

# 平榛 *ChWRKY28* 基因克隆及表达模式分析

赵天田, 梁丽松, 马庆华, 王贵禧\*

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

**摘要:** [目的] 研究平榛 *ChWRKY28* 基因序列特征及其在不同非生物胁迫下的表达规律。 [方法] 以平榛为试材, 采用 RACE-PCR 方法进行基因克隆; 利用实时荧光定量 PCR 方法检测基因在不同组织及不同非生物胁迫下的表达模式。 [结果] 表明: 克隆得到的 *WRKY* 基因, 全长 1 342 bp, 基因内部包含 1 个长 963 bp 的完整开放阅读框, 编码 320 个氨基酸残基, 命名为 *ChWRKY28*。构建的系统发育树表明: 该序列与拟南芥 *AtWRKY28* 及杨树 *PtrWRKY93* 的关系最近, 相似性分别为 49% 和 60%。基因表达分析表明: *ChWRKY28* 在雄花序、雌花芽及茎中均有表达, 但在茎部(皮)中的表达量高于雄花序和雌花芽中的表达量, 具有组织表达特异性; 低温、干旱及盐胁迫均能诱导 *ChWRKY28* 基因的表达, 但受诱导程度存在差异。亚细胞定位分析结果表明: *ChWRKY28* 蛋白分布在细胞核内, 是一个核蛋白。 [结论] 推测 *ChWRKY28* 基因可能参与植物响应非生物胁迫的信号转导过程。

**关键词:** 平榛; 转录因子; 克隆; 亚细胞定位; 表达  
中图分类号: S718.46 文献标识码: A

## Cloning and Expression Analysis of *ChWRKY28* from *Corylus heterophylla* Fisch

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

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

**Abstract:** [Objective] To analyze the sequence features and expression rules of *WRKY* gene from *Corylus heterophylla* Fisch. [Method] The gene was cloned by RACE-PCR. Quantitative real-time PCR was used in analyzing gene expression in various tissues and different abiotic stresses, including cold, high salinity and drought. [Result] The cDNA of *WRKY* is 1 342 bp in length, including a complete open reading frame (ORF) of 963 bp encoding a protein of 320 amino acids, designated as *ChWRKY28*. Phylogeny tree results showed *ChWRKY28* was much closer to *AtWRKY28* from *Arabidopsis thaliana* and *PtrWRKY93* from *Populus trichocarpa*, generated 49% and 60% amino acids similarity. Spatial expression analyses demonstrated that the expression level of *ChWRKY28* was higher in stem than that in male anthotaxy and floral buds which indicating tissue-specific expression. *ChWRKY28* was clearly induced by cold, high salinity and drought, but that the expression tendency were evidently different of this gene. The subcellular localization analysis showed that *ChWRKY28* protein was targeted to the nucleus. [Conclusion] This study indicated that *ChWRKY28* gene may be involved in response to abiotic stress signal transduction pathway.

**Keywords:** *Corylus heterophylla* Fisch; transcription factors; clone; subcellular localization; expression

平榛 (*Corylus heterophylla* Fisch.) 为榛科 (Corylaceae) 榛属 (*Corylus* L.) 植物, 广泛分布于我国的华

北、东北地区, 其榛仁富含不饱和脂肪酸、蛋白质、维生素 A、B、E 等, 具有较高的营养价值和经济价

值<sup>[1-2]</sup>。据世界粮农组织的统计数据,目前,我国带壳榛子的年产量约2.3万t(<http://www.fao.org/docrep/003/x4484E/x4484e03.htm>),其中,平榛贡献了超过70%的产量<sup>[3]</sup>。此外,平榛在水土保持和维持生态平衡方面也发挥了重要的作用。平榛是我国榛属植物资源中最有经济价值的一个种,它具有高产、早熟、抗东方枯萎病及抗寒性强等优点<sup>[4]</sup>。目前,在世界范围内(主要是黑海和地中海沿岸)广泛种植的是欧洲榛(*Corylus avellana* L.),但是欧洲榛抗寒性较差,在我国的引种试验中发现:欧洲榛雌花芽、雄花序等易受低温的伤害,造成枯死、抽干等现象,从而影响坚果的产量,造成经济损失<sup>[5]</sup>;而平榛能够忍耐最低-48℃的极端低温<sup>[6]</sup>,抗寒能力远强于欧洲榛。因此,对平榛响应逆境胁迫尤其是低温胁迫的机制进行研究,将对今后培育抗寒性强的榛子新品种具有重要意义。

