

# 梅花 *PmWRKY40* 基因的克隆及其表达分析

彭 婷<sup>1</sup> 王艺琴<sup>1</sup> 陈曼曼<sup>2</sup> 冯蓝萍<sup>2</sup> 包满珠<sup>2</sup> 张俊卫<sup>2</sup>

1. 贵州大学农学院/山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵阳 550025;

2. 华中农业大学园艺林学学院/园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 为揭示梅花 *WRKY* 基因的功能, 采用 RT-PCR 技术从梅花品种‘雪梅’(*Prunus mume* ‘Xuemei’) 中分离得到 1 个 *WRKY* 转录因子基因 *PmWRKY40*。序列分析结果显示, 该基因 cDNA 全长 1 072 bp, 完整开放阅读框 972 bp, 编码 323 个氨基酸, 包含 1 个 *WRKY* 结构和 1 个  $C_2H_2$  型锌指结构。系统进化分析结果显示, 梅花 *PmWRKY40* 蛋白与欧洲甜樱桃亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 分析表明: *PmWRKY40* 基因受低温、氧化胁迫诱导, 但诱导程度存在差异。此外, SA 处理显著提高 *PmWRKY40* 的表达, ABA 处理则抑制该基因表达。推测 *PmWRKY40* 可能在梅花响应低温胁迫过程中起重要作用。

**关键词** 梅花; *WRKY* 转录因子; 非生物胁迫; 低温胁迫; 氧化胁迫; 激素处理; 基因克隆; 表达分析

**中图分类号** S 685.17 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)05-0071-08

梅花(*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)是我国十大传统名花之一, 起源于中国, 距今已有 3 000 多年的引种栽培史和 7 000 多年的应用史, 早春开花, 观赏价值极高。然而, 北方冬季的持续低温限制了梅花的生长发育及其栽培应用。长期以来, 培育抗寒品种是梅花育种研究的重要内容。目前, 关于梅花响应低温胁迫的分子机制研究报道较少, 梅花全基因组测序工作的完成<sup>[1]</sup>, 为深入研究梅花响应低温胁迫的分子机制, 并通过分子育种提高梅花抗寒性提供了良好的条件。

*WRKY* 转录因子是植物中最大的转录因子家族之一, *WRKY* 基因最早是从甘薯中分离出来的<sup>[2]</sup>, 随后陆续在多种植物中被报道<sup>[3]</sup>。*WRKY* 转录因子均包含 1 个或 2 个保守的 *WRKY* 结构域。*WRKY* 结构域约含 60 个氨基酸, 其 N 端核心序列为 *WRKYGQK*, 而在其 C 端则包含锌指结构  $C_{x_4-5}C_{x_{22-23}}H_xH(C_2H_2)$  或  $C_{x_7}C_{x_{23}}H_xC(C_2HC)$ <sup>[4]</sup>。在拟南芥基因组中至少有 74 个 *WRKY* 成员<sup>[5]</sup>, 根据 *WRKY* 结构域的数量和锌指结构类型的不同, 可以将 *WRKY* 蛋白分为 3 类: I 类 *WRKY* 转录因子含 2 个 *WRKY* 结构域和  $C_2H_2$  锌指结构; II 类和 III 类只含 1 个 *WRKY* 结构域, II 类所含锌指结构为  $C_2H_2$ , III 类所含锌指结构为  $C_2HC$ 。II 类

*WRKY* 转录因子因其氨基酸序列的差异又可以进一步将其分为 5 个亚类: II a、II b、II c、II d 和 II e 类<sup>[4]</sup>。研究表明, *WRKY* 转录因子能与下游基因启动子区的顺式作用元件 W-box 元件特异结合<sup>[6]</sup>, 参与植物的生长发育<sup>[7]</sup>、胁迫应答<sup>[4]</sup>和激素信号转导等<sup>[8-10]</sup>过程。

本研究以梅花品种‘雪梅’(*Prunus mume* ‘Xuemei’)叶片为试材, 基于其低温表达谱和梅花全基因组数据, 对梅花 *PmWRKY40* 基因进行克隆和生物信息学分析, 并检测该基因在不同非生物胁迫和激素处理下的表达模式, 为后续分析 *PmWRKY40* 的基因功能, 探索其调控梅花抗寒的分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料及处理

