

# 平榛 ChWRKY2 转录因子的克隆及在低温胁迫下的表达分析

赵天田, 王贵禧\*, 梁丽松, 马庆华, 陈新

(林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

**摘要:**根据平榛花芽转录本高通量测序的结果, 采用 RACE-PCR 技术克隆到一个全长 675 bp, 编码 179 个氨基酸的平榛 WRKY 基因, 命名为 *ChWRKY2*。*ChWRKY2* 蛋白序列中只含有一个 WRKY 结构域, 锌指结构为 C-X<sub>4</sub>-C-X<sub>23</sub>-H-X<sub>1</sub>-H, 属于 WRKY 家族第 II 类成员。对 *ChWRKY2* 基因进行实时荧光定量 PCR 表达分析, 结果表明: 平榛雌花芽中 *ChWRKY2* 在 12 月份的表达量最高, 随后表达量逐渐下降。4 °C 低温胁迫处理根蘖苗 4 h 后, 叶片中 *ChWRKY2* 的表达量快速升高, 并在 8 h 达到最大表达量。此外, *ChWRKY2* 在不同器官中的表达具有差异性, 雄花序中表达量最高, 其次是雌花芽, 树皮(韧皮部)中表达量最低。

**关键词:**平榛; WRKY 基因; 克隆; 序列分析; 实时荧光定量 PCR

中国分类号: S718.46

文献标识码: A

## Cloning and Expression Analysis of ChWRKY2 from *Corylus heterophylla* under Low Temperature Stress

ZHAO Tian-tian, WANG Gui-xi, LIANG Li-song, MA Qing-hua, CHEN Xin

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

**Abstract:** According to the high-throughput sequencing results of hazelnut buds, a 675 bp fragment, *ChWRKY2*, which encoded a polypeptide of 179 amino acids was obtained through RACE-PCR. The deduced protein sequence shows that this protein belongs to the second group of WRKY family and the zinc-finger structure is C-X<sub>4</sub>-C-X<sub>23</sub>-H-X<sub>1</sub>-H. The *ChWRKY2* expression in hazelnut buds was analyzed under natural conditions and the result displayed that the expression level was the highest in December and then decreased. *ChWRKY2* in leaves were rapidly and highly induced when suckers were exposed to low temperatures of 4 °C, *ChWRKY2* were activated at 8 h reaching a peak. the spatial expression analysis revealed that the transcription level of *ChWRKY2* was relatively higher in male inflorescence than that in bud and bark tissues.

**Key words:** *Corylus heterophylla* Fisch.; WRKY gene; cloning; sequence analysis; real-time PCR

植物转录因子的研究已经成为现今植物基因功能研究的一个重点, WRKY 转录因子作为重要的一个转录因子超家族, 除了参与植物的生长发育及物质代谢途径, 在抗病毒、抗细菌等方面发挥重要的调

节作用外, 还参与了应答环境信号刺激, 如低温、高盐、干旱等非生物胁迫逆境<sup>[1]</sup>。目前, 在转录水平上应用荧光定量 PCR、基因芯片、转录谱及表达谱等方法分析不同物种中 WRKY 转录因子在不同胁迫下

收稿日期: 2011-12-27

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划“高产优质大枣、榛子新品种选育”(2006BAD01A1701); 国家林业局“948”项目“榛子特异性状育种材料及微繁技术引进”(2008204208)

作者简介: 赵天田(1984—), 男, 博士, 主要从事榛子抗逆基因方面的研究, E-mail: zhaotian1984@163.com

\* 通讯作者: 王贵禧, 研究员, E-mail: wanggx0114@126.com

的表达模式与功能已经成为当今研究的热点。*WRKY* 的第1个转录因子是1994年在甘薯 (*Ipoea batatas* L.)<sup>[2]</sup> 上克隆得到的,随后在其它很多植物中发现了 *WRKY* 类转录因子。目前, *WRKY* 基因的研究主要集中在水稻、拟南芥、烟草等一些已经完成测序的物种中<sup>[3]</sup>, 在木本植物中 *WRKY* 的研究较少。迄今为止,已报道的与非生物胁迫相关的 *WRKY* 转录因子主要有10个<sup>[4]</sup>。目前,平榛上 *WRKY* 基因所介导的植物应答反应过程、逆境胁迫下的反应调控机制,尤其是低温胁迫下的调控机制尚未见报道。

