

番茄与叶霉菌互作过程中 WRKY 转录因子的生物信息学和功能分析

王秋颖¹,薛东齐²,陈秀玲²,李景富²,王傲雪^{1,2*}

(1. 东北农业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学 园艺学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 为了明确含 *Cf-12* 基因的番茄与叶霉菌非亲和互作过程中 WRKY 转录因子所扮演的角色,首先对非亲和互作 4 d 和 8 d 转录组中 WRKY 基因的表达量进行比较分析,然后对相关 WRKY 基因进行系统进化分析和病毒接种的基因沉默验证。结果表明,非亲和互作过程中共富集到 22 个 WRKY 基因,其中 *Solyc07g047960.2* 在接菌后 8 d 时的表达量达到近 20 倍。依据 WRKY 基因 CDS 序列的系统进化树以及表达量分析结果,部分 WRKY 基因的表达量在两时间点差异不大,但 Cluster III 中有 7 个 WRKY 基因呈现明显的上调表达趋势。对 *WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 基因沉默(接种 TRV-*WRKY*)后的番茄植株接种叶霉菌进行鉴定,结果表明,接菌后该基因的表达量相对于接菌前所有提升,且叶片上的过敏性坏死斑点数量明显低于对照组(接种 TRV)。以上结果表明,*WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 基因在含 *Cf-12* 基因的番茄与叶霉菌的非亲和互作过程中呈现明显的上调表达趋势,积极地参与到对叶霉菌的抗性反应过程中。

关键词: 番茄; 叶霉菌; WRKY; 差异表达; 基因沉默; 抗性反应

中图分类号: S436.412.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2017)11-0074-06

Bioinformatics and Functional Analysis of WRKY Transcription Factors in Interaction between Tomato and *Cladosporium fulvum*

WANG Qiuying¹, XUE Dongqi², CHEN Xiuling², LI Jingfu², WANG Aoxue^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
2. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To preliminarily define the role of WRKY transcription factors in the incompatible interaction between *Cf-12* tomato and *Cladosporium fulvum*, we analyzed differential expression of WRKY transcription factors in the transcriptome of 4 d and 8 d time points of incompatible interaction, and then conducted phylogenetic analyses and gene silencing by virus inoculation. The results showed that 22 WRKY genes were enriched in the process of incompatible interaction, and the expression of *Solyc07g047960.2* at 8 days post inoculation increased by nearly 20 times. According to phylogenetic analysis and expression analysis of WRKY CDS, the expression of some WRKY genes was not significantly different at two time points, however, in Cluster III, 7 WRKY genes showed significant up-regulated expression. After identification of *WRKY* gene silenced tomato plants (inoculated by TRV-*WRKY*), the results of *Cladosporium fulvum* inoculation showed that the expression of *WRKY* gene was increased compared with that before inoculation, and the number of hypersensitive necrotic spots on leaf was obviously lower than the control (inoculated by TRV). The conclusion was that the *WRKY* (*Solyc07g047960.2*) gene showed a significantly up-

收稿日期:2017-04-19
基金项目:黑龙江省杰出青年基金项目(JC2015004)
作者简介:王秋颖(1986-),女,黑龙江哈尔滨人,在读博士研究生,研究方向:番茄抗病、抗逆机理。
E-mail:wangqiuying1986@163.com
* 通讯作者:王傲雪(1973-),男,黑龙江哈尔滨人,教授,主要从事番茄抗病、抗逆机理研究。E-mail:axwang@neau.edu.cn

regulated expression during the incompatible interaction between *Cf-12* tomato and *Cladosporium fulvum*, and was actively involved in the resistance response to the tomato leaf mold disease.