目前,关于平榛响应逆境胁迫机制的研究才刚刚开始<sup>[7]</sup>,而植物中的转录因子家族在植物抵御外界逆境胁迫上具有重要作用<sup>[8]</sup>,转录因子可以通过激活或抑制目标基因的表达,来感知或转导外部刺激<sup>[9]</sup>。WRKY作为植物中最重要的转录因子家族之一,除参与植物的生长发育、衰老、抗病等一系列生理活动外,还参与植物对环境胁迫的应答反应,如低温、干旱、高盐等非生物胁迫。WRKY蛋白典型的特征是含有保守的WRKY结构域,该结构域一般由60个氨基酸残基组成,在N端含有高度保守的氨基酸序列WRKYGQK,在C端含有C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>或C<sub>2</sub>HC锌指结构<sup>[10-12]</sup>。自从在甘薯(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)中首次克隆得到WRKY转录因子开始<sup>[13]</sup>,陆续在其他植物如拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、玉米(*Zea mays* L.)、葡萄(*Vitis vinifera* L.)中得到了WRKY转录因子。该转录因子可以通过识别靶基因启动子上的特定序列W-box(C/TTGA CC/T)来调控靶标基因的表达,进而调控植物做出应对各种生物和非生物胁迫的变化<sup>[14-15]</sup>。

目前,在其他榛属植物中未见关于WRKY转录因子的报道,本研究根据平榛花芽转录组的测序结果(NCBI SRA数据库,登录号:SRX529300)<sup>[16]</sup>,筛选并克隆得到1个WRKY转录因子,通过构建WRKY-YFP表达载体,对其进行亚细胞定位分析,以确定获得的WRKY是否为核定位转录因子。另外,进一步对该转录因子在自然低温胁迫、不同逆境胁迫及不同组织中的表达特性进行分析。通过上述研究来探讨

平榛WRKY转录因子响应逆境胁迫的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及处理

1.1.1 自然越冬平榛花芽中WRKY基因表达分析材料的处理 用于实验的平榛雌花芽取自河北木兰围场国有林场(41°58' N, 117°40' E),于2011年11月至2012年4月每隔1个月取1次,材料用液氮冻干后,存于-80℃冰箱。

1.1.2 非生物胁迫平榛WRKY基因表达分析材料的处理 参考Wang等<sup>[17]</sup>的方法,将平榛苗植于花盆中(沙子:草炭=1:2(v/v)),放置温室培养2个月(光照时间16h昼/8h夜,光照强度100 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,温度25℃);然后分别进行4℃低温、旱(质量浓度为25%的PEG6000)及盐处理(400 mmol·L<sup>-1</sup>的NaCl),在处理2、8、24 h后采集叶位相同的叶片(完全展开的第4~5片叶),以未处理的做对照,每个处理设3个重复。

1.1.3 平榛不同组织器官中WRKY基因表达分析材料的处理 在1月份分别取平榛的雌花芽、雄花序及茎段,分析WRKY基因在不同组织器官中的表达特性。

### 1.2 方法

1.2.1 平榛WRKY基因的克隆与序列分析 利用CTAB法进行总RNA提取<sup>[18]</sup>,采用SMART™ RACE(Clontech公司,美国)试剂盒进行反转录,得到第一链作为RACE扩增的模板。根据平榛花芽转录组的测序结果<sup>[16]</sup>,获得1个Unigene序列,通过Blast比对分析,推测其可能是1个WRKY基因,利用Primer5设计引物,引物见表1。以反转录得到的cDNA为模板,采用Touch down PCR程序进行扩增,扩增产物进行凝胶回收,连接载体、转化、蓝白斑筛选及菌落PCR鉴定后,送生物公司进行测序。将获得的序列在NCBI数据库进行Blast比对,确定所克隆的基因为WRKY基因。用DNAMAN 6.0和ProtParam(<http://www.expasy.org>)预测编码蛋白的分子量、理论等电点。利用MEGA 5.20软件的最大似然法(Maximum Likelihood)(Bootstrap值为1000)构建系统进化树,用于比对的PtrWRKY(杨树)和AtWRKY(拟南芥)蛋白序列分别从Phytozome v10.2和TAIR 9.0数据库获得。使用软件Euk-mPloc 2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>)进行亚细胞定位预测。