平榛为桦木科 (*Betulaceae*) 榛属 (*Corylus*) 植物,是世界四大坚果(榛子、核桃、扁桃、腰果)之一,具有极高的营养价值和经济价值,全世界约有16种,我国作为重要的榛属植物资源国,原产8个种和2个变种,其中平榛 (*Corylus heterophylla* Fisch.) 是我国特有的重要的榛属抗寒种质资源,可抗冬季-48℃的极端低温,而国外种植较广泛的欧榛 (*C. avellana* L.) 以及我国东北、华北地区大面积发展的平欧杂交榛 (*C. heterophylla* Fisch. × *Corylus avellana* L.) 的抗寒能力较差,低温以及霜冻等会造成花芽枯死、雄花序抽干、枝条枯梢等现象<sup>[5-6]</sup>, 从而影响坚果的产量造成经济损失。本研究选择平榛花芽为实验材料,通过 RACE 克隆技术克隆得到一个平榛 *WRKY* 基因,通过对克隆得到的基因在自然条件下(秋天-冬天-春天)的表达特性进行了分析,并在人工可控温度的光照培养箱中模拟低温胁迫条件,研究平榛 *WRKY* 基因响应低温信号的作用机制,以便为今后采用基因工程手段以及分子标记辅助育种方法培育榛子抗寒新品种提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及处理

在河北木兰围场国有林场(116°32'~118°14'E, 41°35'~42°40'N)成片的平榛林中,选择同一棵母株上萌发的基因型一致的平榛为实验材料。

1.1.1 用于自然寒冷条件下 *WRKY* 表达模式研究的材料 分别于2010年11月1日、12月1日和2011年1月1日、2月1日、3月1日取雌花芽,取材后立即投入液氮冻干,随后保存于-80℃冰箱。研究自然条件下平榛 *WRKY* 基因的季节表达。在较为寒冷的1月份分别取雌花芽、雄花序、树皮(韧皮部),用于检测 *WRKY* 基因在平榛不同组织器官中的

表达情况。

1.1.2 用于人工控制的低温胁迫条件下 *WRKY* 表达模式研究的材料 参照 Rinne 等<sup>[7]</sup> 的方法,研究在人工低温胁迫处理下 *WRKY* 基因的表达情况,将基因型一致的平榛根蘖苗培育苗龄3个月后,放入光照培养箱中进行适应(光照强度 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光照时间 16 h/8 h,湿度 80%~90%,昼夜温度分别为 25、21℃),随后进行 4℃低温胁迫处理,分别在处理 0、2、4、8、24 h 时采集叶位相同的叶片(完全展开的第 4~5 片叶)<sup>[8]</sup>,用于研究 *WRKY* 基因在人工低温胁迫处理下的表达模式。

### 1.2 方法

1.2.1 *ChWRKY2* 基因的克隆与序列分析 选择寒冬(1月份)平榛的雌花芽为材料,提取 RNA,使用 Solexa Sequencing 测序技术对转录本进行测序。分析测序结果,从中筛选得到几个类似 *WRKY* 基因的片段,通过 NCBI 上的 Blast 比对结果进行分析,选择一条编号为 Unigene9262 的可能与响应低温有关的基因片段进行研究。平榛总 RNA 提取采用 CTAB 法<sup>[9]</sup>,利用 SMART™ RACE 试剂盒进行反转录得到第一链,然后用于基因的 RACE 克隆。根据筛选到的基因片段用 Primer5 设计扩增 3' 方向的引物 P1 和 5' 方向的引物 P2(表 1),根据 RACE 试剂盒中的说明书采用 Touch down PCR 程序进行 cDNA 扩增,PCR 产物采用天根的凝胶回收试剂盒回收,连接 pMD-19T Vector 并转化感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆,经过菌落 PCR 检测正确后,送北京华大生物技术公司进行测序。

利用 DNAMAN (6.0DEMO) 软件对 5' 和 3' RACE 结果进行拼接,得到全长 cDNA 序列。测序结果在 GenBank 网站上进行在线 Blast 分析,用 NCBI 提供的 ORF Finder 找到开放阅读框(open reading frame, ORF)及其编码的氨基酸序列。克隆得到基因编码的蛋白分子量、理论等电点及保守结构域等预测通过软件 ProtParam (<http://www.expasy.org>) 进行。采用 DNAMAN 软件进行多重序列比对,使用 Mega4 软件进行系统进化树分析。亚细胞定位预测分析使用在线软件 Wolf Psort (<http://wolffpsort.org/>) 进行。