Key words: tomato; *Cladosporium fulvum*; WRKY; differential expression; gene silencing; resistance response

番茄为世界上重要的食用果蔬,其植株在生长发育过程中时刻受到生物和非生物因素的影响,其中尤以生物因素中病毒和病原真菌的侵染最为严重。番茄应对病原物的侵染主要表现出病原相关因子激发的抗性(pathogen associated molecular pattern triggered immunity, PTI)^[1]和效应因子激发的免疫(effector triggered immunity, ETI)^[2]。针对番茄与叶霉菌的互作,目前已在智利番茄、秘鲁番茄和多毛番茄等多个野生番茄中发现和克隆出 *Cf-1*、*Cf-2*、*Cf-4*、*Cf-5*、*Cf-9*、*Cf-9DC* 等多个抗性基因^[3], 同时也在叶霉菌中发现了与之对应的效应因子 *Avr1*、*Avr2*、*Avr4*、*Avr5*、*Avr9* 等^[4-6],也证实番茄 *Cf* 抗性基因与叶霉菌的 *Avr* 效应因子符合“gene-for-gene”假说^[7]。在 *Cf-4*、*Cf-9* 介导的下游抗性反应通路中,大量的转录因子(transcription factor, TF)参与其中,调控着靶基因的表达,发挥着重要的作用。根据核心结构域的不同,可将 TF 分为 bHLH、bZIP、MYB、ERF、MADS、Zinc-finger、WRKY 等多个不同的家族^[8]。WRKY 是其中一类重要的 TF 家族^[9],其 N 端含有高度保守的 WRKYGQK 氨基酸序列,并在水稻^[10]、拟南芥^[11-12]、棉花^[13]、烟草^[14]、大麦^[15]、小麦^[16]、豆类^[17]等植物中大量存在。WRKY 转录因子通过识别靶基因启动子区的 W-box 序列,特异性地调控下游基因的表达,并积极参与到植物对病原物的抗性反应中^[9]。

目前,对番茄 *Cf-2*、*Cf-4*、*Cf-5*、*Cf-9* 基因与叶霉菌非亲和互作过程的研究较为成熟,但对于其他抗叶霉病基因的 WRKY 等转录因子的研究则刚刚起步。本研究对 *Cf-12* 基因与叶霉菌非亲和互作的转录组测序结果中的 WRKY 数据进行生物信息学分析,以期发现在非亲和互作过程中特异性表达的 WRKY 基因,同时采用病毒介导的基因沉默方法(virus-induced gene silencing, VIGS)对 WRKY 基因进行沉默验证,从而对 *Cf* 与叶霉菌的非亲和互作认知奠定一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验数据来源

用于生物信息学分析的 WRKY 数据来源于 2016 年东北农业大学园艺学院番茄课题组测定的

Cf-12 基因与叶霉菌非亲和互作的转录组测序结果,其 NCBI 的 SRA 数据库的 RUN 注册号为 SRR4041970、SRR4041973、SRR4041974、SRR4041975、SRR4042017、SRR4042029、SRR4042030、SRR4042031、SRR4042032。通过 iTAK 软件在 PlantTFDB^[18](plant transcription factor database, <http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>)中将被定义在番茄转录因子家族中的 WRKY 基因进行比对鉴定,并通过 ClusterW 进行 WRKY 基因 CDS 序列的多序列比对,利用 MEGA 的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)通过 1 000 次校验构建系统发生树。同时根据这些 WRKY 基因在接种叶霉菌后转录组数据中的 4 d 和 8 d 差异表达量,采用 HemI (Heatmap Illustrator, version 1.0)软件构建热图,进一步分析 WRKY 基因在非亲和互作中扮演的角色。

1.2 WRKY 基因的 VIGS 验证

1.2.1 试验材料 含 *Cf-12* 基因的 CGN7495 番茄种子和叶霉菌由东北农业大学园艺学院番茄课题组提供;分别含 pTRV2-PDS 质粒、pTRV1 质粒、pTRV2 质粒的农杆菌 GV3101 由清华大学的刘玉乐教授馈赠; *BamH* I、*Xba* I 等购于 MBI 公司, DNA 胶回收和纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购于北京康为试剂公司;用于 VIGS 的引物由 Primer Premier 6.0 设计,序列为上游 5'-GCTCTAGACCCTAGTACCTGGAAAG-3',下游 5'-CGCGGATCCTGTCTGTCTCGTCTCGT-3'(下划线为酶切位点),由华大基因公司合成。

