

## 大豆基因组 *WRKY31* 同源基因的生物信息学分析

孙 晶, 盛碧涵, 韩英鹏, 赵 雪, 王 强, 孟宪新, 魏淑红, 李文滨

(东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室, 东北农业大学农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** *WRKY* 转录因子是一类参与多种生物和非生物胁迫的诱导性转录调控因子, 在植物进化上高度保守。通过克隆大豆 *WRKY31* 基因全长和生物信息学分析, 发现 *WRKY31* 在大豆基因组中存在 3 个同源基因, 分别位于第 6、12 和 13 号染色体上; *WRKY31* 蛋白含有 1 个 *WRKY* 结构域 (343 ~ 419 aa) 和 C2H2 型锌指结构, 属于第二类 *WRKY* 基因。RT-PCR 分析表明, *GmWRKY31* 在大豆的叶、花、豆荚、根、根瘤中的组织内均有表达, 且在花中表达量最高, 豆荚中最低。通过 MEGA 5.0 软件分析, 大豆和芸豆 *WRKY* 蛋白亲缘关系更近, 位于同一分支上, 而它的 2 个拷贝 *Glyma06g46420.2* 和 *Glyma12g10350.1* 位于另一个分支上, 亲缘关系较近。蛋白结构及功能预测表明 *WRKY31* 是一类转录因子, 参与胁迫反应; 系统进化分析表明其基因在进化过程中功能上发生了重大分化。

**关键词:** 大豆; *WRKY31*; 胁迫; *WRKY* 结构域; 系统进化

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.05.0642

## Bioinformatics Analysis of *WRKY31* Homologs in Soybean Genome

SUN Jing, SHENG Bi-han, HAN Ying-peng, ZHAO Xue, WANG Qiang, MENG Xian-xin, WEI Shu-hong, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding/Genetics of Chinese Agriculture Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** The gene family of *WRKY* is transcription factor that can be induced and involved in the response to biotic and abiotic stresses, and is conserved evolutionarily. In this research, the full-length cDNA of *GmWRKY31* was cloned and bioinformatics analysis was used to predict the potential function of *GmWRKY31*. Phylogenetic analysis of *GmWRKY31* and its homologs with different plant species were conducted by the software MEGA 5.0. The results showed that three copies of *WRKY31* existed in the soybean genome, located on the chromosome 6, 12 and 13. *GmWRKY31* belongs to the type II *WRKY* transcription factors, with a *WRKY* domain and a C2H2-type zinc finger. Real-time RT-PCR analysis showed that *GmWRKY31* was expressed in soybean leaf, flower, pod, root, nodule, and the flower had the highest expression, the lowest expression was in the pod. The result of the phylogenetic tree indicated that *WRKY31* from *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* were the nearest in genetic relationship. While *Glyma06g46420.2* and *Glyma12g10350.1* (the other two copies of *WRKY31* of *Glycine max*) had closer relationship. The result of protein structure and function prediction showed that *GmWRKY31* was a transcription factor being involved in the stress response of plant, however, the phylogenetic tree indicated that significant difference of the *WRKY* genes happened in evolution of soybean.

**Key words:** Soybean; *WRKY31*; Stress; *WRKY* domain; Phylogenetic

转录因子编码是一种直接或间接作用于基因启动子区域的蛋白, 它能够通过与各类顺式元件结合, 激活或抑制下游靶基因的转录, 从而使生物体对外界生物或非生物胁迫作出反应<sup>[1]</sup>。自 1994 年 *WRKY* 基因首次由 Ishiguro 和 Nakamura 从甜薯中克隆以来<sup>[2]</sup>, 每年都有大量 *WRKY* 基因被克隆出来。并且随着各模式植物全基因组测序的完成, 根据 *WRKY* 基因在进化上的保守型, 越来越多的 *WRKY* 基因被发现, 其中在大豆、水稻和拟南芥中发现较

多, 分别有 197, 100 和 74 个<sup>[3-5]</sup>。近期研究发现, 不仅在植物中, 在原核生物和真菌的基因组中也存在 *WRKY* 基因, 说明 *WRKY* 基因广泛存在于生物体内<sup>[6]</sup>。结构分析表明 *WRKY* 家族基因的蛋白都具有 1 个由 60 个氨基酸组成的结构域, 其中 N 端的 7 个氨基酸残基 WRKYGQK 是绝对保守的, 是 *WRKY* 家族的标志, 在 C 端有 1 个锌指结构。最近研究发现, 个别蛋白质的 *WRKY* 结构域氨基酸序列为 WRKYGKK<sup>[7-8]</sup>。根据氨基酸序列分析, 可以把