梅花品种‘雪梅’栽种在华中农业大学梅园基地。于 2018 年 3 月采集长势、大小一致的梅花休眠枝, 剪成约 15 cm 长, 每个茎段上保留 4~5 个腋芽, 茎末端浸入培养瓶中, 培养瓶中倒入适量清水, 水深以不没过最底端的芽为准。培养瓶放至培养室驯化 7 d。培养室的培养条件、非生物胁迫(低温、 $H_2O_2$ 、高盐和甘露醇)处理方法参照 Peng 等<sup>[11]</sup>进

收稿日期: 2019-03-10

基金项目: 贵州省科技支撑计划([2018]2302); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目([2017]112)

彭 婷, 博士, 讲师。研究方向: 园林植物遗传育种与生物技术。E-mail: 568539157@qq.com

通信作者: 张俊卫, 博士, 副教授。研究方向: 园林植物遗传育种与生物技术。E-mail: zjw@mail.hzau.edu.cn

行,低温处理时间点略有修改,于 0、1、3、6、12、24、48 h 后分别采集低温处理样品。激素(ABA、MeJA、SA)处理:将培养瓶中的水分别替换成 100  $\mu\text{mol/L}$  ABA 或 100  $\mu\text{mol/L}$  MeJA 或 500  $\mu\text{mol/L}$  SA,于 0、3、6、12、24 h 后分别采样,立即冻存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  液氮中。每个样品设置 3 个生物学重复。

### 1.2 梅花 *PmWRKY40* 基因 cDNA 序列克隆

利用艾德莱(北京)公司 EASY spin 植物 RNA 快速提取试剂盒提取梅花叶片组织的总 RNA,以此为模板,采用 TaKaRa(大连)公司的反转录试剂盒 PrimeScript  $\text{C}^{\circ}$  RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time)反转录成 cDNA 备用,具体操作根据说明书进行。结合笔者所在课题组前期从‘雪梅’低温表达谱中筛出的候选基因(未发表)和梅花基因组上公布的 *PmWRKY40* 基因序列信息,通过 Primer Premier 5.0 软件设计全长特异引物,以

‘雪梅’低温处理 12 h 后反转录成的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,克隆 *PmWRKY40* 基因。扩增条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 59  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 36 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 扩增产物经胶回收试剂盒回收后连接到 pMD18-T 载体上(TaKaRa),转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司)后送往上海生工生物工程股份有限公司测序。全长序列扩增、菌落 PCR 检测和测序所用引物见表 1。

### 1.3 生物信息学分析

利用在线软件 ORF Finder 预测梅花 *PmWRKY40* 基因序列的开放阅读框,使用 NCBI 中的 CDD(Conserved Domain Database)数据库预测蛋白的保守结构域,用 ExPASy 提供的 ProtParam 软件预测蛋白质的分子质量、理论等电点和氨基酸构成,用 SWISS-MODEL 软件预测蛋白质的三级结构,用 PlantCARE 在线软件预测基因启动子区域的

表 1 本研究所用的 PCR 引物

Table 1 PCR primers and their sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
<i>PmWRKY40</i> -ZF	TCGTCAGCAATGGACTCAGAAT	<i>PmWRKY40</i> 基因扩增
<i>PmWRKY40</i> -ZR	CCAGCAAATTAAGAACTCAATCT	Amplification of <i>PmWRKY40</i>
<i>PmEF1<math>\alpha</math></i> -qF	CGGATTCAATGTTAAGAATGTTGC	内参基因 Reference gene
<i>PmEF1<math>\alpha</math></i> -qR	AGAACTGGAGCATATCCGTTACC	
<i>PmWRKY40</i> -qF	CGGACAGCGAAGACTACAGC	qRT-PCR
<i>PmWRKY40</i> -qR	CAATCAGGCGTGTATCAGAGG	
M13	TGAAAACGACGGCCAGT	测序 Sequencing

顺式作用元件,用 Clustalx 1.83 和 Genedoc 软件进行多序列比对,再用 MEGA 5.0 软件 Neighbor-joining 法构建系统发育进化树。