1.2.2 WRKY-YFP 表达载体的构建 首先扩增出 WRKY 基因的编码区序列,去除终止子后,连接 pEarlyGate101,利用 Gateway 克隆系统构建好 35S::ChWRKY28-YFP 重组载体,转化农杆菌,农杆菌离心后,用 10 mmol · L<sup>-1</sup> 的 MgCl<sub>2</sub> 溶液(含 100 μmol · L<sup>-1</sup> 的乙酰丁香酮)重悬,注射烟草下表皮,然后利用 LSM 510 共聚焦激光扫描显微镜观察荧光。烟草植株在短日照条件下(8 h 昼/16 h 夜)培养。

1.2.3 平榛 WRKY 基因的表达分析 提取处理材料的 RNA,以反转录后的 cDNA 为模板,进行实时荧光定量 PCR 分析。用于实时荧光定量 PCR 分析的特异引物 WRKY-F 和 WRKY-R 及内参基因引物 Actin-F 和 Actin-R 见表 1。参照 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Perfect Real Time) 说明书,扩增程序为:95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 20 s,53℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 20 s,共 39 个循环;65℃ 到 95℃ 30 s 结束。反应在 Bio-Rad CFX96 PCR 仪上进行,每个处理设 3 次重复。

表 1 平榛 WRKY 基因克隆及表达分析引物

引物名称	引物序列	引物作用
3'RACE	5'-GGGAGCCACGGTTTGCCTTCATGACC-3'	3'末端扩增
5'RACE	5'-GCATTTCTCTGAGCGTTGCGGGAA-3'	5'末端扩增
WRKY-F	5'-GCTGGTTCATCAGCATACAAT-3'	检测 WRKY
WRKY-R	5'-GGCACTGCCAATGAGTTGT-3'	的表达
Actin-F	5'-TGGTCAAGGCTGGGTTTGC-3'	扩增内标
Actin-R	5'-CTGACCCATCCAACCATGA-3'	

