

文章编号: 1674-7054(2017)01-0014-08

## 木薯 25 个 WRKY 家族转录因子 在生物胁迫下的表达分析

李 可 熊 茜 肖晓蓉 李玉敏 牛晓磊 李春霞 陈银华

(海南大学 海南省热带生物资源利用重点实验室/热带农林学院 海口 570228)

**摘 要:** 根据拟南芥和水稻的 WRKY 基因和木薯基因组序列,利用生物信息学方法预测木薯 MeWRKY 转录因子家族成员,并对其进行了系统进化关系和保守结构域的分析。通过病原菌接种处理,分析不同 MeWRKY 转录因子的表达差异。结果显示,木薯共编码 25 个与抗病相关 WRKY 蛋白,在病原菌胁迫条件下,其中 16 个 MeWRKY 基因的表达受到显著影响,表明这些 WRKY 蛋白可能参与木薯的防御应答反应。

**关键词:** 木薯; WRKY 转录因子; 表达模式

中图分类号: S 533

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.2017.01.003

转录因子,又称反式作用因子,是一类能与真核基因启动子区域中的顺式作用元件特异性结合,对转录具有激活或抑制作用的调节蛋白。WRKY 转录因子是植物中最大的转录调控因子家族之一,参与许多种植物生长发育的调节<sup>[1]</sup>。WRKY 转录因子的典型特征是其 DNA 结合结构域含有至少 1 个 WRKY 结构域。WRKY 结构域是 1 段由约 60 个氨基酸残基组成的多肽序列,N 末端具有高度保守的 WRKYGQK 核心序列<sup>[2]</sup>。在 WRKYGQK 核心序列后是 1 个非典型的锌指结构<sup>[1]</sup>。根据 WRKY 结构域的数量及锌指结构的特征,WRKY 蛋白质可分为 3 类: I 类含有 2 个 WRKY 结构域,其锌指结构是 C2H2; II 类有 1 个 WRKY 结构域,锌指结构与 I 类相同; III 类也是有 1 个 WRKY 结构域,但锌指结构为 C2HC<sup>[2-3]</sup>。WRKY 蛋白特异地结合靶基因启动子区域的特异序列 (T) TGACC(A/T) (W 盒) 来激活或抑制其表达<sup>[2,4-5]</sup>。同时,W 盒或类 W 盒的侧翼序列也影响 WRKY 蛋白的结合<sup>[6]</sup>。在压力诱导型启动子中 W 盒有集群现象,在某些情况下,多个 W 盒似乎有转录协同作用<sup>[7]</sup>。1994 年,Ishiguro 首次从甘薯中克隆出 1 个 WRKY 转录因子并将其命名为 SPF1<sup>[8]</sup>。到目前为止,全基因组分析已经发现大量的 WRKY 家族成员,相当数量的基因已被报道。拟南芥 WRKY 基因家族包含 72 个<sup>[5]</sup>; 粳稻和籼稻分别为 98 和 102 个<sup>[9]</sup>,番茄为 81 个<sup>[10]</sup>,黄瓜为 55 个<sup>[11]</sup>,杨树为 104 个<sup>[12]</sup>,苹果为 116 个<sup>[13]</sup>,棉花为 116 个<sup>[14]</sup>和橡胶树为 81 个<sup>[15]</sup>。在拟南芥中,WRKY 基因对病原菌和水杨酸等胁迫都有不同程度的响应<sup>[16]</sup>。有研究表明,WRKY 转录因子是植物免疫系统中许多网络的核心组成部分,包括 PTI 基础防御以及 ETI 系统获得性抗性<sup>[19]</sup>。最新研究结果表明,AtWRKY33 作为蛋白激酶 MAPK3/6 的靶蛋白,直接调控植物抗毒素 camalexin 的合成<sup>[20]</sup>。AtWRKY22 和 AtWRKY29 也位于 MAPK 的下游介导细菌和真菌抗病反应<sup>[21]</sup>。然而对于木薯转录因子 WRKY 还未被系统研究。木薯属于大戟科植物中重要的经济作物<sup>[22]</sup>,同时也是块茎发育植物<sup>[23]</sup>。在生产上,病害是限制木薯产量提高的重要制约因素之一,尤其是木薯细菌性枯萎病(cassava bacterial blight,CBB)。CBB 是由地毯草黄单胞菌木薯萎蔫致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*, Xam) 引起的

收稿日期: 2016-12-07

修回日期: 2017-01-29

基金项目: 国家自然科学基金(31260345, 31560497)