1.2.2 VIGS 载体构建 含 *Cf-12* 基因的 CGN7495 番茄材料总 RNA 提取参照 Trizol 法,用 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA,利用 *WRKY*(*Solyc07g047960.2*)特异性引物进行扩增,其反应体系和反应参数见表 1 和表 2。将 PCR 扩增和纯化得到的 *WRKY* 保守序列及 pTRV2 质粒进行 *BamH* I 和 *Xba* I 的双酶切反应,反应体系为:PCR 回收产物(或 pTRV2 质粒)3 μ g, *BamH* I (10 U/ μ L)1 μ L, *Xba* I (10 U/ μ L)2 μ L, 10 \times Buffer 3.5 μ L,加 ddH₂O 至 35 μ L;37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h,65 $^{\circ}$ C 灭活 20 min。立即采用 DNA Clean-up Kit 回收酶切后的 pTRV2 质粒和目标片段,并用 T4 DNA 连接酶进行连接,将连接产物转化大肠杆菌

DH5 α ,提取成功连接并转化的 DH5 α 质粒转化农杆菌 GV3101。

表 1 PCR 反应体系

试剂	体积/ μ L
cDNA	2.0
上游引物 (10 μ mol/L)	1.0
下游引物 (10 μ mol/L)	1.0
2 \times Es Taq MasterMix	10.5
灭菌水	10.5
总体积	25.0

表 2 PCR 反应参数

反应过程	反应温度/ $^{\circ}$ C	反应时间/min	循环数/个
预变性	94	5	
循环反应	94	0.5	35
	58	0.5	
	72	0.6	
延伸	72	10	

1.2.3 农杆菌侵染 农杆菌 GV3101 注射侵染参照史艳梅等^[19]的方法,其中以 pTRV1 & pTRV2 (TRV)为阴性对照,pTRV1 & pTRV2 - *PDS* (TRV - *PDS*)为阳性对照,pTRV1 & pTRV2 - *WRKY* (TRV - *WRKY*)为试验组。将注射接种后的 2~3 叶期番茄植株置于 16 h/8 h (光/暗)、60% 湿度、20~22 $^{\circ}$ C 下进行正常管理。当阳性对照植株新叶出现光漂白症状时,采用引物 (上游 5' - CTGAAACGAGACGAC-CAGACA - 3',下游 5' - CGACCACCATTTATTATCAC-CC - 3') 对 *WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 基因进行荧光定量 (qRT - PCR) 检测,以测定 *WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 基因的沉默效率。

1.2.4 叶霉菌的接种处理和鉴定分级 对于沉默处理的植株,采用喷雾接种法于叶背面接种孢子浓度为 1×10^7 个/mL 的叶霉菌,接种前保持 99% 湿度 24 h,接种后保持 95% 湿度,昼/夜温度 25 $^{\circ}$ C/22 $^{\circ}$ C,每天光照时间 14 h,以 TRV 沉默处理后接种叶霉菌的番茄植株为对照。对接种后各基因沉默植株的症状调查和抗感性鉴定采用孟凡娟等^[20]的方法。

2 结果与分析

2.1 *WRKY* 基因的差异表达分析

根据 *Cf-12* 基因与叶霉菌非亲和互作的转录组测序结果,共显著富集到 60 个转录因子家族,其中 *WRKY* 基因家族含有 22 个 *WRKY* 基因,其表达量见表 3,非亲和互作的过程中,表达量最高的 *Solyc07g047960.2* 在接菌后 8 d 表达量达到近 20 倍,共有 8 个 *WRKY* 基因表达量在 3 倍以上。根据