收稿日期: 2014-02-30

**基金项目:** 国家“十二五”科技支撑计划 (2011BAD35B06-1); 现代农业产业技术体系 (CARS-04-PS04); 国家重点基础研究发展计划“973 计划”前期项目 (2012CB126311); 国家自然科学基金 (31201227, 31301339); 中国博士后项目 (20110491024); 黑龙江省博士后项目 (LBH1220, LBH-TZ1210); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12541049); 黑龙江省教育厅骨干教师项目 (1252G014); 黑龙江省教育厅新世纪项目优秀人才资助项目 (1253-NCET-005); 教育部博士点项目 (20122325120012); 东北农业大学博士后启动基金项目 (2012RCB11); 大豆生物学教育部重点实验室开放基金项目 (SB12A05)。

**第一作者简介:** 孙晶 (1990-), 女, 硕士, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: sj6238434@163.com。

**通讯作者:** 李文滨 (1958-), 男, 教授, 博导, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

*WRKY* 家族分为三类:第一类含有 2 个 *WRKY* 结构域;第二类只含有 1 个 *WRKY* 结构域,C 端锌指结构类型为 C2H2 型;第三类也仅含有 1 个 *WRKY* 结构域,其锌指结构为 C2-HC 型<sup>[9]</sup>。除了含有 *WRKY* 家族特有的 *WRKY* 结构域和锌指结构外,*WRKY* 蛋白还具有转录因子具有的核定位序列和寡聚化位点,同时能够和具有 TGAC 核心保守序列的 W 盒特异性结合<sup>[10]</sup>,从而调节位于启动子区域内,且含有 W 盒元件的抗病、损伤、衰老等相关基因以及水杨酸诱导基因的表达,由此看出,*WRKY* 转录因子在生物与非生物胁迫中起着至关重要的作用<sup>[11]</sup>。

大豆是重要的粮食作物,也是植物油和植物蛋白的主要来源。大豆在生长发育过程中易受多种生物及非生物因素的胁迫,严重影响大豆产量及品质<sup>[12]</sup>。*WRKY* 基因家族不仅能够对植食性昆虫的取食和病原菌的侵染等生物胁迫做出反应,而且还能对冻害、干旱和盐害等非生物胁迫做出反应。此外,*WRKY* 基因家族还参与调控如植物衰老等一些新陈代谢过程<sup>[13-14]</sup>。研究报道,*WRKY* 基因家族成员 *WRKY31* 可能参与大豆花叶病毒病的抗性反应,本研究通过克隆 *GmWRKY31* 基因,并对其进行生物信息学分析,研究其核苷酸组成、蛋白结构;利用 RT-PCR 技术,分析该基因在大豆不同器官中的表达特性;通过亚细胞定位预测和构建系统进化树,分析其作用区域和各物种间进化关系;通过 GO 分析预测其基本功能和参与途径,旨在为基因功能分析和抗病育种利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

基因供体材料为花叶病毒病 N1 株系免疫品系东农 93-046,由本实验室提供。PGM-T 载体、RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒、RT-PCR 试剂盒 SYBR<sup>®</sup> ExScript<sup>™</sup> RT-PCR Kit 以及肠杆菌感受态 Top10 购自天根公司。胶回收试剂盒购自广州飞扬生物工程有限公司。引物合成及测序均由上海生工生物工程公司完成。

### 1.2 方法

1.2.1 基因克隆 在 Phytozome 网站下载 *WRKY31* 的全长序列。*WRKY31* 基因全长 2 998 bp,其中 CDS 区域全长 1 845 bp,编码 614 个氨基酸。根据 *WRKY31* 基因的 CDS 序列设计全长引物,WRKY-F: ATGGCAAGAGGGGGTGGACT; WRKY-R: TTATTT-GTTGTTGCTTGATGTAATATTGC。

使用 Trizol 法提取植物总 RNA,利用 cDNA 第一条链合成试剂盒合成 cDNA。以 cDNA 为模板,

PCR 反应体系为:HIFI DNA 聚合酶 0.3  $\mu$ L,10  $\times$  HF Buff 2.5  $\mu$ L,10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTPs 0.4  $\mu$ L,10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的基因特异性引物 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu$ L 体系。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 7 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果,利用胶回收试剂盒纯化回收目的条带。将回收的目的片段与 pGM-T Vector 连接,转化大肠杆菌感受态 Top10,PCR 鉴定的阳性克隆进行测序。