1.2.2 荧光定量 PCR 表达分析 提取不同处理材料的总 RNA,反转录合成 cDNA 第一链作为实时荧光定量 PCR 的模板。根据荧光定量 PCR 引物设计原则设计一对特异引物 *WRKYQR-F* 和 *WRKYQR-R*

(表1)。以本课题组前期比较筛选后低温胁迫下稳定性较好的 *Actin* 基因 (GenBank accession number HQ677569) 为内参, 设计其特异引物 *Actin-F* 和 *Actin-R* (表1), 扩增片段为 101 bp, 进行实时荧光定量 PCR 表达分析。参考周琳等<sup>[10]</sup>的方法, 并参照荧光定量试剂盒 SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit 的说明

书, 反应在 ABI7500 实时定量 PCR 仪上进行。荧光定量 PCR 扩增体系为: cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 特异引物 (10  $\mu\text{mol}$ ) 和 50  $\times$  ROX Reference DyeII 各 0.4  $\mu\text{L}$ , 2  $\times$  SYBR Premix Ex Taq™ 10  $\mu\text{L}$ , 加 RNase free 至 20  $\mu\text{L}$ 。试验结果利用 CFX Manager™ Software 软件分析实验数据。

表1 *ChWRKY2* 克隆以及实时荧光定量表达分析引物

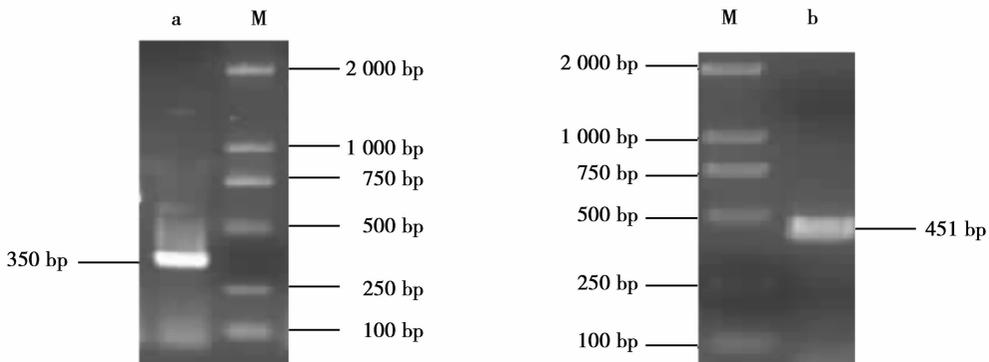
引物	所使用引物序列	引物作用
P1	5'-GCTTTGTGGGTCCGAAACTGATGC-3'	3'末端扩增
P2	5'-TGCATCAGTTTCGGACCCACAAAG-3'	5'末端扩增
<i>WRKYQR-F</i>	5'-ATGTCGGAGATGGATGCTCCTGTT-3'	荧光检测 <i>ChWRKY2</i> 的表达
<i>WRKYQR-R</i>	5'-TTTGCATCAGTTTCGGACCCAC-3'	
<i>Actin-F</i>	5'-TGCTCAAGGCTGGTTTGC-3'	扩增内标, 101 bp
<i>Actin-R</i>	5'-CTGACCCATCCCAACCATGA-3'	

## 2 结果与分析

### 2.1 平榛 *ChWRKY2* 全长克隆及序列分析

以平榛花芽的 cDNA 为模板, 根据平榛雌花芽转录本高通量测序结果中筛选得到的 Unigene9262 片段设计 3'端特异引物, 通过 RACE-PCR 扩增、产物回收后, 得到长度为 350 bp 的 3'末端 (图1a)。5'RACE 引物是根据 3'RACE 扩增得到的片段设计的, 得到的片段长度为 451 bp (图1b)。所扩增得到的 3'RACE 和 5'RACE 片段与转录谱库中的所筛选的响应低温胁迫相关的 Unigene 片段有共同重叠的区域, 这表明克隆所得到的是筛选基因的 3'端与 5'端。利用 RT-PCR, 获得 1 条 675 bp 的序列, 通过 NCBI

