRKY 结构域^[29]。WRKY 转录因子按结构域的数量和锌指的类型分为 I、II 和 III 类, 其中 I、III 类包含两个 WRKY 结构域, II 类仅含有 1 个 WRKY 结构域^[30], 因此大豆 *GmWRKY52* 属于 II 类 WRKY 蛋白。尽管 WRKY 基因家族的大多数成员结构域都是完全保守的, 然而, 近年来发现一些 WRKY 家族的成员, 其 WRKY 结构域 N 端保守性氨基酸残基出现了缺失、替换, 其 C 端锌指结构也存在这种现象^[31]。

WRKY 转录因子不仅能在转录水平与其他基因启动子区的 W-box 结合调控靶基因的转录, 还能在蛋白质水平通过与不同蛋白间的相互作用实现其在不同信号转导途径中的功能^[32]。Han 等^[33]发现 MPK3/MPK6 诱导 *GLI1* (GDSL-like 基序脂肪酶) 基因的表达可以增强拟南芥对灰葡萄孢菌的抗性, 而 *AtWRKY33* 与 MPK3/MPK6 的结合是 MPK3/MPK6 诱导 *GLI1* 所必需的。Uji 等^[34]发现 *OsWRKY45* 在水稻抵御白叶枯病原菌的过程中起正调控作用, 而 *OsVQ13* 与 *OsWRKY45* 互作可以激

活水稻 *OsMPK6-OsWRKY45* 信号通路。本研究通过酵母双杂交实验初步确定大豆 *GmWRKY52* 与 *GmNF-YA13* 之间不存在互作关系, 但由于酵母双杂交系统假阳性概率较高, 因此还需要采用双分子荧光互补、pull-down 等方法确认二者之间的互作关系。

4 结论

本研究从大豆中克隆了 *GmWRKY52* 基因, 利用生物信息学分析软件分析了该基因编码蛋白的同源性和结构域, 发现该基因编码的蛋白具有 1 个保守的 WRKY 结构域, 属于 II 类 WRKY 蛋白。酵母双杂交结果表明 *GmWRKY52* 与 *GmNF-YA13* 蛋白之间并没有互作关系, 为进一步研究大豆 WRKY 基因家族的功能奠定了基础。