### 1.2.2 实时定量 PCR 分析 *WRKY31* 的表达特性

利用实时定量 PCR 研究 *WRKY31* 在大豆品系东农 93-046 的叶、花、豆荚、根、根瘤中的表达特性。根据基因 *WRKY31* 的 cDNA 序列设计定量引物,WRKY31-F: GTGTCAATGGCGAAAGTATGG; WRKY31-R: GCCGAGGAAGTGTTTGTG。内参使用大豆 *GmACTIN* (AF049106) 基因, *GmACTIN*-F: GTGT-CAGCCATACTGTCCCCATTT; *GmACTIN*-R: GTTTC-AAGCTCTTGCTCGTAATCA。

以东农 93-046 的 cDNA 第一条链为模板进行荧光定量 PCR。荧光定量 Real-time 体系包括 1  $\mu$ L cDNA,10  $\mu$ L 2  $\times$  SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> r,1  $\mu$ L WRKY31-F/R,ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu$ L。PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 20 s;95 $^{\circ}$ C 8 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C,38 个循环。PCR 反应后温度从 60 $^{\circ}$ C 上升到 95 $^{\circ}$ C 绘制融解曲线。数据分析采用 Opticon Monitor 3.1 进行,计算 *WRKY31* 在不同组织器官的表达量。

1.2.3 生物信息学分析 采用 ProtParam 数据库 (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 分析氨基酸序列的多个物理和化学参数(分子量、等电点、吸光系数等)。采用 PredictProtein 数据库 (<https://www.predictprotein.org/>) 对 *WRKY31* 蛋白进行二级结构预测。使用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 在线软件预测蛋白质三级结构。利用 DNAMAN 软件,对 *WRKY31* 及其同源基因 *Glyma06g46420.2* 和 *Glyma12g10350.1* 氨基酸进行比对。利用 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Phytozome 数据库 (<http://www.phytozome.net/>) 进行同源基因的搜索,搜索到的序列利用 MEGA 5.0 构建系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 *WRKY31* 基因的克隆

将测序得到的结果与大豆基因组数据库 (<http://www.phytozome.net/>) 进行序列比对,比对结果显示与大豆 Williams 82 *Glyma13g38630.1* 序列完全一致,位于 Gm13 上(图 1)。

<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	MARGGGSLSDSPFGSFLFHEPIVLNSFPEDKNKNNNSRQ	40
Consensus	MARGGGSLSDSPFGSFLFHEPIVLNSFPEDKNKNNNSRQ	40
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	QHKWKLGNMDATVSRKSSPSSSTNTITTFQDHLISDD	80
Consensus	QHKWKLGNMDATVSRKSSPSSSTNTITTFQDHLISDD	80
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	KMPHLDENMFNNKSNKDDDDCNLLASASTSAPPSLDHLH	120
Consensus	KMPHLDENMFNNKSNKDDDDCNLLASASTSAPPSLDHLH	120
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	HTHCHSSAILGLKVTGLNLLTTNASSDQSMVDDDISPN	160
Consensus	HTHCHSSAILGLKVTGLNLLTTNASSDQSMVDDDISPN	160
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	SGDKRAKSEMVLQVELERMKVENHRLKNMLDQVNNYNA	200
Consensus	SGDKRAKSEMVLQVELERMKVENHRLKNMLDQVNNYNA	200
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	LQTHLVSLMKDQMDKEDDQKQFQVFDGKLEEKQAGNGGG	240
Consensus	LQTHLVSLMKDQMDKEDDQKQFQVFDGKLEEKQAGNGGG	240
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	ALVERQFMDGLATNADTNETSHSHSSSVIRSQDSPFTNN	280
Consensus	ALVERQFMDGLATNADTNETSHSHSSSVIRSQDSPFTNN	280
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	TEVASKKNGGASDEGLVFDQCKKEFGRIEREDSPSQGV	320
Consensus	TEVASKKNGGASDEGLVFDQCKKEFGRIEREDSPSQGV	320
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	AANNVVKFSFPRNVQAEATMRKARVSVRARSEAFMTD	360
Consensus	AANNVVKFSFPRNVQAEATMRKARVSVRARSEAFMTD	360
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	GCQWRKYQKMAKGNFCFRAYYRCTMAAGCPVRKQVQRCA	400
Consensus	GCQWRKYQKMAKGNFCFRAYYRCTMAAGCPVRKQVQRCA	400
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	EDRTILITTYEGNHNHPLPFAAMAMAQTSSAARMLLSGS	440
Consensus	EDRTILITTYEGNHNHPLPFAAMAMAQTSSAARMLLSGS	440
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	MSSADGLMNASFLTRTLIFCSSSMATISASAPFTVTLDL	480
Consensus	MSSADGLMNASFLTRTLIFCSSSMATISASAPFTVTLDL	480
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	TQSPNPLQFQKQPSQFQIFFGVFNQFANSQASILLQIFG	520
Consensus	TQSPNPLQFQKQPSQFQIFFGVFNQFANSQASILLQIFG	520
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	QALYNQSKFSGLQMSQSDPSQLSNQSQRPFFHLADTVSA	560
Consensus	QALYNQSKFSGLQMSQSDPSQLSNQSQRPFFHLADTVSA	560
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	ALAADPNFTAALAAAITSLIGGAQFNNNSTTSTNYNGTTS	600
Consensus	ALAADPNFTAALAAAITSLIGGAQFNNNSTTSTNYNGTTS	600
<i>Glyma13g38630.1</i> WRKY 测序结果	TNTSNGNITSSNN	613
Consensus	TNTSNGNITSSNN	613