上的 Blast 对比发现, 获得的序列与 *WRKY* 基因同源, 暂命名为 *ChWRKY2*。利用 NCBI 提供的 ORF Finder 和在线软件 ProtParam 进行分析发现, 该序列包含 1 个 537 bp 的开放阅读框, 编码 179 个氨基酸, 分子量为 20.4 kD, 理论等电点 (pI) 为 9.77。生物信息学分析如图 2 所示: 克隆的 *ChWRKY2* 含有 1 个 WRKY 区域 (图中斜体部分), 1 个 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 锌指结构域 (C-X<sub>4</sub>-C-X<sub>23</sub>-H-X<sub>1</sub>-H, 用虚下划线表示部分), 属于 WRKY 家族的第 II 类<sup>[15]</sup>。应用 Wolf Psort 软件对 *ChWRKY2* 基因进行亚细胞定位分析, 发现 *ChWRKY2* 定位于细胞核, 预测的数据如下: *k used for kNN is: 14 queryProtein details nucl: 12.0, chlo: 1.0*



a 为 *ChWRKY2* 3'RACE 扩增产物, b 为 *ChWRKY2* 5'RACE 扩增产物, M 是 DNA 标准分子量 DL2000。

图1 平榛 *ChWRKY2* 基因的 PCR 扩增电泳图

```

1 ACATGGGGACCAAAACATCCCTCTCTCTCTGTGATGGAGAACTACACAACATTATTTTC
1 M E N Y T T L F S
61 TTGTTTCATCGTCTTCAACGCCACCGGTTTCTTCCTTGTCACTGAACATGGCAGATCATT
10 C S S S S T P P V S S L S L N M A D H S
121 TCATGCTTACAATGAATTCCAAGGTAGCAAGTCAAATGGGTTCTTGGGACTGATCTCGGA
30 H A Y N E F Q G S K S N G F L G L M S E
181 GATGGATGCTCCTGTTTCAAACATGAATGTTCTCATGGTAGAAGCTTTGTGGGGTCCGA
50 M D A P V S N M N V P H G R S F V G S E
241 AACTGATGCAAAATTAGGGAAGAAAAAGGGAGAGAAGAAGATAAGAAAACCAAGATATGC
70 T D A K L G K K K G E K K I R K P R Y A
301 CTTTCAAACAAGGAGCCATGTCGATATACTTGATGACGGCTACAGATGGAGAAATATGG
90 F Q T R S H V D I L D D G Y R W R K Y G
361 ACAAAAAGCTGTGAAGAACAACAAATTTCCGAGAAGCTACTACCGGTGTACACACCAAGG
110 Q K A V K N N K F P R S Y Y R Q T H Q G
421 TTGCAACGTGAAAAAGCAAGTTCAGAGACTAACTAAAGATGAAGGGACCGTCTTAAACAAC
130 Q N V K K Q V Q R L T K D E G T V L T T
481 TTATGAAGGAATGCATTTCGATCCAATAGAGAAGTCTACTGATAACTTCGAGCACATCTT
150 Y E G M H S H P I E K S T D N F E H I L
541 GACCCAGATGCAAATCTCACATCCTCTCTATAAGGGCTTAATTAGAAACTGTAGAGACC
170 T Q M Q I F T S S Y *
601 ATGACGAATCTGTAAATTCTGTACTTTTAAATAAATATTGCTCAAAAAAAAAAAAAAAAA
661 AAAAAAAAAAAAAAAAA

```

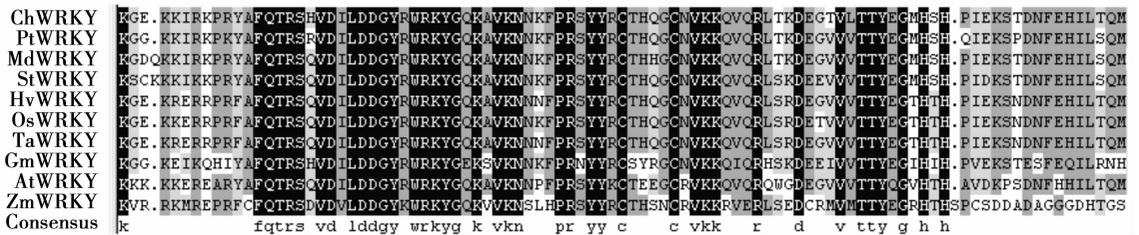
起始密码子和终止密码子用下划线表示,WRKY 保守域用斜体表示,锌指结构用虚下划线标出,锌指结构的半胱氨酸和组氨酸用方框标出。