### 1.4 荧光定量 qRT-PCR

以不同非生物胁迫和激素处理的单链 cDNA 为模板,以梅花 *PmEF1 $\alpha$*  为内参基因,采用 ABI 7500 Real-Time PCR System(Applied Biosystems 公司,美国)检测系统在 384 孔板中进行荧光定量 PCR 反应,反应程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,40 个循环;95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  60 s,95  $^{\circ}\text{C}$  15 s;反应体系为 10  $\mu\text{L}$ 。根据扩增的 *PmWRKY40* 序列设计定量引物,引物序列见表 1。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法对基因相对表达量进行计算<sup>[12]</sup>,设置 3 次生物学重复,3 次技术重复。使用 Excel 软件进行数据处理,方差分析采用 SAS9.2 软件,Duncan's

检验法对各处理进行差异显著性检验,Sigmaplot 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 梅花 *PmWRKY40* 基因的克隆

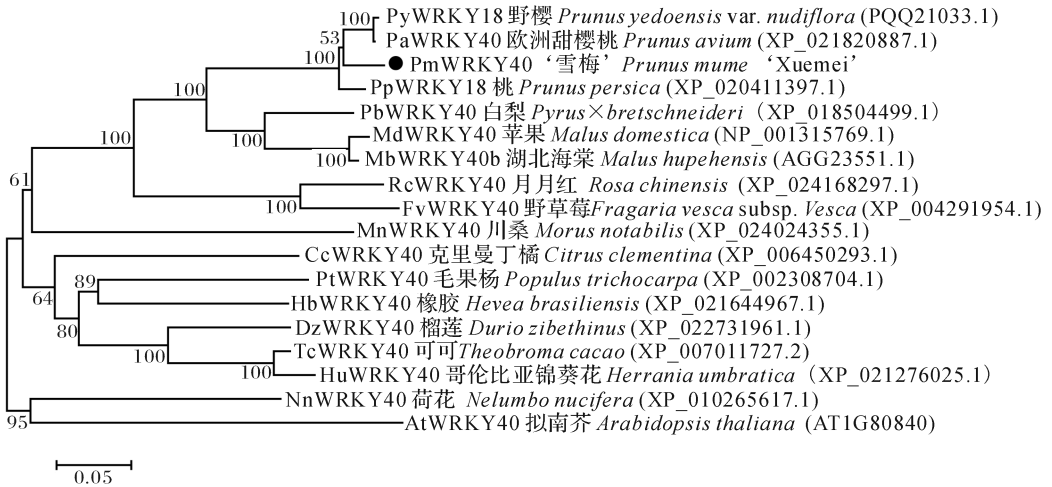
根据已公布的梅花基因组数据库序列信息设计特异引物,以‘雪梅’叶片 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,获得 1 条长度为 1 072 bp 的条带,测序结果(图 1)显示,该基因包含 1 个 972 bp 的完整开放阅读框(open reading frame, ORF),编码 323 个氨基酸。使用 NCBI 中的 CDD 数据库对该蛋白的保守结构域进行预测,结果表明其包含 1 个 WRKY 结构域和 1 个  $\text{C}_2\text{H}_2$  型锌指结构,且 WRKY 结构域其 N 端核心基序 WRKYGQK 前面的序列为 IVK DGYQ,属于 IIa 类 WRKY 转录因子<sup>[4]</sup>,将其命名



## 2.4 梅花 PmWRKY40 蛋白的系统进化树分析

利用 MEGA5 软件将与 PmWRKY40 序列相似度较高的物种,包括欧洲甜樱桃、桃、野樱、湖北海棠、白梨(*Pyrus × bretschneideri*, XP\_018504499.1)、苹果(*Malus domestica*, NP\_001315769.1)、月月红(*Rosa chinensis*, XP\_024168297.1)、野草莓(*Fragaria vesca* subsp. *vesca*, XP\_004291954.1)、川桑(*Morus notabilis*, XP\_024024355.1)、克里曼丁橘(*Citrus clementina*, XP\_006450293.1)、毛果杨(*Populus trichocarpa*, XP\_002308704.1)、橡胶(*Hevea brasiliensis*, XP\_021644967.1)、榴莲(*Durio zibethi-*