WRKY 基因在 4 d 和 8 d 时间点的表达量构建热图 (图 1),这 22 个 *WRKY* 基因的表达情况总体呈现出 2 种趋势,即 8 d 大于 4 d 的表达量,以及部分 *WRKY* 基因的表达量在两时间点的差异不明显 (如 *Solyc05g007110.2*、*Solyc07g056280.2*、*Solyc09g066010.2* 和 *Solyc10g084380.1*)。对 22 个 *WRKY* 基因的 CDS 序列构建进化树,结果如图 2 所示,这 22 个 *WRKY* 基因按照进化关系的远近可以分为 3 个 Cluster,其中上调表达量最大的 *Solyc07g047960.2* 基因位于 Cluster III。从 Cluster III 中能够看到,该类群的 8 个 *WRKY* 基因除 *Solyc02g072190.2* 在两时间点的表达量差异不大外,其余 7 个 *WRKY* 基因均呈现 8 d 的表达量明显高于 4 d 的上调表达趋势;而 Cluster I 中的 8 个 *WRKY* 基因,除 *Solyc05g050340.2*、*Solyc04g072070.2* 和 *Solyc02g093050.2* 在 8 d 的表达量明显高于 4 d 外,其余 5 个 *WRKY* 基因在两时间点的表达量差异不大。说明在 *Cf-12* 基因与叶霉菌非亲和互作过程中,这些明显上调表达的 *WRKY* 基因可能发挥着重要的作用。

表 3 非亲和互作过程中差异表达的 *WRKY* 转录因子

基因	4 d 表达量	8 d 表达量
<i>Solyc02g021680.2</i>	3.814 252	8.928 390
<i>Solyc02g032950.2</i>	1.520 768	3.068 854
<i>Solyc02g072190.2</i>	2.141 171	2.053 806
<i>Solyc02g088340.2</i>	0.468 656	0.566 297
<i>Solyc02g093050.2</i>	1.394 956	1.821 176
<i>Solyc04g072070.2</i>	1.942 494	3.965 492
<i>Solyc07g047960.2</i>	8.231 755	19.444 630
<i>Solyc05g012770.2</i>	1.403 958	1.864 941
<i>Solyc05g015850.2</i>	6.758 954	6.635 016
<i>Solyc05g050340.2</i>	1.555 103	2.297 556
<i>Solyc05g053380.2</i>	0.369 309	0.559 240
<i>Solyc06g070990.2</i>	2.554 782	7.289 400
<i>Solyc05g007110.2</i>	1.666 937	1.731 605
<i>Solyc07g051840.2</i>	1.440 940	2.117 703
<i>Solyc07g056280.2</i>	1.405 000	1.559 777
<i>Solyc08g067340.2</i>	2.448 673	3.171 796
<i>Solyc08g067360.2</i>	1.876 533	2.666 228
<i>Solyc08g081610.2</i>	1.627 176	5.130 858
<i>Solyc09g066010.2</i>	0.603 046	0.562 186
<i>Solyc10g009550.2</i>	0.390 799	0.490 152
<i>Solyc10g084380.1</i>	0.058 900	0.040 027
<i>Solyc12g011200.1</i>	4.508 977	4.230 711

2.2 *WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 部分序列的克隆和 TRV2 载体的构建

以番茄 cDNA 为模板,用 *WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 特异性引物扩增 473 bp 的 cDNA 片段,PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图 3 所示。对扩增得到的片段进行切胶回收,并送至华大基因公司测序,比对结

果显示,其为 *WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 基因的特异性片段。将切胶回收产物以及 pTRV2 质粒进行 *Bam*H I、