## 2 结果与分析

### 2.1 WRKY 转录因子的克隆与氨基酸序列分析

通过分析平榛花芽转录组测序数据,获得 1 个预测为 WRKY 转录因子的 Unigene 序列,根据序列设计 3' 端特异引物,RACE-PCR 后,得到 3' 端序列,长度为 578 bp;然后根据 3' 端序列设计引物获得 5' 端序列,长度为 846 bp;最后通过扩增,获得 1 条编码区为 1 342 bp 的全长序列(图 1)。Blast 比对发现:该序列与 WRKY 转录因子同源,暂命名为 ChWRKY28。

```

1      ACATGGGGAAGAACAGACTAGCTACAACCCCTTAGAACAAATTAAGCAGATCTTTTGGTT
61     CAATCTTCTCTCCATGCTCTGATGAACA TAGAGATCATCATGTTTAC TACCATGATCTT
1      M S D E H R D H H V Y Y H D L
121    TTCCATGATAATCAAAGCCTGCTTCCAATAATATTGCTGGTTCATCAGCATACAATTTG
16     F H D N Q K P A S N N I A G T S S A Y N L
181    CAGGGATTGTATCCCTCTTCTACATAAGCTTCACTGAGAGCTTGAAGCACCATGGAC
36     Q G F D P S S Y I S F T E S L Q A P M D
241    TACAACCTCATGGCAAGTGCCTTCGGCTTGTGCGCTCCTTCGTCAGAAGTATTTCTTCT
56     Y N S L A S A F G L S P P S S E V F T S S
301    ATAGAAAGCAACCCGAATTATAAGCCGACGACGGCGGAAGTTGGAGATTTAGGTGGCGGT
76     I E S N P N Y K P T T A E V G D L G G G
361    GGTGGTGGAGGTGGTGGTGGTGGTAGTGATATTCGGTGGTGGTACTCCCAACTCTTCC
96     G G G G G G G S D I P V V S T P N S S
421    ATCTCTTCTCTTCAACTGAGATTGGCGCCGAGGAAGATTCCGGCAAGAGTAAGAAAGAT
116    I S S S S T E I G A E E D S G K S K K D
481    AGGCTGTCAAAGACGTAGAAGATGGAGGGGAAAGCTTAAGAAAGTGGGGAAAGGAAAG
136    R L S K D V E D G G E S S K K V G K G K
541    AAGAAAGGAGAGAAAAAGCTAAGGGAGCCACGGTTTGCCTTCATGACCAAGAGTAGGTT
156    K K G E K K L R E P R F A F M T K S E V
601    GATCATTTGGAAAGATGGATACAGATGGAGAAAAATGGACAGAAGGCTGTCAAACACAGC
176    D H L E D G Y R (W R K Y G Q K) A V K N S
661    CCTTATCCAAGGAGCTATTATCGATGCACACACAGAAGTGGCGCGTGAAAAACCGGTA
196    P Y P R S Y Y R [C] T T Q K [C] G V K K R V
721    GAGCGATCATTCCAAGATCCATCAGTTGTGATTACAACGTACGAAGGTCAACACAACCAC
216    E R S F Q D P S V V I T T Y E G Q [H] N [H]
781    CCAGTTCCCGCAACGCTCAGAGGAAATGGCGCCGGAATTTTCCACCTTCCATGTTTCA
236    P V P A T L R G N A A G I F P P S M F T
841    CCGCCGACAGGTGGAGCTACGCCGTTTCTCATCATCAAGACCTTCTCCAATGATGAAC
256    P P T G G A T P F P H H Q D L F Q M M N
901    AGCCAAGGTGGCAGTGCAGGATCCAACATGTATTCCGACGAGAACCAGCAATATCATCC
276    S Q G S A G S N M Y S Q Q N Q H H H
961    CATCATCATCAACTTCTGACTATGGACTTTTACAAGACATAATTCTCGCATGTTTC
296    H H H H Q L P D Y G L L Q D I I P A M F
1021   TTAAACAAGAGCCATGAGATAGAATCCATCCATCTCTATTGTATATACAGTTACTATC
316    F K Q E P *
1081   TTCCTGACTTAATCTAGATCGAAATAACATCATATTTTTCTTCGCTTCTTGTCTTTG
1141   GAAGTGAATTGAAGTACTTGAATCTTTAGTTTGAAGGTAATTAATCTGCTTGAATCTCC
1201   ACCGTCGATGGGAAATGGAATGTGTGGAAGCAGATGAGGTTTGGTAGTGTAGTTAAGTAG
1261   TGGTTTTAGAAGAAAGAGACTGCTTGTACTACCTATATATATATATATATTTTCAGTC
1321   CAAAAA

```

下划线表示起始密码子和终止密码子;虚线表示锌指结构;[C]表示锌指结构的半胱氨酸,

[H]表示锌指结构的组氨酸;斜体表示 ChWRKY28 保守域。

图 1 ChWRKY28 氨基酸序列分析

分析显示:该基因含有1个963 bp的开放阅读框,编码有320个氨基酸,其理论等电点(pI)和分子量分别为7.30和35.06 kDa。该基因的氨基酸序列包含1个WRKY保守域及1个C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>(C-X<sub>4</sub>-C-X<sub>23</sub>-H-X<sub>1</sub>-H)锌指结构域(图1),属于WRKY转录因子家族中的第二类型。利用DNAMAN结合NCBI数据库Blast比对发现:ChWRKY28分别与拟南芥和杨树WRKY家族中的AtWRKY28和PtrWRKY93的相似性较高,序列同源性分别达49%和60%,与PtrWRKY28的相似性也达51%。利用MEGA软件构建包括ChWRKY28及数据库中获得的杨树PtrWRKY(II)和拟南芥AtWRKY(II)氨基酸序列的系统发育树。结果(图2)表明:ChWRKY28被分到第II类型中的IIc亚类,并与杨树的PtrWRKY28、PtrWRKY71、PtrWRKY92和PtrWRKY93以及拟南芥的AtWRKY8、AtWRKY28和AtWRKY71聚类到一个分支。