*mus*, XP\_022731961.1)、可可(*Theobroma cacao*, XP\_007011727.2)、哥伦比亚锦葵花(*Herrania umbratica*, XP\_021276025.1)、荷花(*Nelumbo nucifera*, XP\_010265617.1)以及拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, AT1G80840)进行系统发育进化树分析(图 3),结果表明 PmWRKY40 与欧洲甜樱桃、桃、野樱的亲缘关系极近,*Prunus* 属的 WRKY 蛋白均聚在同一小分支上。此外,PmWRKY40 与同科物种白梨、苹果、湖北海棠、月月红和草莓聚在一个大分支上,亲缘关系较近,而与荷花、拟南芥的亲缘关系较远。



圆点标记的为“雪梅”。*Prunus mume* ‘Xuemei’ is marked by the dot.

图 3 PmWRKY40 与其他物种 WRKY 氨基酸序列系统进化树分析

Fig.3 The phylogenetic analysis of WRKY40 from *Prunus mume* ‘Xuemei’ and other plants based on amino acid sequences

## 2.5 梅花 PmWRKY40 基因的表达分析

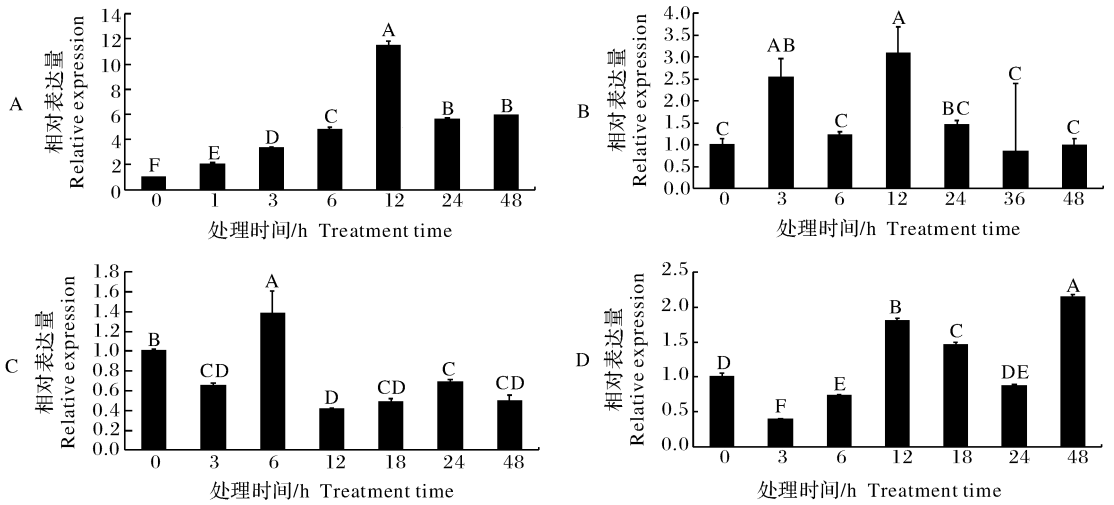
不同非生物胁迫处理后,*PmWRKY40* 的表达模式如图 4 所示,低温和氧化胁迫均能诱导 *PmWRKY40* 基因的表达,但诱导程度不同(图 4A、B)。低温处理 1 h 后,*PmWRKY40* 基因的表达显著上调,之后的表达量持续且稳定地上升,并在处理 12 h 时达到高值,表达量是对照的 12 倍左右,12 h 后表达量虽有所下降,但仍显著高于对照,说明 *PmWRKY40* 基因能够持续且强烈地响应低温胁迫。与低温胁迫相比,*PmWRKY40* 基因受氧化胁迫诱导的程度较低,仅在处理 3、12 h 时表达量明显高于对照。此外,该基因对甘露醇和高盐处理不敏感(图 4C、D),在处理后 *PmWRKY40* 基因的表达量既有上升也有下降,且上升幅度较小,最高值仅为对照的 1.5~2 倍左右,并无明显规律。