作者简介: 李可(1993-),女,海南大学农学院 2014 级硕士研究生。E-mail: 18976325180@163.com

通信作者: 李春霞(1980-),女,副教授,研究方向: 植物病原菌致病分子机理。E-mail: chun\_xia\_li@126.com

细菌性病害 最早在巴西被发现 ,之后通过块根等繁殖体在世界范围内传播 给多个国家的木薯生产带来了毁灭性打击。基于 WRKY 转录因子对其他植物抗病途径的重要调控作用 ,笔者对木薯 WRKY 家族进行了系统生物学分析 根据 blastP 分析获得了 25 个 WRKY 转录因子序列 ,并对这 25 个基因进行全面的生物信息学分析。采用 RT-PCR 技术从木薯中克隆出 WRKY 家族 25 个成员 ,并用荧光定量 PCR 技术检测 WRKY 转录因子在不同生物胁迫下的表达模式 ,旨在为木薯响应病原菌的分子调控网络解析奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

1.1 材料 以木薯华南 8 号 (SC8) 为实验材料 ,采自海南大学重点实验室组培室。分别用  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 flag22 针刺处理和  $OD_{600}$  为 0.6 ~ 0.8 的黄单胞菌 *Xam* 剪叶接种  $0.25, 0.5, 1, 2, 4 \text{ h}$  取样 ,置于液氮速冻后于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。

1.2 木薯 WRKY 家族基因序列分析及系统进化树构建 利用 DNAMAN 对木薯和部分功能已知的拟南芥的 WRKY 蛋白序列进行氨基酸序列多重比对后 ,利用 MEGA 6.0 软件采用邻接法 (neighbor joining ,NJ) 构建系统进化树 ,对构建的进化树进行自检 ,校验参数 bootstrap 值设为 1 000。拟南芥 WRKY 蛋白序列来自于拟南芥数据库 (<http://www.arabidopsis.org>)。木薯的 WRKY 蛋白序列下载自 Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)。

1.3 木薯 WRKY 家族基因序列结构分析 利用拟南芥 WRKY 蛋白序列 (<http://www.arabidopsis.org>) 搜索木薯同源 WRKY 序列 ,通过多序列比对并对 25 个 MeWRKY 家族基因蛋白保守结构域进行分析。

1.4 木薯 WRKY 转录因子的表达分析 利用 MeV 软件对得到的 WRKY 转录因子基因的表达数据进行聚类分析。更加直观地反映这 25 个 WRKY 基因在不同处理下的表达量变化。每个小方格表示不同基因在不同处理时间下的基因表达量 ,其颜色表示该基因表达量大小 ,表达量从绿到红逐渐增加。

1.5 总 RNA 提取及 cDNA 合成 用 TRIzol (Invitrogen ,USA) 试剂盒并按其说明提取总 RNA。使用 oligo (dT) 引物和 PremixScript (TaKaRa ,Japan) 逆转录试剂盒进行逆转录。

1.6 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 的引物序列如表 1 所示。采用 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa ,Japan) 在 Rotor gene Q (Qiagen ,Shanghai ,China) qRT-PCR 仪运行 ,PCR 条件为  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  1 min 变性 ,然后  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  10 s  $54 \text{ }^\circ\text{C}$  15 s  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s 进行 45 个循环。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算相对表达量。所有实验重复 3 次以上。

表 1 qRT-PCR 的引物序列  
Tab. 1 Primer sequences used in qRT-PCR

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
<i>MeWRKY1</i>	5'-GCTGCCCTGTGAAGAAGAAGG-3'	5'-GTGTCCGAATGGGAATCGAAC-3'
<i>MeWRKY3</i>	5'-CCCTTTCAAGTCCCACACACG-3'	5'-GCTTGGATCTTTGGCGAGGG-3'
<i>MeWRKY4</i>	5'-TCTCTTTCCAGCCACCGACA-3'	5'-CCATCCTTGTGCTGTGCGG-3'
<i>MeWRKY6</i>	5'-CGGGAGTTGAAGGACCACGA-3'	5'-TGGCCGTACTTTCTCCAGCT-3'
<i>MeWRKY7</i>	5'-GGAGCACCTGATTGCCTCA-3'	5'-CCGTCTGAATCGGGCATGAC-3'
<i>MeWRKY8</i>	5'-CGGTCTCACAATTTCCGGCG-3'	5'-AGCATCCCCTCCGATCCTTC-3'
<i>MeWRKY9</i>	5'-TCGTCTGTGTTGGTGGTT-3'	5'-TCCCTTCTTCTTCTTCCCCA-3'
<i>MeWRKY10</i>	5'-CCAGAGCTGTCCGTGAACCA-3'	5'-GCCATACTTCTCCAGCGGT-3'
<i>MeWRKY11</i>	5'-CAACCCCAACATCAGCCAGC-3'	5'-GGTGAGGAACAATCGGAGGCT-3'
<i>MeWRKY13</i>	5'-GGGCAGAAACAGGTGAAAGG-3'	5'-GGAGTTGATGGTTGTGCTG-3'
<i>MeWRKY16</i>	5'-GGTCAATCAAGTTCTCTGCG-3'	5'-TCTGCCATACTTCTCCAC-3'
<i>MeWRKY17</i>	5'-TGCTACTCTTTTGCCATGC-3'	5'-CAGCATTTGTGTTCCGTCA-3'