图1 *GmWRKY31* 基因测序结果与  
*Glyma13g38630.1* 的氨基酸比对

Fig. 1 Alignment of amino acid sequence of  
*GmWRKY31* with *Glyma13g38630.1*

## 2.2 WRKY31 的组织特异性表达

实时定量 PCR 分析表明 *GmWRKY31* 在大豆的叶、花、豆荚、根、根瘤中均有表达,且在花中的表达量最高,在叶片、根、根瘤中的表达量相近,在豆荚中的表达量最低(图2),暗示其在花发育过程中可能发挥特殊作用。

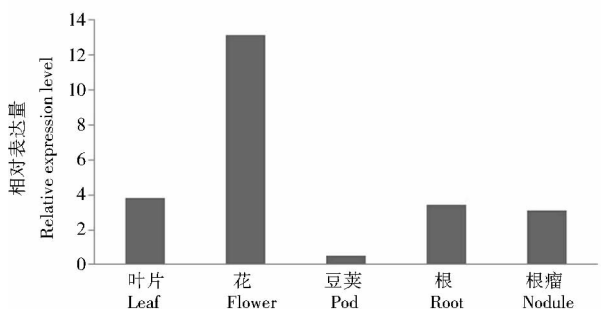


图2 *GmWRKY31* 的组织表达特性

Fig. 2 Tissue expression pattern of *GmWRKY31*

## 2.3 WRKY31 理化性质及结构与功能预测

*GmWRKY31* CDS 全长为 1 845 bp, 编码 614 个氨基酸, 蛋白预测结果显示理论等电点 (pI) 为 5.94, 分子质量为 6 6370.3 Da。在 *WRKY31* 的氨基酸序列中 Ser 的使用频率最高, 为 11.6%。*WRKY31* 蛋白总的负电荷残基数为 64 个, 正电荷残基数为 54 个, 蛋白的不稳定系数较高, 为 46.38, 表明蛋白质不稳定。*WRKY31* 蛋白亲水性较强, 氨基酸残基疏水性总和 (GRAVY) 为 -0.711。蛋白跨膜区预测仅发现 2 个可能的跨膜区 (456 ~ 478 aa, 561 ~ 583 aa), 但分数较低, 是跨膜蛋白的可能性较小。蛋白结构域功能预测表明该蛋白含有 1 个 *WRKY* 结构域 (343 ~ 419 aa), GO 分析表明含有 DNA 结合域 (GO: 0006355), 属于能与 DNA 结合的转录因子。通过在线网站 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白的三级结构, 结果如图 3 所示, 其含有 1 个 *WRKY* 结构域, 与结构域功能预测结果一致, 说明预测结果准确。可见 *GmWRKY31* 是 *WRKY* 家族的成员, 含有 1 个 *WRKY* 结构域和 C2H2 型锌指结构, 属于第二类 *WRKY* 基因。