由图 5 可见,在 SA、MeJA 和 SA 处理下 *Pm-*

WRKY40 表达水平具有差异。ABA 处理抑制 *PmWRKY40* 基因的表达。*PmWRKY40* 对 MeJA 处理相对不敏感,在 MeJA 处理前期没有显著变化,只在处理 24 h 后表达量上调了 3 倍左右。SA 处理则显著提高 *PmWRKY40* 的表达,表达量呈现“升-降-升”的趋势。处理至 3 h 时,表达量显著上升,3 h 后又显著下降到对照水平,但处理 12 h 后又急剧上升,处理 24 h 时表达量最高,约为对照的 20 倍。

## 3 讨论

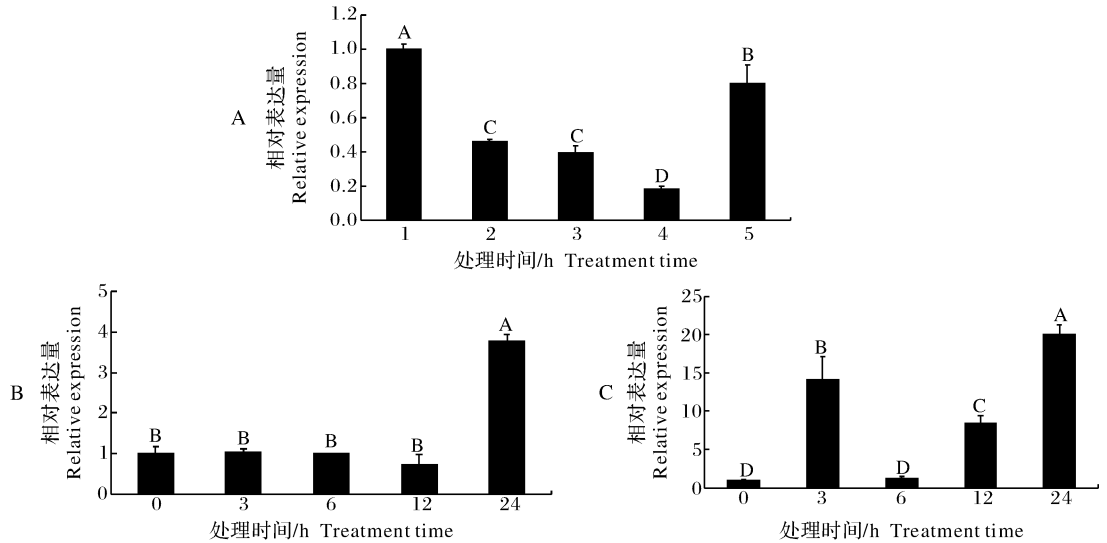
低温是影响植物生长、发育、繁殖以及地理分布的重要环境因子之一。为应对低温等各种非生物胁迫,植物在长期进化过程中形成了复杂而精密的信号调控网络来感知、响应和适应外界环境的变化。转录组和蛋白组研究发现,大量基因参与了植物低温胁迫应答。在这些基因中,转录因子的遗传转化



A: 低温处理; B: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理; C: NaCl 处理; D: 甘露醇处理。柱上不同字母表示差异显著性 ( $P < 0.01$ ), 以 *PmEF1 $\alpha$*  为内参基因进行标准化定量, 将对照 (0 h) 的表达量设为 1, 数据结果表示为 3 次重复实验的平均值  $\pm$  标准误。下同。A: Cold treatment; B: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment; C: NaCl treatment; D: Mannitol treatment. Different letters between columns indicate significant differences at 0.01 level. *PmEF1 $\alpha$*  is used as an internal control for the normalization. The gene expression at 0 h is set at 1.0. Values are the mean  $\pm$  SE. The same as follows.

图 4 *PmWRKY40* 基因在不同非生物胁迫下的表达水平

Fig.4 The expression levels of *PmWRKY40* gene under different abiotic stresses



A: ABA 处理; B: MeJA 处理; C: SA 处理。A: ABA treatment; B: MeJA treatment; C: SA treatment.