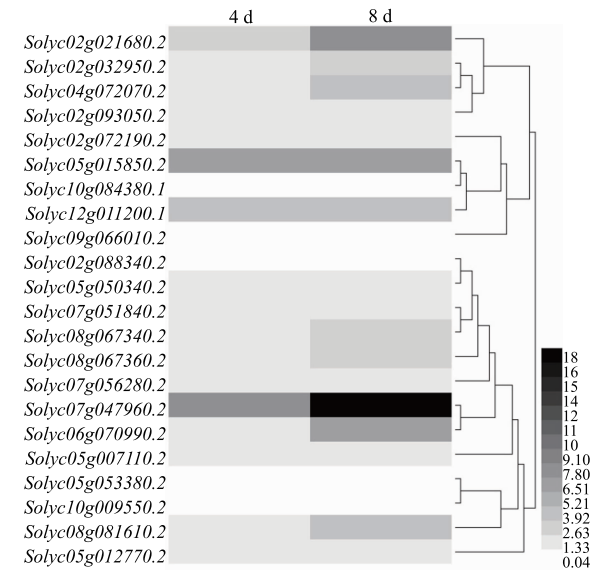


图 1 22 个 *WRKY* 基因热图

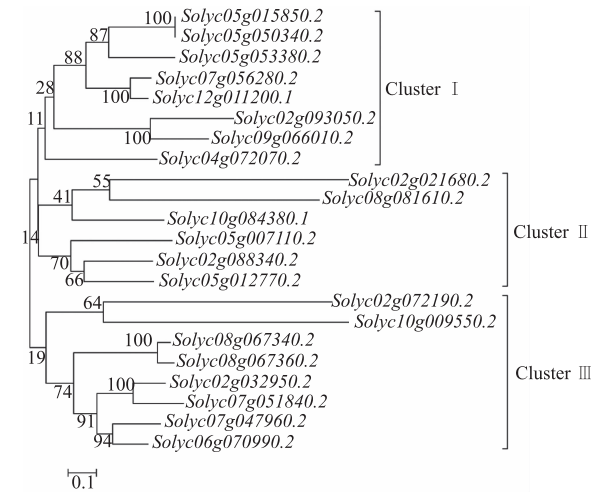
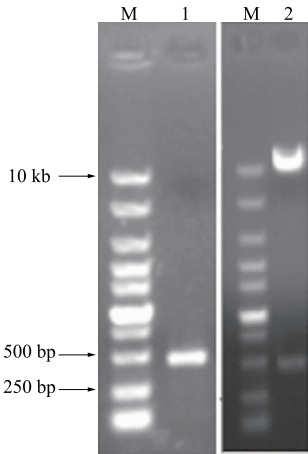


图 2 22 个 *WRKY* 基因 CDS 序列的进化树



M. Marker; 1. PCR 产物; 2. 酶切产物

图 3 *WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 基因片段 PCR 扩增以及 pTRV2 - *WRKY* 质粒酶切的电泳检测

Xba I 双酶切和纯化回收,经 T4 DNA 连接酶连接后转化 DH5 α ,将菌液 PCR 和质粒酶切检测均正确的重组质粒命名为 pTRV2 - *WRKY*,并转化农杆菌 GV3101,用于 VIGS 验证试验,其中 pTRV2 - *WRKY* 质粒的 *Bam*H I、*Xba* I 双酶切电泳结果见图 3。

2.3 *WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 基因的 VIGS 沉默效率

当阳性对照 (TRV - *PDS*) 植株新生叶片出现明显的白化症状时,对部分 pTRV1 & pTRV2 - *WRKY* 处理植株进行总 RNA 提取,并反转录为 cDNA,通过 qRT - PCR 方法检测 *WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 基因的 VIGS 沉默效率,如图 4 所示,TRV - *WRKY* (1) 和 TRV - *WRKY* (2) 的沉默效率分别为 94.69% 和 88.49%,说明本试验所构建的 *WRKY* 沉默载体获得了较好的沉默效果。