## 2.2 WRKY-YFP融合蛋白在烟草表皮细胞中的表达分析

利用Euk-mPLOC 2.0软件对ChWRKY28进行亚细胞定位预测,预测结果定位于细胞核。为了验证上述预测结果的准确性,构建35S::ChWRKY28-YFP重组载体,注射烟草下表皮,然后利用共聚焦激

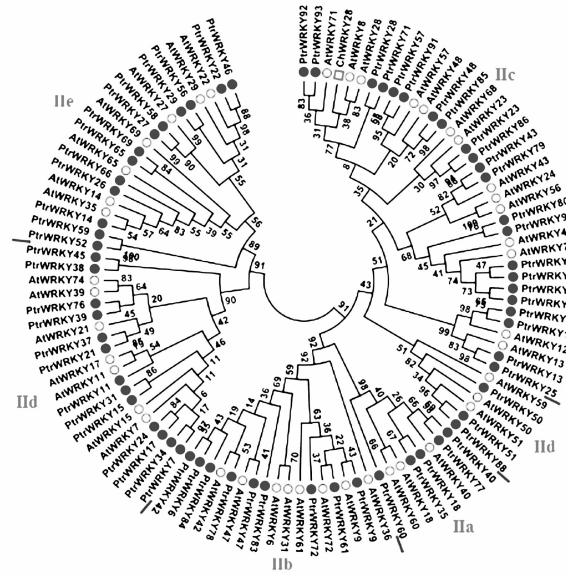


图2 ChWRKY28与杨树及拟南芥WRKY蛋白序列的进化树分析

光扫描显微镜观察荧光。结果表明:35S::ChWRKY28-YFP重组质粒侵染的细胞,只有在细胞核上有荧光信号(图3),说明ChWRKY28是核定位蛋白,与通过软件预测的结果一致,也与ChWRKY28作为一个转录因子的功能相符合。

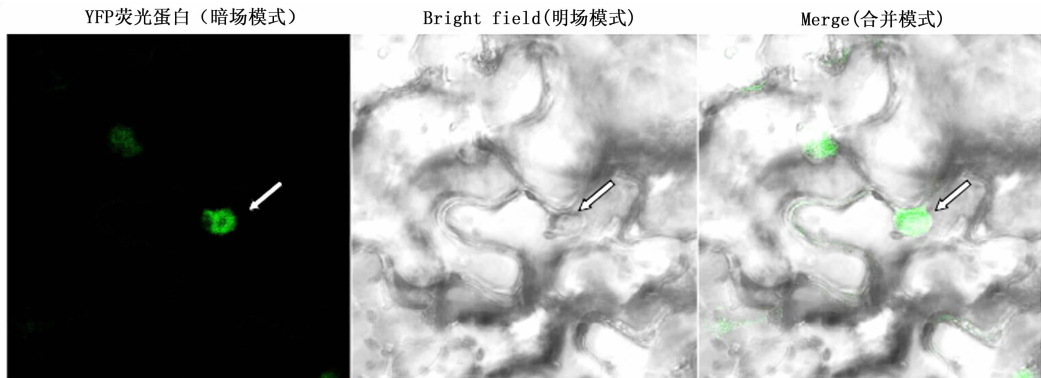


图3 ChWRKY28的亚细胞定位分析(图中箭头所指为细胞核)

## 2.3 ChWRKY28基因在自然条件下与不同组织中的表达分析

平榛具有很强的抗寒特性,能耐冬季-48℃的极端低温。以平榛11月至次年4月每个月的雌花芽为实验材料,检测ChWRKY28基因的表达特性。结果发现:在11月时ChWRKY28高丰度表达,随后从12月开始至次年3月,ChWRKY28的表达量呈逐步下降的趋势,与3月相比,4月略有升高,变化不明显(图4A)。对平榛雌花芽、雄花序及茎部(皮)