图 5 *PmWRKY40* 基因在不同激素处理下的表达水平

Fig.5 The expression levels of *PmWRKY40* gene under different hormone treatments

被认为是一种更有效提高植物抗性的途径。研究表明, WRKY 转录因子因其在植物响应逆境胁迫和激素信号转导过程中扮演着重要角色而受到越来越多的关注<sup>[13]</sup>。Zou 等<sup>[14]</sup>对拟南芥的研究证实低温诱导了野生型拟南芥 *WRKY34* 表达。Zhang 等<sup>[15]</sup>在拟南芥中超量表达黄瓜 *CsWRKY46* 提高了拟南芥植株的抗寒性。与野生型植株相比, 转基因植株中

*ABI*、*RD29A* 和 *COR47* 表达量都高于野生型, 这表明 *CsWRKY46* 通过 ABA 依赖型的方式正向调控植物的低温信号通路。Yang 等<sup>[16]</sup>对核桃的研究也表明, 将 *JrWRKY2* 和 *JrWRKY7* 在核桃中瞬时超量表达, 提高了转化植株对低温、高盐、渗透胁迫的抗性, 提高了转化植株对 ABA 的敏感性。这些研究都说明 WRKY 类基因是多种信号通路上的重要结点。

近年来,对植物 WRKY 类基因的研究为阐述该基因家族的功能与进化奠定了良好的基础,涉及的物种有水稻<sup>[17]</sup>、拟南芥<sup>[14]</sup>、菊花<sup>[18]</sup>、核桃<sup>[16]</sup>、向日葵<sup>[19]</sup>、番茄<sup>[20]</sup>、黄瓜<sup>[15]</sup>、小麦<sup>[21]</sup>和大豆<sup>[22]</sup>等。然而,目前对 WRKY 类基因的研究主要集中在草本植物上,而对木本植物尤其是木本花卉的研究非常有限,在木本花卉梅花中尚未见报道。

本研究以梅花品种‘雪梅’为材料,克隆获得 1 个 WRKY 转录因子基因 *PmWRKY40*,氨基酸序列比对发现 *PmWRKY40* 与同属植物欧洲甜樱桃、野樱和桃的同源性很高,均具有典型的 WRKY 保守结构域,即 1 个保守的 WRKYGQK 基序和 1 个 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指结构。系统进化树分析显示 *PmWRKY40* 具有明显的种属特异性,与同属植物均聚在同一个小分支上,亲缘关系也很近,但其抗寒性却低于欧洲甜樱桃和桃,初步推测 WRKY 转录因子在序列上的差异并不是导致三者抗寒性差异的主要原因。此外,*PmWRKY40* 与同科植物聚在一个大分支上,而其他物种均聚在其他分支上,这与植物系统分类学的进化趋势是一致的,说明物种间的进化要早于 WRKY 基因序列复制事件的发生。

本研究利用实时荧光 qRT-PCR 对 *PmWRKY40* 基因在非生物胁迫和激素处理下的表达情况进行了检测,结果表明该基因受低温、氧化胁迫诱导,但更易受低温诱导。罗昌国等<sup>[23]</sup>对湖北海棠 *MhWRKY40b* 基因、赵天田等<sup>[24]</sup>对平榛 *ChWRKY28* 基因在低温胁迫下的表达情况进行分析发现,在低温处理后,*MhWRKY40b* 和 *ChWRKY28* 的表达量呈现先升后降的趋势,与本研究 *PmWRKY40* 对低温的响应模式一致。此外,SA 处理显著提高 *PmWRKY40* 的表达,最高表达量上调了约 20 倍,类似的研究在拟南芥<sup>[25]</sup>和 水稻中<sup>[10]</sup>也有报道。Hu 等<sup>[25]</sup>用 SA 喷施拟南芥植株后,检测拟南芥 WRKY46 基因的表达发现,SA 处理显著提高了该基因的表达。Ramamoorthy 等<sup>[10]</sup>对水稻 WRKY 基因家族在各种非生物胁迫和激素处理下的表达水平进行分析发现,水稻中有 28 个 WRKY 基因受到 SA 强烈诱导。进一步研究表明,ABA 处理后有 10 个水稻 WRKY 基因表达上调,6 个下调。我们的研究也发现,ABA 处理可以抑制 *PmWRKY40* 基因表达,通过 PlantCARE 在线软件预测 *PmWRKY40* 基因启动子区域的顺式作用元