图 2 ChWRKY2 编码的氨基酸序列分析

### 2.2 ChWRKY2 氨基酸序列同源性及系统进化发育分析

将 ChWRKY2 基因的氨基酸序列同其他物种 WRKY 基因的氨基酸序列进行同源性分析。利用 DNAMAN 软件对 ChWRKY2 基因的氨基酸序列及在 NCBI 上选出的同源性较高的具有代表性的 9 条氨基酸序列进行多重比对。结果发现:平榛与杨树 (*Populus tomentosa* ACV92020)氨基酸序列的相似性最高为 65%,亲缘关系最近,其次是蔷薇科的苹果 (*Malus domestica* ADL36856) 为 57%,与玉米 (*Zea*

*mays* ACN34879) 的相似性最低,仅为 33%;但是,如图 3 所示:保守结构域以及特征序列同源性很高。在多重比对的基础上,使用 Mega4 软件构建 ChWRKY2 及上述 9 条氨基酸序列的系统进化树,以研究 ChWRKY2 与其它植物 WRKY 之间的进化关系。从图 4 可以看出:平榛和杨树的关系较近,并与蔷薇科的苹果聚到了一起;1 年生草本植物大麦、小麦、水稻位于一个分支,拟南芥、大豆以及玉米位于另一个分类簇中;平榛与玉米的亲缘关系最远。



PtWRKY: 杨树 (*Populus tomentosa*, ACV92020); MdWRKY: 苹果 (*Malus domestica*, ADL36856); StWRKY: 马铃薯 (*Solanum tuberosum*, BAC23031); HvWRKY: 大麦 (*Hordeum vulgare*, ABI13378); OsWRKY: 水稻 (*Oryza sativa*, ABA93855); TaWRKY 小麦 (*Triticum aestivum*, ABN43184); GmWRKY: 大豆 (*Glycine max*, ABC26915); AtWRKY: 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, AF426251); ZmWRKY: 玉米 (*Zea mays*, ACN34879); 下同。

图 3 ChWRKY2 保守性区域和别的 WRKY 蛋白的同源性分析 (ChWRKY2 保守性区域用黑色标出)

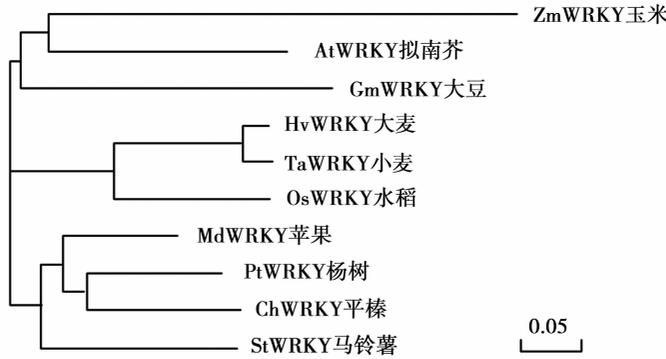


图4 平榛 *ChWRKY2* 和其它植物 WRKY 蛋白的系统进化树分析

### 2.3 qRT-PCR 分析 *ChWRKY2* 基因的时空表达

以 *Actin* 为内参,对平榛 *ChWRKY2* 基因自然越冬条件下在雌花芽中的表达情况和在 4 °C 低温胁迫条件下(0、2、4、8、24 h)叶片中的表达模式进行了初步的研究。如图 5 所示:在自然条件下 11 月份雌花芽中 *ChWRKY2* 基因已经高丰度表达,12 月份、次年 1 月份 *ChWRKY2* 的表达量维持在较高的水平,2 月

份表达量开始出现下降,3 月份 *ChWRKY2* 的表达量降低明显,这可能与气温的升高有关。4 °C 人工低温胁迫处理 4 h 后,叶片中 *ChWRKY2* 基因的表达量迅速上升,处理 8 h 后达到最大的表达量(图 5)。说明 *ChWRKY2* 能够在低温胁迫的早期响应这一生理过程。