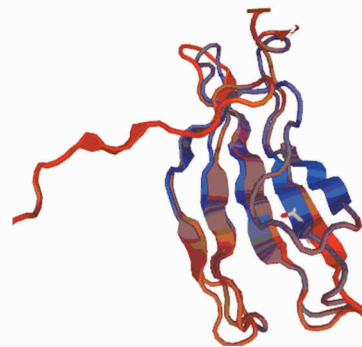


图3 *GmWRKY31* 蛋白的三级结构

Fig. 3 3-D structure of *GmWRKY31* protein in soybean

## 2.4 大豆 WRKY31 的 3 个同系物的同源性比较

利用蛋白比对在 Phytozome 数据库中找到了 *GmWRKY31* 的 3 个同源基因 (*Glyma13g38630.1*、*Glyma06g46420.2* 和 *Glyma12g10350.1*), 使用 DNAMAN 软件对其进行氨基酸比对 (图 4), 结果表明, *GmWRKY31* (*Glyma13g38630.1*) 与另外 2 个序列高度同源, 都含有 *WRKY* 结构域, 与 *Glyma06g46420.2* 和 *Glyma12g10350.1* 蛋白质同源性分别为 67.3% 和 64.7%。而 *Glyma06g46420.2* 和 *Glyma12g10350.1* 的蛋白质同源为 72.3%。3 个同源基因分别位于第 6, 12 和 13 号染色体上, 并没有出现一个染色体上多个基因的现象。



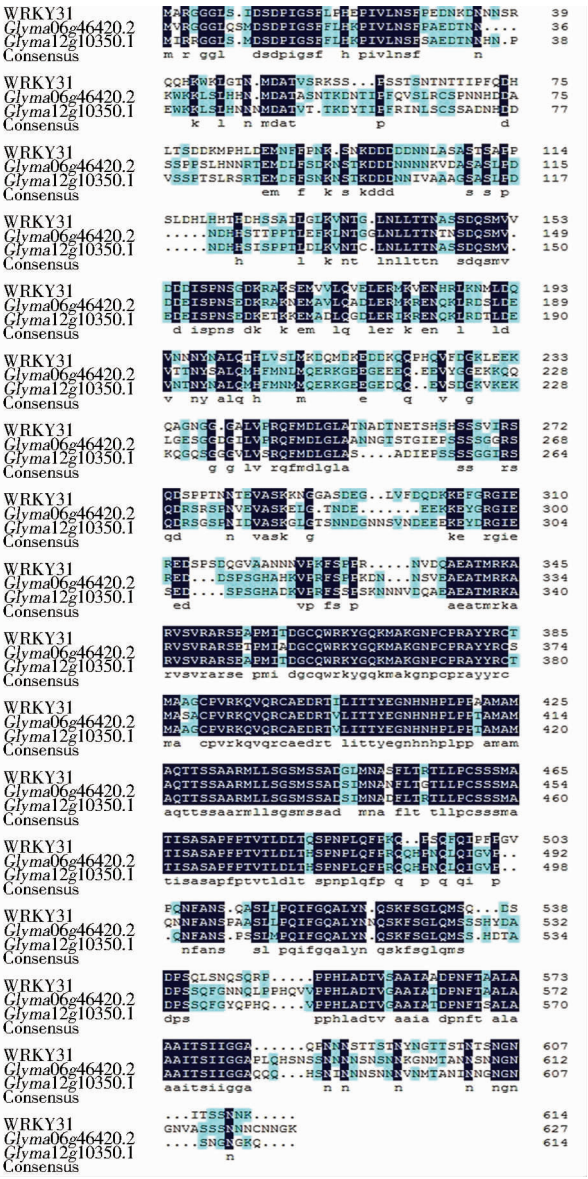


图4 *GmWRKY31* 基因与大豆同系物氨基酸序列比对  
Fig.4 Alignment of amino acid sequence of *GmWRKY31* with that of soybean homologues

2.5 *WRKY31* 蛋白分子的系统进化树

利用 *GmWRKY31* 的氨基酸序列在 NCBI 和 Phytosome 中找到 15 个物种的 17 个同源序列(表 1), 利用 MEGA 5.0 软件,采用邻接法构建系统进化树。由图 5 可以看出,整个进化树分为单子叶植物和双子叶植物两大支。单子叶植物水稻单独位于一支上,其他植物位于另一支上。在豆科植物中大豆和芸豆中的 *WRKY* 蛋白距离较近,显示了较近的亲缘关系,其中大豆 *WRKY31* 和芸豆在 一支上, *Glyma06g46420.2* 和 *Glyma12g10350.1* 在另一支上。由此可以从进化上表明 *WRKY31* 和芸豆 *WRKY* 基因同源率最高, *WRKY31* 与芸豆 *WRKY* 基因同源关系比与大豆中其他两个拷贝的同源关系更近。苜蓿作为豆科植物,同源关系应该与大豆和芸豆非常近,但是结果显示苜蓿 *WRKY* 基因与木瓜和棉花中的 *WRKY* 基因亲缘关系更近,推测其可能在进化过程中功能上发生过较大分化<sup>[4]</sup>。