件,在该基因启动子上找到 3 个 ABA 响应元件 ABRE (ABA-responsive element),推测 *PmWRKY40* 基因可能是通过 ABA 调控低温诱导的相关功能基因表达,从而参与梅花低温胁迫应答,这一推论需要进一步的实验来验证。这些结果表明梅花 *PmWRKY40* 对各种非生物胁迫和激素处理的响应程度不同,我们从‘雪梅’表达谱中发现梅花基因组上至少有 33 个 WRKY 基因,推测可能是因为 WRKY 基因功能的分化导致某个或某些 WRKY 基因特异响应某种或某几种胁迫,而对其他胁迫的响应程度较低或不响应。WRKY 基因有偏向性地响应某类或某几类胁迫的报道也出现在水稻<sup>[10]</sup>、葡萄<sup>[26]</sup>和杨树<sup>[27]</sup>等植物中。如在水稻中,有 9 个 WRKY 特异响应低温胁迫,4 个 WRKY 特异响应干旱胁迫,9 个 WRKY 特异响应高盐胁迫。此外,还发现水稻种有 17 个 WRKY 基因特异响应 2 种胁迫,2 个 WRKY 基因同时响应 3 种胁迫<sup>[10]</sup>。在葡萄中,*VvWRKY21*、39 和 48 中主要响应病原菌胁迫,*VvWRKY03*、06、08、28 和 55 对非生物胁迫和病原体侵染都有响应<sup>[26]</sup>。在杨树中,*PtrWRKY75* 和 *PtrWRKY80* 能特异响应盐胁迫,对低温和机械伤害不响应。而 *PtrWRKY61* 和 *PtrWRKY88* 则特异响应盐胁迫和机械伤害,对低温胁迫不响应<sup>[27]</sup>。