参考文献

[1] RUSHTON P J, SOMSSICH I E, RINGLER P, et al. WRKY transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(5): 247-258.
[2] 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 β -amylase from sweet potato[J]. Molecular General Genetics, 1994, 244(6): 563-571.
- [3] ULKER B, SOMSSICH I E. WRKY transcription factors: From DNA binding towards biological function[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7(5): 491-498.
- [4] ROSS C A, LIU Y, SHEN Q X J, et al. The WRKY Gene Family in rice (*Oryza sativa*) [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2007, 49(6): 827-842.
- [5] 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 Research, 2012, 19(2): 153-164.
- [6] HUANG S, GAO Y, LIU J, et al. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum* [J]. Molecular Genetics Genomics, 2012, 287(6): 495-513.
- [7] MEHANATHAN M, BONTHALA V S, ROHIT K, et al. Global analysis of WRKY transcription factor superfamily in *Setaria* identifies potential candidates involved in abiotic stress signaling [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 910.
- [8] SONG H, WANG P, HOU L, et al. Global analysis of WRKY genes and their response to dehydration and salt stress in soybean [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 9.
- [9] HE Y, MAO S, GAO Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis of WRKY transcription factors under multiple stresses in *Brassica napus* [J]. PLoS One, 2017, 11(6): 0157558.
- [10] NING P, LIU C, KANG J, et al. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in wheat (*Triticum aestivum* L.) and differential expression under water deficit condition[J]. PeerJ, 2017, 5: 3232.
- [11] ZHEN L, XIUTING H, WEIMING Z, et al. Genome-wide identification and expression profile analysis of WRKY family genes in the autopolyploid *Saccharum spontaneum* [J]. Plant and Cell Physiology, 2020, 61(3): 616-630.
- [12] SUN C, PALMQVIST S, 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 *isol* promoter[J]. The Plant Cell Online, 2003, 15(9): 2076-2092.
- [13] 张高原, 魏兵强. 甜瓜 WRKY 基因家族鉴定及其响应低温胁迫的表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(10): 15. (ZHANG G Y, WEI B Q. Identification and expression analysis of melon WRKY gene family in response to low temperature stress [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(10): 15.)
- [14] 蔡毓晖. 水稻 *OsWRKY11* 和 *OsRBS1* 的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015. (CAI Y H. Research on *OsWRKY11* and *OsRBS1* in rice[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.)
- [15] ZHENG X D, ZHAO Y, SHAN D Q. *MdWRKY9* overexpression confers intensive dwarfing in the M26 rootstock of apple by directly inhibiting brassinosteroid synthetase *MdDWF4* expression[J]. The New Phytologist, 2018, 217(3): 1086-1098.
- [16] 董悦, 王远达, 王志敏, 等. *WRKY12* 调控植物发育的分子机制[J]. 生物工程学报, 2021, 37(1): 7. (DONG Y, WANG Y D, WANG Z M, et al. Molecular mechanism of *WRKY12* regulating plant development [J]. Chinese Journal of Biological Engineering, 2021, 37(1): 7.)
- [17] 孙一平. 草莓 *FvWRKY71* 基因的克隆与功能分析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018. (SUN Y P. Cloning and functional analysis of strawberry *FvWRKY71* gene[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018.)
- [18] 刘越. 西瓜 WRKY 家族基因分析及低温响应 WRKY 基因功能鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018. (LIU Y. Gene analysis of watermelon WRKY family and functional identification of WRKY gene in response to low temperature [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018.)
- [19] 王庆杰, 张泽杰, 高彦刚, 等. 桃转录因子 *PpWRKY11* 的克隆及表达分析[J]. 植物生理学报, 2019, 55(4): 503-510. (WANG Q J, ZHANG Z J, GAO Y G, et al. Cloning and expression analysis of peach transcription factor *PpWRKY11* [J]. Chinese Journal of Plant Physiology, 2019, 55(4): 503-510.)
- [20] 安静. 樱桃番茄采后衰老过程的代谢组和转录组研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2016. (AN J. Metabolome and transcriptome of postharvest senescence in cherry tomato [D]. Chongqing: Chongqing University, 2016.)
- [21] 张桐, 李智强, 伍国强. WRKY 转录因子在植物逆境响应中的作用[J]. 生物技术通报, 2021, 37(10): 203-215. (ZHANG T, LI Z Q, WU G Q. The role of WRKY transcription factors in plant stress response [J]. Bulletin of Biotechnology, 2021, 37(10): 203-215.)
- [22] 邵海鹏. 今年国内粮食丰收已成定局 为何玉米等谷物进口量却翻倍[N]. 第一财经日报, 2021-11-15. (SHAO H P. This year's domestic grain harvest is a foregone conclusion, why the import of corn and other grains has doubled [N]. First Financial Daily, 2021-11-15.)
- [23] 李金娜, 李海英. 糖料作物抗氧化酶基因应答非生物胁迫的研究进展[J]. 中国糖料, 2021, 43(4): 42-47. (LI J N, LI H Y. Research progress of antioxidant enzyme genes in sugar crops in response to abiotic stress [J]. China Sugar, 2021, 43(4): 42-47.)
- [24] 万会娜, 于月华, 王怡, 等. 大豆 *GmNAC131* 基因的生物信息学及表达分析[J]. 大豆科学, 2021, 40(2): 186-194. (WAN H N, YU Y H, WANG Y, et al. Bioinformatics and expression analysis of soybean *GmNAC131* gene[J]. Soybean Science, 2021, 40(2): 186-194.)
- [25] YU Y, WANG N, HU R, et al. Genome-wide identification of soybean WRKY transcription factors in response to salt stress[J]. SpringerPlus, 2016, 5(1): 131-137.
- [26] SHI W Y, DU Y T, MA J, et al. The WRKY transcription factor GmWRKY12 confers drought and salt tolerance in soybean[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(12): 4087.
- [27] MA X J, FU J D, Tang Y M, et al. *GmNFYA13* improves salt and drought tolerance in transgenic soybean plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 587244.
- [28] 倪志勇. 大豆抗逆相关 *miR169c* 及其靶位点 *GmNFYA3* 和 *miR394a* 的功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013. (NI Z Y. Functional study of soybean stress resistance-related *miR169c* and its target sites *GmNFYA3* and *miR394a* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.)
- [29] 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 Biotechnology Journal, 2008, 6(5): 486-503.
- [30] ZHAO M, ZHANG Z, CHEN S, et al. WRKY transcription factor superfamily: Structure, origin and functions [J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11(32): 538-549.
- [31] 谷彦冰, 冀志蕊, 迟福梅, 等. 桃 WRKY 基因家族全基因组鉴定和表达分析[J]. 遗传, 2016, 38(3): 17. (GU Y B, JI Z R, CHI F M, et al. Genome-wide identification and expression analysis of peach WRKY gene family [J]. Hereditary, 2016, 38(3): 17.)
- [32] 任永娟, 王东姣, 苏亚春, 等. 植物 WRKY 转录因子: 结构、分类、进化和功能 [J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(1): 105-124. (REN Y J, WANG D J, SU Y C, et al. Plant WRKY transcription factors: Structure, taxonomy, evolution and function [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2021, 29(1): 105-124.)
- [33] HAN X, LI S, ZHANG M, et al. Regulation of GDSL lipase gene expression by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor(s) in *Arabidopsis* immunity [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2018, 32(6): 673-684.
- [34] UJI Y, KASHIHARA K, KIYAMA H, et al. Jasmonic acid-induced VQ-motif-containing protein OsVQ13 influences the *OsWRKY45* signaling pathway and grain size by associating with OsMPK6 in rice [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(12): 2917.