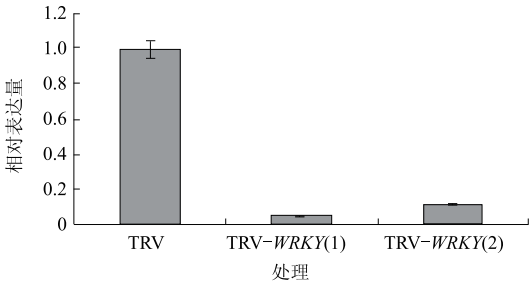


图 4 *WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 基因沉默的 qRT - PCR 分析

2.4 VIGS 植株的症状观察和叶霉菌接种鉴定

试验中,将 TRV - *PDS* 沉默处理的番茄植株作为阳性对照,待阳性对照植株新生叶片出现明显的白化症状时,表明 VIGS 体系已经有效建立,*WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 基因沉默植株的症状如图 5 所示,在形态上与阴性对照 (TRV) 植株并无明显的区别。对试验组 (TRV - *WRKY*) 和对照组 (TRV) 分别喷施叶霉菌孢子悬液,15 d 后植株的发病情况如图 6 所示,*WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 沉默植株接种叶霉菌后的基因表达量测定结果如图 7 所示,与图 4 中接菌前的基因表达量相比,接菌后 *WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 基因的表达量有所提高,2 个沉默植株分别达到对照的 35% 和 40%,呈现在植株上的症状是,部分 *WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 沉默植株丧失了对叶霉菌的抗性,但仍有一定的过敏性坏死症状产生 (图 6),这可能是由于 VIGS 的基因沉默效率并不能达到 100% 的缘故,即使是低表达的 *WRKY* (*Solyc07g047960.2*) 也能够使植株维持一定的抗病性,但其抗病性却远低于对照组,也说明该 *WRKY* 基因在番茄抵御叶霉菌侵染过程中发挥着重要作用。



图 5 VIGS 番茄植株的症状观察



图 6 WRKY(*Soly07g047960.2*) 沉默番茄植株的叶霉病抗性

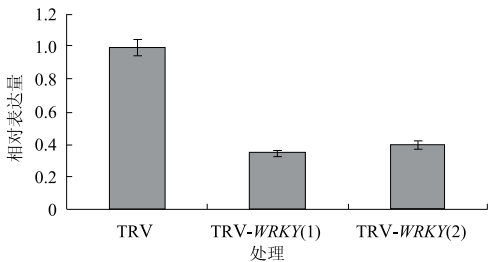


图 7 接菌后 WRKY(*Soly07g047960.2*) 基因的 qRT - PCR 测定

3 结论与讨论

随着植物对病原菌抗性机制研究的深入,转录因子的研究逐渐成为植物基因功能研究的重点之一。WRKY 转录因子能够参与多种生物和非生物胁迫反应过程,能够调控植物的生长发育等一系列生理生化过程。WRKY 转录因子家族成员的数量在不同物种间存在着较大的差异,在植物中分布较广。拟南芥的 WRKY 转录因子家族有 72 个成员,水稻中有 96 个成员,而在黄瓜中有 55 个 WRKY 基因^[12,21-22]。本研究中,在番茄与叶霉菌发生非亲和互作时,有 22 个 WRKY 基因被显著富集到。对这 22 个 WRKY 基因的 CDS 序列进行进化分析显示,其可分为 3 个类群,在 Cluster III 中的 8 个 WRKY 基因除 *Soly02g072190.2* 在两时间点的表达量差异不大外,其余 7 个 WRKY 基因均呈现 8 d 的表达量明显高于 4 d 的上调表达趋势;在其他 2 个类群的 14 个 WRKY 基因,大部分的表达量上调并不是很显著,但由于 WRKY 转录因子也积极调控植物的损伤、衰老、发育及代谢等生物过程,因此它们可能在