3 讨论

据报道,大豆染色体在进化过程中经过一次加倍,很多基因都保存下来,所以很多基因在大豆基因组中是以多拷贝存在的<sup>[4]</sup>。本研究对 *GmWRKY31* 进行生物信息学分析,结果显示 *GmWRKY31* 在大豆基因组中有另外 2 个同源基因,这 3 个基因分别位于 3 条染色体上,都含有 *WRKY* 结构域。氨基酸比对结果和进化树分析表明, *Glyma06g46420.2* 和 *Glyma12g10350.1* 的亲缘关系更近,没有发现与 *GmWRKY31* (*Glyma13g38630.1*) 高度同源的序列。大豆基因组的加倍导致了整个基

表 1 *WRKY* 基因的完整编码区序列来源

Table 1 Sources of coding sequences of *WRKY* genes

GeneBank 序列登录号	物种	Phytosome 序列登录号	物种
Accession number	Species	Phytosome accession number	Species
AAT84159	水稻 <i>Oryza sativa</i>	<i>Glyma06g46420.2</i>	大豆 <i>Glycine max</i>
XP_007026134.1	可可 <i>Theobroma cacao</i>	<i>Glyma12g10350.1</i>	大豆 <i>Glycine max</i>
ABN69038.1	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	mrna23963.1-v1.0-hybrid	草莓 <i>Fragaria vesca</i>
NP_564792.1	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	evm.model.supercontig_87.103	木瓜 <i>Carica papaya</i>
ACV92030.1	毛白杨 <i>Populus tomentosa</i>	Aquca_066_00022.1	楼斗菜 <i>Aquilegia coerulea</i>
AGV75956.1	棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	Phvul.005G116000.1	芸豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>
KEH29706.1	苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	Eucgr.K00786.1	大桉 <i>Eucalyptus grandis</i>
AHD24521.1	甜椒 <i>Capsicum annuum</i>	ppa002619m	巴旦木 <i>Prunus perisica</i>

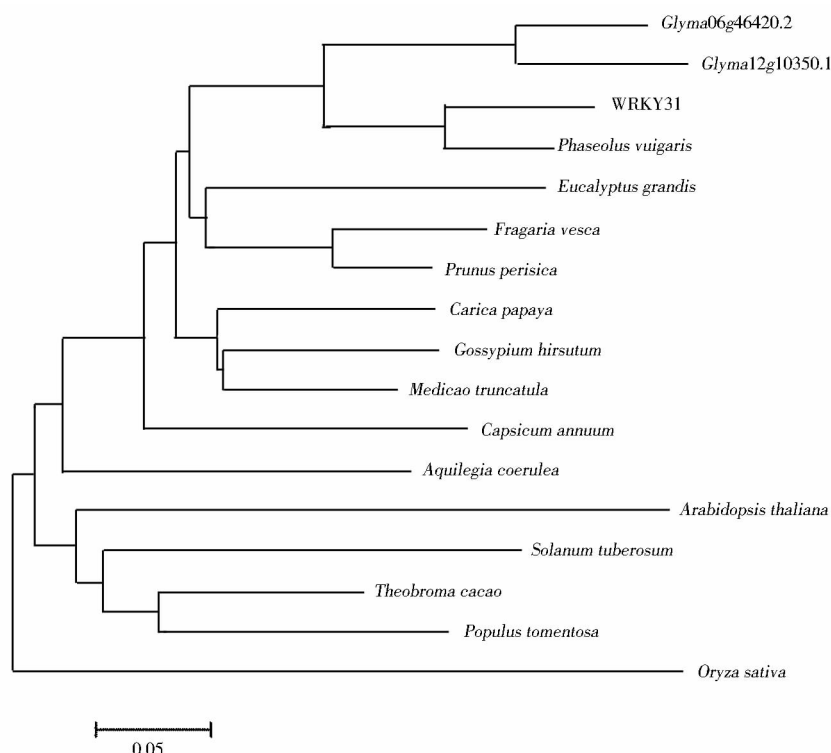


图5 基于邻接法的 WRKY31 蛋白序列系统发生树

Fig. 5 Phylogenetic tree of WRKY31 protein based on neighbor joining methods

基因组的高度重复,同时伴随基因的多样化和基因丢失,导致了基因拷贝数的多样化。3 个大豆 WRKY31 的同系物及其他物种中的同源基因均含有高度保守的 WRKY 结构域,表明 WRKY 结构域进化上的保守性,预示着其在生物体内的重要性,同时也表明大豆基因组内存在基因的多拷贝现象,但其形成机制和存在的生物学意义有待进一步研究。