本研究通过对梅花 *PmWRKY40* 基因进行克隆和生物信息学分析,并对其在各种非生物胁迫和激素处理下的表达水平进行检测,结果表明 *PmWRKY40* 基因受低温、氧化胁迫诱导,但受低温诱导程度明显高于氧化胁迫,SA 处理显著提高 *PmWRKY40* 基因的表达,推测该基因在梅花响应低温胁迫过程中发挥重要作用,但其在响应低温胁迫中的具体功能和调控机制还有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] ZHANG Q, CHEN W, SUN L, et al. The genome of *Prunus mume*[J]. Nature communications, 2012, 3(1): 1-8.
- [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 genetics and genomics, 1994, 244: 563-571.
- [3] 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.
- [4] RUSHTON P J, SOMSSICH I E, RINGLER P, et al. WRKY transcription factors[J]. Trends in plant science, 2010, 15(5): 247-258.
- [5] LI S, FU Q, CHEN L, et al. *Arabidopsis thaliana* WRKY25, WRKY26, and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance[J]. Planta, 2011, 233(6): 1237-1252.
- [6] CIOLKOWSKI I, WANKE D, BIRKENBIHL R P, et al. Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function[J]. Plant molecular biology, 2008, 68(1/2): 81-92.
- [7] LI W, WANG H, YU D. *Arabidopsis* WRKY transcription factors WRKY12 and WRKY13 oppositely regulate flowering under short-day conditions[J]. Molecular plant, 2016, 9(11): 1492-1503.
- [8] RUSHTON D L, TRIPATHI P, RABARA R C, et al. WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling[J]. Plant biotechnology journal, 2012, 10(1): 2-11.
- [9] WANG D, AMORNSIRIPANITICH N, DONG X. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants[J/OL]. PLoS pathogens, 2006, 2(11): e123 [2019-03-10]. <http://www.doc88.com/p-9052357042926.html>. doi: 10.1371/journal.ppat.0020123.
- [10] 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 and cell physiology, 2008, 49(6): 865-879.
- [11] PENG T, GUO C, YANG J, et al. Overexpression of a Mei (*Prunus mume*) CBF gene confers tolerance to freezing and oxidative stress in *Arabidopsis*[J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2016, 126(3): 373-385.
- [12] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] ERPEN L, DEVI H S, GROSSER J W, et al. Potential use of the DREB/ERF, MYB, NAC and WRKY transcription factors to improve abiotic and biotic stress in transgenic plants[J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2017, 132(1): 1-25.
- [14] ZOU C, JIANG W, YU D. Male gametophyte-specific WRKY34 transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in *Arabidopsis*[J]. Journal of experimental botany, 2010, 61(14): 3901-3914.
- [15] ZHANG Y, YU H, YANG X, et al. *CsWRKY46*, a WRKY transcription factor from cucumber, confers cold resistance in transgenic-plant by regulating a set of cold-stress responsive genes in an ABA-dependent manner[J]. Plant physiology and biochemistry, 2016, 108: 478-487.
- [16] YANG G, ZHANG W, LIU Z, et al. Both JrWRKY2 and JrWRKY7 of *Juglans regia* mediate responses to abiotic stresses and abscisic acid through formation of homodimers and interaction[J]. Plant biology, 2017, 19(2): 268-278.
- [17] WU X, SHIROTO 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.
- [18] FAN Q Q, SONG A P, JIANG J F, et al. *CmWRKY1* enhances the dehydration tolerance of chrysanthemum through the regulation of aba-associated genes[J/OL]. PLoS One, 2016, 11(3): e0150572 [2019-03-10]. <http://www.doc88.com/p-1738985788473.html>. doi: 10.1371/journal.pone.0150572.
- [19] RAINERI J, RIBICHICH K F, CHAN R L. The sunflower transcription factor HaWRKY76 confers drought and flood tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants without yield penalty[J]. Plant cell reports, 2015, 34(12): 2065-2080.
- [20] LIU B, HONG Y B, ZHANG Y F, et al. Tomato WRKY transcriptional factor SIDRW1 is required for disease resistance against *Botrytis cinerea* and tolerance to oxidative stress[J]. Plant science, 2014, 227: 145-156.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 赵天田, 梁丽松, 马庆华, 等. 平榛 *ChWRKY28* 基因克隆及表达模式分析[J]. 林业科学研究, 2016, 29(2): 250-255.
- [25] HU Y, DONG Q, YU D. *Arabidopsis* WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae* [J]. Plant science, 2012, 185/186: 288-297.
- [26] WANG L, ZHU W, FANG L, et al. Genome-wide identification of WRKY family genes and their response to cold stress in *Vitis vinifera* [J]. BMC plant biology, 2014, 14: 103-116.
- [27] JIANG Y, DUAN Y, 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]. Journal of experimental botany, 2014, 65(22): 6629-6644.

## Cloning and expression analyses of *PmWRKY40* gene in *Prunus mume*

PENG Ting<sup>1</sup> WANG Yiqin<sup>1</sup> CHEN Manman<sup>2</sup>  
FENG Lanping<sup>2</sup> BAO Manzhu<sup>2</sup> ZHANG Junwei<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of Germplasm Innovation on Protection and Conservation of Mountain Plant Resources, Ministry of Education/College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education/College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** WRKY transcription factor plays a vital role in response to cold stress in plants. To reveal the function of WRKY gene in *Prunus mume*, the *PmWRKY40* gene was cloned from *P. mume* 'Xuemei' by RT-PCR. The full-length cDNA sequence of *PmWRKY40* was 1 072 bp, containing a complete open reading frame (ORF) of 972 bp encoding 323 amino acids. The deduced amino acid sequence alignment of *PmWRKY40* contained a conserved WRKY domain and C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc-finger structure. The results of phylogenetic analyses showed that the *PmWRKY40* was most closely related to WRKY protein from *P. avium*. The results of quantitative PCR showed that *PmWRKY40* was induced by cold and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresses, but the induction levels of the gene expression were different between cold and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. Meanwhile, *PmWRKY40* was significantly triggered by SA treatment and its expression was inhibited by ABA. It is indicated that *PmWRKY40* from *P. mume* may play a key role in response to cold stress.

**Keywords** *Prunus mume*; WRKY transcription factor; abiotic stresses; cold stress; oxidation stress; hormone treatments; gene cloning; expression analyses

(责任编辑:张志钰)