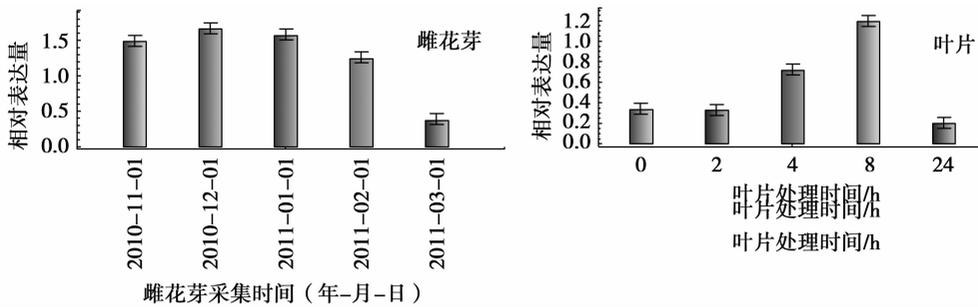


图5 *ChWRKY2* 基因在自然条件(雌花芽)以及低温 4 °C 胁迫处理(叶片)不同时间下的表达模式  
*ChActin* 作为 qRT-PCR 的内参基因。

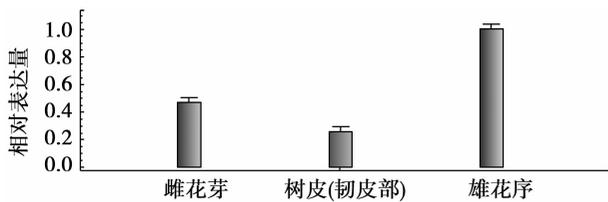


图6 *ChWRKY2* 在平榛不同组织中的表达

采用实时荧光定量 PCR 的方法,用平榛的 *Actin* 基因为内参,对平榛不同组织器官中的 *ChWRKY2* 表达情况进行分析,结果(图 6)表明:在雄花序中, *ChWRKY2* 的表达量最高,其次为雌花芽,树皮(韧皮部)中最低。虽然在平榛的雌花芽、树皮(韧皮部)以及雄花序中都有 *ChWRKY2* 的表达,但不同组织器官中表达量的差异表明 *ChWRKY2* 在平榛中具有组织表达特异性。

### 3 结论与讨论

WRKY 转录因子是通过接受外界逆境胁迫信号、调控相关逆境基因表达,进而引起植物体内一系列生理变化的一类转录因子,在植物逆境胁迫信号传导过程中具有重要作用<sup>[2]</sup>;但是目前在平榛上 WRKY 转录因子参与非生物胁迫的研究还未见报道,大大限制了该类基因在榛属植物抗逆遗传改良上的应用。本实验室利用华大的高通量测序技术对平榛雌花芽冬季(1 月份)的转录本进行了测序,并筛选得到一个类似 WRKY 基因的片段。通过 RACE-PCR 方法成功克隆得到 WRKY 的同源基因 *ChWRKY2*,其编码的蛋白质含有 WRKY 家族保守的 WRKYGQK 区域,具有 1 个 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 锌指结构域,根据 Eulgem 等<sup>[11]</sup>的分类标准,属于 WRKY 家族的第 II 类,目前发现的 WRKY 蛋白大多数属于此类,较为

保守。对 ChWRKY2 氨基酸序列与其它植物的 WRKY 氨基酸序列的多重比对发现, WRKYGQK 区域保守性最强。构建的系统进化树中,平榛 WRKY 最先与杨树、苹果聚合,同源基因关系较近,与大豆、拟南芥及玉米等草本植物同源基因关系较远。这表明 ChWRKY2 的同源基因所编码的氨基酸序列在进化过程中既具有较强的保守性,又存在着不同植物间的差异<sup>[12]</sup>。