不同组织器官中的表达特性进行分析(图4B)发现:虽然在检测的3个平榛组织中均有ChWRKY28的表达,但在茎部(皮)中的表达量分别是雄花序和雌花芽中表达量的2.7倍和3.9倍,存在较大差异。

## 2.4 ChWRKY28基因在非生物胁迫下的表达分析

对平榛进行低温(4℃)、旱(PEG)及盐(NaCl)胁迫处理,分析ChWRKY28基因在上述逆境胁迫下的表达模式。图5A表明:在低温胁迫下,平榛ChWRKY28基因的表达量呈先升高后下降的变化趋

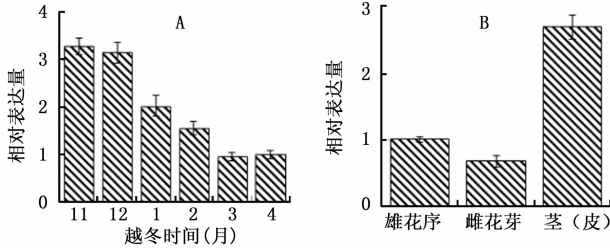


图4 *ChWRKY28* 基因在自然越冬雌花芽中及不同组织中(1月)的表达

势。在低温处理 2 h 后, *ChWRKY28* 基因开始迅速上调表达, 表达量是对照(0 h)的 6.7 倍; 在处理 8 h 后,

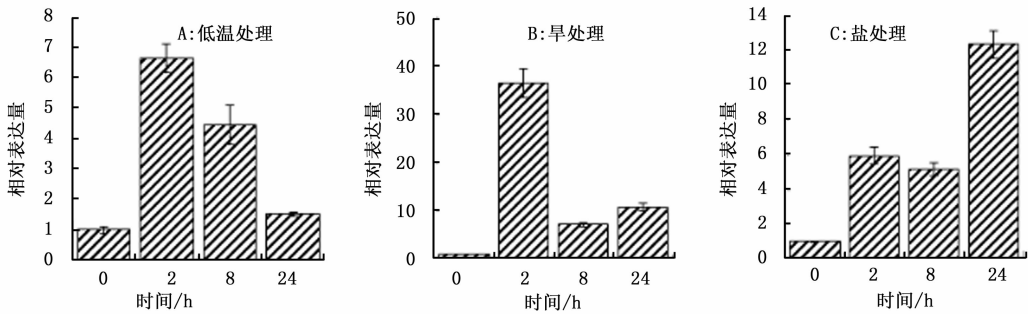


图5 在低温、旱及盐胁迫处理下 *ChWRKY28* 基因叶片中的表达情况

### 3 结论与讨论

WRKY 转录因子参与植物的一系列生长发育过程并响应多种外界胁迫<sup>[15,19]</sup>; 然而, 与响应生物胁迫的研究相比, WRKY 转录因子在响应非生物胁迫方面的研究进展缓慢<sup>[20]</sup>。本研究从平榛的转录组数据中筛选到 1 个 unigene 序列, 经过 RACE 克隆得到 *ChWRKY28* 基因。根据 Eulgem 等<sup>[12]</sup> 的研究, WRKY 转录因子家族通常可分为 3 个类型: 第 I 类型含 2 个 WRKY 结构域, 锌指结构为 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>; 第 II 类型只含 1 个 WRKY 结构域, 锌指结构与第 I 类型相同; 第 III 类型也只含 1 个 WRKY 结构域, 锌指结构为 C<sub>2</sub>HC, 其中, 第 II 类型可以进一步分为 5 个亚类 (IIa-e)。Jiang 等<sup>[21]</sup> 在利用杨树 100 个 WRKY 氨基酸序列构建系统进化树的分析中, 发现 PtrWRKY99 在系统进化树中被分到第 III 类型, 但 PtrWRKY99 的锌指结构却不是 C<sub>2</sub>HC, 而是 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型, 应属于第 II 类型。在本研究中, *ChWRKY28* 只含 1 个 WRKY 结构域, 锌指结构为 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型, 按照结构分类, *ChWRKY28* 应属于第 II 类型。为了进一步确认 *ChWRKY28* 的分类情况, 笔者构建了包括杨树和拟南芥 WRKY 所有第 II 类型在内的系统进化树。通