WRKY 家族分为 3 大类,在生物和非生物胁迫中起着重要作用。Ramamoorthy 等<sup>[15]</sup>利用 RT-PCR 及荧光定量 PCR 的方法,分析水稻 WRKY 基因家族在低温、干旱、盐等非生物胁迫下的表达谱,结果发现,41 个水稻 WRKY 因子至少响应了其中一种非生物胁迫处理。Dong 等<sup>[16]</sup>研究 72 个拟南芥 WRKY 基因防御应答反应的表达动态,结果发现,在经过假单胞菌侵染、水杨酸处理后,42 个 *AtWRKY* 的表达量发生明显变化。Liu 等<sup>[17]</sup>用致病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) 13751 侵染水稻过表达 *OsWRKY71* 的转基因植株,结果发现,抗性明显提高,且 *OsNPR1* 和 *OsPR1b* 等相关抗性基因得到表达,也进一步说明 *OsWRKY71* 通过调节抗逆途径中的相关功能基因(*OsNPR1*、*OsPR1b* 等)的表达,从而提高水稻抗逆性<sup>[17]</sup>。目前,WRKY 转录因子在大豆中的研究较少,仍需进行深入研究。

随着基因芯片技术应用和 Northern 杂交方法的普及以及转录组学,免疫沉淀等新技术的应用,在水稻、大麦和拟南芥等植物中有大量 WRKY 基因被鉴定出来,但关于大豆 WRKY 的相关报道较

少<sup>[18-20]</sup>。本研究中 WRKY31 属于第二类 WRKY 家族,含有一个 WRKY 结构域,锌指结构为 C2H2 型,通过对 WRKY31 进行系统进化分析,揭示了其在进化过程中的保守性,为大豆 WRKY 基因家族的挖掘以及功能分析提供了理论参考。

## 参考文献

- [1] Guilfoyle T J. The structure of plant gene promoters[J]. Genetic Engineering, 1997, 19: 15-47.
- [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 beta-amylase from sweet potato[J]. Molecular and General Genetics, 1994, 244(6): 563-571.
- [3] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, et al. WRKY transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(5): 247-258.
- [4] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean[J]. Nature, 2010, 463(7278): 178-183.
- [5] Song Y, Ai C R, Jing S J, et al. Research progress on functional analysis of rice WRKY genes[J]. Rice Science, 2010, 17(1): 60-72.
- [6] Zhang Y J, Wang L J. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants[J]. BMC Evolutionary Biology, 2005, 5: 1-12.
- [7] Clive J. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2008 [M]. New York: ISAAA, 2008: 4-5.
- [8] Michael I P, Monetti C, Chiu A C, et al. Highly efficient site-specific transgenesis in cancer cell lines[J]. Molecular Cancer, 2012, 11(1): 89-99.
- [9] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2000, 5

- (5):199-206.
- [10] Maleck K, Levine A, Eulgem T, et al. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance [J]. Nature Genetics, 2000, 26(4):403-410.
- [11] 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.
- [12] 王春梅. 浅谈大豆高产病虫害的防治方法 [J]. 科技致富向导, 2014(8):11. (Wang C M. Discussion on prevention and treatment of diseases and insect pests of soybean yield [J]. The Wizard Rich Technology, 2014(8):11.)
- [13] Xie Z, Zhang Z L, Zou X L, et al. Interactions of two abscisic-acid induced WRKY genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells [J]. The Plant Journal, 2006, 46(2):231-242.
- [14] Zou X L, Neuman D, Shen Q J. Interactions of two transcriptional repressors and two transcriptional activators in modulating gibberellin signaling in aleurone cells [J]. Plant Physiology, 2008, 148(1):176-186.
- [15] Ramamoorthy R, Jiang S Y, Kumar N, et al. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments [J]. Plant Cell Physiology, 2008, 49(6):865-879.
- [16] Dong J, Chen C, Chen Z. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response [J]. Plant Molecular Biology, 2003, 51(1):21-37.
- [17] Liu X, Bai X, Wang X, et al. *OsWRKY71*, a rice transcription factor, is involved in rice defense response [J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164:969-979.
- [18] 仇玉萍, 荆邵娟, 付坚, 等. 13 个水稻 WRKY 基因的克隆及其表达谱分析 [J]. 科学通报, 2004, 49(18):1860-1869. (Qiu Y P, Jing S J, Fu J, et al. Clone and expression profiling analysis of 13 WRKY transcription factors in rice [J]. Chinese Science Bulletin, 2004, 49(18):1860-1869.)
- [19] Marè C, Mazzucotelli E, Crosatti C, et al. Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 55:399-416.
- [20] Seki M, Ishida J, Nanjo T, et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray [J]. The Plant Journal, 2002, 31(3):279-292.