对平榛根蘖苗进行 4 ℃ 低温胁迫处理,在其它条件都一致的情况下,胁迫处理 4 h 后 WRKY 基因的表达迅速上调,处理 8 h 后达到最大值,这表明 ChWRKY2 是响应低温胁迫的转录因子,并且可能是早期应答低温信号的分子。在自然条件下,温度较低的 11 月份、12 月份及次年 1 月份 ChWRKY2 也具有较高的表达量,但温度回升的 2、3 月份的表达量逐渐降低。付乾堂等<sup>[13]</sup>发现,拟南芥 AtWRKY25 与 AtWRKY26 在低温胁迫(4 ℃)和高温胁迫(42 ℃)下的反应是一致的;但 AtWRKY33 在低温胁迫下的表达水平是先增加后降低,在 42 ℃ 高温胁迫下表达量却随处理时间的延长而逐渐降低,说明 AtWRKY33 在高温和低温处理后的表达模式是完全不同的,即受高温的抑制而受低温的诱导。本研究中,ChWRKY2 在 4 ℃ 下的表达趋势是和 AtWRKY33 相一致的,自然条件下 2、3 月份气温回升,ChWRKY2 的表达量下降,这也与 AtWRKY33 受高温抑制后的表达情况相符合,因此,推测平榛 ChWRKY2 也是一个受低温诱导而受高温抑制的转录因子。ChWRKY2 在检测的 3 个不同组织中,雄花序中的表达量最高,其次为花芽,最低表达部位为树皮(韧皮部),表明 ChWRKY2 的空间表达具有特异性。平榛的雄花序很少发生冻害,这也可能与 ChWRKY2 在雄花序中具有较高的表达量有关。

根据 Asai<sup>[14]</sup>和 Kim 等<sup>[15]</sup>的研究认为,WRKY 类转录因子是受丝裂原激活蛋白激酶的调节(MAPK),通过植物体内的 MAP 激酶级联系统将外界各种诱导因素的信号传递到细胞内并激活 WRKY 转录因子的活性,WRKY 再通过与功能基因或其它转录因子启动子中的 W-box 元件结合调节其表达<sup>[16]</sup>。目前,对于平榛中 WRKY 转录因子调控的下游功能基因,以及 WRKY 类转录因子之间相互调控方面的研究还没有报道,随着转录组学、酵母杂交、烟草叶片双荧光等实验技术的广泛应用,研究平榛 WRKY 转录因子与相关功能基因的蛋白互作以

及揭示平榛中 WRKY 的调控机理将成为可能。

## 参考文献:

- [1] 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
- [2] Ishiguro S, Nakamura K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 50 upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato, Mol[J]. Gen Genet, 1994, 244(6): 563-571
- [3] Chujo T, Takai R, Akimoto T. Involvement of the elicitor induced gene OsWRKY53 in the expression of defense related genes in rice [J]. Biochemica et Biophysica Acta, 2007, 1769(7-8): 497-505
- [4] 李冉, 娄永根. 植物中逆境反应相关的 WRKY 转录因子研究进展[J]. 生态学报, 2011, 31(11): 3223-3231
- [5] 李秀霞, 牛成功, 邵红, 等. 佳木斯地区榛子引种试验初报[J]. 中国野生植物资源, 2005, 24(6): 72-74
- [6] 吕跃东, 董凤祥, 王贵禧, 等. 平欧杂交榛抗寒性综合评价体系的建立与应用[J]. 林业科学, 2008, 44(9): 31-35
- [7] Rinne P, Welling A, Kaikuranta P. Onset of freezing tolerance in birch (*Betula pubescens* Ehrh.) involves LEA proteins and osmoregulation and is impaired in an ABA-deficient genotype[J]. Plant Cell and Environment, 1998, 21(6): 601-611
- [8] 陈新. 榛子花芽转录组文库的 Solexa 测序及冷调节基因的表达谱分析[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2006
- [9] Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. Plant Molecular Biol Reporter, 1993, 11(2): 113
- [10] 周琳, 王雁, 彭镇华. 牡丹查耳酮合酶基因 Ps-ChS1 的克隆及其组织特异性表达[J]. 园艺学报, 2010, 37(8): 1295-1302
- [11] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcriptional factors[J]. Trends Plant Sci, 2000, 5(5): 199-206
- [12] 范正琪, 李纪元, 田敏, 等. 麻疯树磷酸烯酮式丙酮酸羧化酶 *pepc* 基因全长 cDNA 克隆及序列分析[J]. 林业科学研究, 2010, 23(3): 349-354
- [13] 付乾堂, 余迪求. 拟南芥 AtWRKY25、AtWRKY26 和 AtWRKY33 在非生物胁迫条件下的表达分析[J]. 遗传, 2010, 32(8): 848-856
- [14] Asai T, Tena G, Plotnikova J, et al. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity[J]. Nature, 2002, 415(6875): 977-983
- [15] Kim C Y, Zhang S. Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco[J]. Plant J, 2004, 38(1): 142-151
- [16] 田云, 卢向阳, 彭丽莎, 等. 植物 WRKY 转录因子结构特点及其生物学功能[J]. 遗传, 2006, 28(12): 1607-1612