番茄与叶霉菌的非亲和互作过程中也发挥着一定的作用,这有待进一步研究。

对于 WRKY 基因 *Soly07g047960.2* 的功能分析,本研究采用的是 VIGS 方法,该方法较常规的转基因方法具有省时省力和效率高的特点,能够快速对基因功能进行初步鉴定。试验中以 *PDS* 基因为阳性对照,能够明显地指示基因沉默的发生过程,对 *Soly07g047960.2* 基因在番茄中进行沉默处理后可以看到,沉默效率在 88.49% ~ 94.69%,不能达到 100%,可能是由于所采用的番茄植株苗龄较大造成的^[23]。用叶霉菌孢子喷施处理后 15 d 检测发现,WRKY(*Soly07g047960.2*) 基因的表达量达到对照的 35% ~ 40%,说明该基因的 VIGS 沉默植株在叶霉菌喷施处理后表达量有了一定程度的上升。但也能够观察到部分 WRKY(*Soly07g047960.2*) 沉默番茄植株叶片上出现过敏性坏死斑点,且叶片的坏死斑点数量明显低于对照,说明该 WRKY 基因在番茄对叶霉菌的抗性过程中发挥着一定作用。结合转录组测序的结果可知,WRKY(*Soly07g047960.2*) 基因在含 *Cf-12* 基因的番茄与叶霉菌的非亲和互作过程中呈现显著的上调表达趋势,其积极地参与到对叶霉菌的抗性反应过程中。

参考文献:

[1] Abramovitch R B, Anderson J C, Martin G B. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006, 7(8): 601-611.

[2] Jones J D G, Dang J L. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444(7117): 323-329.

- [3] Wulff B B H, Thomas C M, Parniske M, *et al.* Genetic variation at the tomato *Cf-4/Cf-9* locus induced by EMS mutagenesis and intralocus recombination [J]. *Genetics*, 2004, 767: 459-470.
- [4] Van der Hoorn R A L, Roth R, De Wit P G. Identification of distinct specificity determinants in resistance protein *Cf-4* allows construction of a *Cf-9* mutant that confers recognition of avirulence protein AVR4 [J]. *Plant Cell*, 2001, 13: 273-285.
- [5] Rivas S, Thomas C M. Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum* [J]. *Annual Review Phytopathol*, 2005, 43: 395-436.
- [6] Seear P J, Dixon M S. Variable leucine-rich repeats of tomato disease resistance genes *Cf-2* and *Cf-5* determine specificity [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2003, 4: 199-202.
- [7] Flor H H. Current status of the gene-for-gene concept [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1971, 9 (1): 275-296.
- [8] Singh K B, Foley R C, Onate-Sanchez L. Transcription factors in plant defense and stress responses [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(5): 430-436.
- [9] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, *et al.* The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5: 199-206.
- [10] Wu X, Shirotu Y, Kishitani S, *et al.* Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing *OsWRKY11* under the control of *HSP101* promoter [J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(1): 21-30.
- [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: 21-37.
- [12] Devaiah B N, Karthikeyan A S, Raghothama K G. WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(4): 1789-1801.
- [13] Xu Y H, Wang J W, Wang S, *et al.* Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)- δ -cadinene synthase-A [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(1): 507-515.
- [14] Hui D Q, Iqbal J, Lehmann K, *et al.* Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*: V. Microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs [J]. *Plant Physiology*, 2003, 131(4): 1877-1893.
- [15] Sun C X, 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 iso1 promoter [J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(9): 2076-2092.
- [16] Niu C F, Wei W, Zhou Q Y, *et al.* Wheat WRKY genes *TaWRKY2* and *TaWRKY19* regulate abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35(6): 1156-1170.
- [17] 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.
- [18] Jin J P, Zhang H, Kong L, *et al.* PlantTFDB 3.0: A portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D1182-D1187.
- [19] 史艳梅, 魏攀, 陈媛媛, 等. 烟草 ζ -胡萝卜素脱氢酶基因的克隆和功能分析 [J]. *烟草科技*, 2015, 48(9): 1-8.
- [20] 孟凡娟, 许向阳, 李景富, 等. 东北三省新的番茄叶霉病菌生理小种分化初报 [J]. *中国蔬菜*, 2006(1): 21-23.
- [21] 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.
- [22] Wang Q S, Wang M H, Zhang X Z, *et al.* WRKY gene family evolution in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetica*, 2011, 139: 973-983.
- [23] 王长春. 番茄 *Cf-4* 和 *Cf-9* 基因介导的过敏反应调控及基因沉默技术的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2005.