*ChWRKY28* 基因表达量降低; 在处理 24 h 后, *ChWRKY28* 基因表达量明显下降。图 5B 表明: 平榛 *ChWRKY28* 基因响应旱胁迫诱导强烈, 在 PEG 处理 2 h 后, *ChWRKY28* 基因表达量迅速升高, 是对照(0 h)的 36.4 倍。图 5C 表明: 平榛 *ChWRKY28* 基因在盐胁迫下的表达情况与低温和旱胁迫的不同, 达到最大表达量的时间比前二者晚; 在盐胁迫下, *ChWRKY28* 基因表达量总体呈上升趋势, 并在盐胁迫 24 h 时达到最高表达量, 是对照(0 h)的 12.3 倍。以上结果表明: 平榛 *ChWRKY28* 基因受低温、旱及盐 3 种胁迫的诱导而上调表达。

过系统进化树发现, *ChWRKY28* 与杨树的 PtrWRKY28、PtrWRKY71 及拟南芥的 AtWRKY8、AtWRKY28 等聚类到一个分支, 属于 IIc 亚类, 与其按照结构分类相一致。

本研究中, 平榛 *ChWRKY28* 基因均受低温、盐及旱胁迫的诱导而上调表达, 但响应胁迫的速度及诱导表达的强度存在差异。罗昌国等<sup>[22]</sup> 对 *MhWRKY40b* 基因在几种胁迫下的表达情况进行分析后发现, 在低温和旱处理后, *MhWRKY40b* 基因的表达量呈先上升后下降的趋势。张娜等<sup>[23]</sup> 对 *GhWRKY5* 基因在非生物胁迫下的表达分析后发现, *GhWRKY5* 受 PEG 的诱导强于盐胁迫诱导, 并在 2 h 时表达量急剧升高, 但在 8 h 时表达量开始降低。本研究中, *ChWRKY28* 基因对低温和旱胁迫的响应与上述研究相似, 在低温和旱胁迫处理后, *ChWRKY28* 的表达量呈现先上升后下降的趋势; 但在盐胁迫处理后, *ChWRKY28* 表达量总体呈逐步上升趋势, 并在处理 24 h 后达到最大表达丰度。这表明 *ChWRKY28* 基因对低温及旱胁迫的响应比盐胁迫敏感, 推测 *ChWRKY28* 可能是早期应答低温与旱胁迫信号的转录因子。另外, 检测 *ChWRKY28* 基因在平榛 3 个不同组织器官中的表达情况, 发现其在茎

(皮)中的表达量比在雌花芽和雄花序中的高,存在空间表达上的差异性。*ChWRKY28* 在茎(皮)中的高表达可能有利于提高茎部对外界环境胁迫的耐受力,这也与在自然状况下枝条(茎)的耐寒性强于雄花序和雌花芽一致。

Ling 等<sup>[24]</sup>研究发现,处在同一进化分组中的转录因子大多具有相似的功能。*ChWRKY28* 与拟南芥 WRKY 家族中的 *AtWRKY28* 相似性最高,并且具有相同的锌指结构,同属于 WRKY 家族的 II c 类型。据报道,在拟南芥中超表达 *AtWRKY28* 基因能够增强拟南芥抵御生物胁迫和非生物胁迫的能力,如 Marcel 等<sup>[25]</sup>的研究发现,*AtWRKY28* 可以通过调控 *ICS1* 和 *PBS3* 基因的表达,进而提高由水杨酸介导的植物抵抗生物胁迫的能力。Babitha 等<sup>[26]</sup>将 *At-bHLH17* 和 *AtWRKY28* 共表达达到拟南芥中,发现能提高转基因拟南芥对氧化胁迫和盐胁迫的耐受性。鉴于 *ChWRKY28* 与 *AtWRKY28* 基因所编码的氨基酸序列具有相同的结构类型及较高的相似性,推测 *ChWRKY28* 可能也具有 *AtWRKY28* 所具有的耐受生物胁迫的能力,但这还需要以后进一步的研究证实。