## Reid G. Palmer

Dr. Reid Griffith Palmer, Ph. D., 73, a respectable editorial board member of the journal of Soybean Science, passed away Sunday, August 17, 2014 at Mary Greeley Medical Center in Ames, after fighting a courageous battle with cancer and an incurable infection. 'Reid', as his wife, friends, colleagues and students affectionately called him, was born June 21, 1941 to Jasper and Fern (Ernsthausen) Palmer in Pemberville, Ohio. He has one living sister Dedra (Palmer) Strohl and brother-in-law Ed of Fostoria, Ohio. Reid married his loving wife Nuray (Sahin) of almost 14 years in Ankara, Turkey where he met her on one of his many professional trips.

Reid received his B. S. A. at the University of Toronto, Canada (Ontario Agriculture College) in 1963, an M. S. from the University of Illinois in 1965, and a Ph. D. from Indiana University in 1970. He became a USDA Research Geneticist at Iowa State University, Ames in 1970 and a USDA-ARS-CICGR Collaborator and Assistant Professor associated with the Department of Agronomy, Iowa State University in 1973, and rose through the academic ranks to professor. His official title before retirement was USDA Research Geneticist and Professor of Agronomy and Genetics, Development and Cell Biology. He officially retired from ARS-USDA in 2012 but remained professionally active as an Affiliate Professor in the Department of Agronomy until his death. Reid's areas of expertise were cytogenetics and plant breeding of soybeans. His research involved two primary objectives: the identification, characterization, and utilization of fertility/sterility mutants in a phenotypic recurrent selection system with insect-mediated cross-pollination to increase hybrid seed production; and the identification and characterization of mutable loci with emphasis on genetic studies of germinal revertants. He developed collaborations with many fellow researchers within Iowa State University, the United States and abroad because of his excellent reputation in these areas. These involvements provided Reid with innumerable opportunities to travel worldwide to carry out his research and present his findings (277 abstracts, 18 Symposia and Proceedings and 149 technical Newsletter Articles) at universities and private companies, as well as state, national and international conferences. His studies were published in over 200 research articles and invited book chapters. His research was supported by numerous private, state, and federal grants. He served as associate editor or on the editorial board of 12 scientific journals (including Soybean Science) in his field and reviewed countless manuscripts for 51 scientific journals and other media. One of Reid's major strengths and loves was mentoring of many undergraduate and 44 graduate students, postdoctoral fellows and visiting scientists, including many of those from China, and he served on numerous graduate committees at ISU and eight other domestic and foreign universities. He was dedicated to training and mentoring them, many of whom have become leaders in the same or allied fields in academia, private industry and government. He enjoyed the laboratory part of his research but he really loved being outside in his soybean fields planting, making delicate crosses and harvesting the results of his and his students' labors. His experimental plots spread well beyond Iowa.

Reid received prestigious recognitions for his professional activities over the years including being a member of 11 professional and honorary societies and a recipient of: the Raymond and Mary Baker Agronomy Excellence Award, Department of Agronomy, ISU; Soybean Researchers Recognition Award, American Soybean Association/Imperial Chemicals Industries (Americas) Award; Fellow of both the American Society of Agronomy and Crop Science Society of America; Fellow, Japan Society for the Promotion of Science; Distinguished Fellow, Iowa Academy of Science; and National Council of Commercial Plant Breeding Genetics and Plant Breeding Award. He was invited as a Honorary Professor at the National Center for Soybean Improvement, Nanjing Agricultural University in November, 2013, of which the certificate is to be presented at an formal ceremony this fall in China.

There is no doubt Reid touched many individuals during his lifetime, he has been being a truly friend of Chinese soybean scientists. However, what he gave to them in friendship, training and love will be felt for generations to come. You will be missed, Reid.