## 参考文献:

- [1] 马庆华,王贵禧,梁维坚,等. 我国榛属植物种质资源的研究、利用与创新[J]. 果树学报,2013,30(1):159-164.
- [2] Mehlenbacher S A. Hazelnuts. Genetic resources in temperate fruit and nut crops[J]. Acta Horticulturae,1991,290:791-838.
- [3] Liu J,Cheng Y,Liu C,et al. Temporal changes of disodium fluorescein transport in hazelnut during fruit development stage[J]. Sci Horticulture Amsterdam,2013,150:348-353.
- [4] Coyne C J, Mehlenbacher S A, Smith D C. Sources of resistance to Eastern Filbert Blight in hazelnut [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science,1998,123(2):253-257.
- [5] 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.
- [6] 彭立新,王明启,梁维坚,等. 榛属(*Corylus* L.)植物抗寒性研究[J]. 吉林林学院学报,1994,10(3):166-170.
- [7] 赵天田,陈新,刘庆忠,等. 平榛 NAC 转录因子的分离及表达特性分析[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(2):265-270.
- [8] 王磊,高晓清,朱冬华,等. 植物 WRKY 转录因子家族基因抗病相关功能的研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(1):80-85.
- [9] Wang H H, Hao J J, Chen X J, et al. Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants[J]. Plant Molecular Biology,2007,65:799-815.
- [10] 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.
- [11] 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.

- [12] Eulgem T, Somssich I E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling [J]. Current Opinion in Plant Biology,2007,10:366-371.
- [13] Ishiguro S, Nakamura K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPFI, that recognizes SP8 sequences in the 50 upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato [J]. Mol Gen Genet,1994,244(6):563-571.
- [14] Seki M, Narusaka M, Ishida J, 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.
- [15] Jiang Y, Deyholos M. Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses [J]. Plant Molecular Biology,2009,69(1-2):91-105.
- [16] Chen X, Zhang J, Liu Q Z, et al. Transcriptome Sequencing and Identification of Cold Tolerance Genes in Hardy *Corylus* Species (*C. heterophylla* Fisch) Floral Buds[J]. PLoS One,2013,9(9):e108604.
- [17] Wang L Q, Wang C, Wang D Y, et al. Molecular characterization and transcript profiling of NAC genes in response to abiotic stress in *Tamarix hispida*[J]. Tree Genetics & Genomes,2014,10(1):157-171.
- [18] 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):113-116.
- [19] Zhang Y, Feng J C. Identification and characterization of the grape WRKY family[J]. Biomed Research International,2014,787680.
- [20] Wang C, Deng P Y, Chen L L, et al. A wheat WRKY transcription factor TaWRKY10 confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic tobacco[J]. PLoS One,2013,8(6):e65120.
- [21] Jiang Y Z, Duan Y J, Yin J, et al. Genome-wide identification and characterization of the *Populus* WRKY transcription factor family and analysis of their expression in response to biotic and abiotic stresses[J]. J Exp Bot,2014,65:6629-6644.
- [22] 罗昌国,渠慎春,张计育,等. 湖北海棠 *MhWRKY40b* 在几种胁迫下的表达分析[J]. 园艺学报,2013,40(1):1-9.
- [23] 张娜,赵佩,沈富富. 陆地棉三个 WRKY 基因的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种,2012,10(2):169-173.
- [24] Ling J, Jiang W J, Zhang Y, et al. Genome-wide analysis of WRKY gene family in *Cucumis sativus* [J]. BMC Genomics,2011,12:471.
- [25] Marcel C, John F, Huub J M. WRKY transcription factors involved in activation of SA biosynthesis genes [J]. BMC Plant Biology,2011,11:89.
- [26] Babitha K C, Ramu S V, Pruthvi V, et al. Co-expression of *At-bHLH17* and *AtWRKY28* confers resistance to abiotic stress in *Arabidopsis*[J]. Transgenic Res,2013,22:327-341.

(责任编辑:徐玉秀)