续表 1 Continued Tab. 1

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
MeWRKY18	5'-TAGAGTGTCTGTGCGAGCAA-3'	5'-TATGCACGAGGACAAGGGTT-3'
MeWRKY19	5'-TCAAGCGACTGTGGTGATCA-3'	5'-TCTCTGCACTGAAAGGCTCT-3'
MeWRKY20	5'-TTGGAGGAGGTGCTAACAGT-3'	5'-TGGGCTCTCTTTCTTGGGTT-3'
MeWRKY21	5'-TCCTGACTCTCCTCTTCCA-3'	5'-TCCTTGATTGGCACCGAGAT-3'
MeWRKY22	5'-AGGAAGCCACAATCATCCCA-3'	5'-TTTCTAAGCCGACTCTGCA-3'
MeWRKY23	5'-TGCCGCATTAGATGTCAACG-3'	5'-GTCGAAGCTTGTTCCTCG-3'
MeWRKY24	5'-ATTTCTCAGCGTCCAGTGA-3'	5'-TCTCGGCTCTCTGTCTCT-3'
MeWRKY25	5'-CGATGGAGAAAATATGGGAGA-3'	5'-GCCTTGGACTTGCTTCTTCA-3'
MeWRKY26	5'-GCTTCTTCTTCTCGCCGAG-3'	5'-CTGGTCCAGCGTTGTCAATC-3'
MeWRKY27	5'-TCTCGTTGTGAAGGTCGTGA-3'	5'-AATCTTCAGACTTCCGGCCA-3'
MeWRKY28	5'-TAGCCCCAATTGCACAACAG-3'	5'-TTTCTGGGTGGTTGTTTGA-3'
MeWRKY29	5'-GAAAGCATGTGGAAAGGGCA-3'	5'-TGAGGCGACAGAGTTGACAT-3'
MeWRKY30	5'-CATGGCCGAGATGACAAGTC-3'	5'-GAGAGGAGACAGTTCAGGGG-3'
UBQ10	5'-TGCATCTCGTTCTCCGATTG-3'	5'-GCCAAGATCAGTCGTTGTTGG-3'

2 结果与分析

2.1 WRKY 转录因子的序列结构分析 通过 BLAST 分析获得了 25 个 WRKY 家族转录基因。在线搜索 SMART 数据库, 获得这 25 个 WRKY 转录因子蛋白序列的 WRKY 结构域(图 1)。根据其在染色体上的位置, 将 WRKY 家族基因依次编为 WRKY1 ~ WRKY30。25 个转录因子氨基酸序列中均有 1 个由大约 60 个氨基酸组成的高度保守的 WRKY 结构域, 其中 WRKY6, WRKY8, WRKY27 属于 III 类转录因子, 其他蛋白均属于 II 类转录因子, 可能参与转录调控。

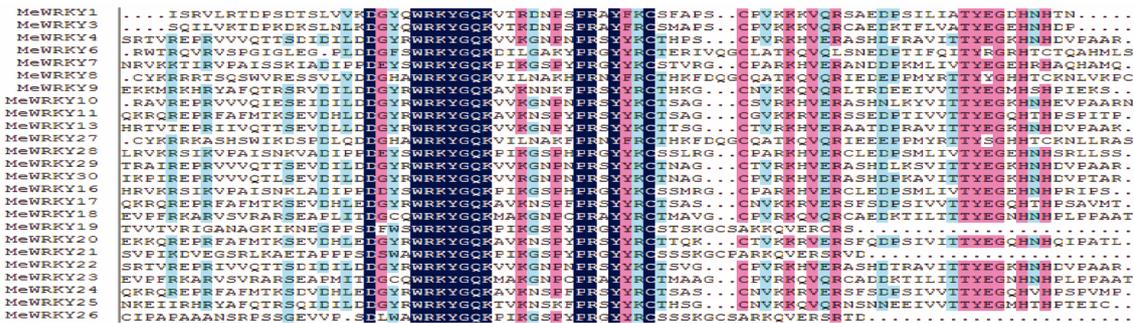


图 1 木薯 WRKY 家族保守结构域蛋白序列比对  
WRKYGQK: 保守结构域; C, C, H, H: 锌指结构

Fig. 1 Alignment of conserved motifs of the MeWRKY family in cassava  
WRKYGQK: conserved motifs; C, C, H, H: Zinc finger

2.2 木薯 WRKY 蛋白的系统进化分析 在模式植物拟南芥中, 部分 WRKY 转录因子的功能已经明确, 笔者从中挑选了 5 个参与植物生长发育调控、激素信号转导、生物及非生物胁迫响应等功能已知的 At-WRKY 蛋白, 利用 DNAMAN 软件将其与木薯 MeWRKY 蛋白序列进行多重比对, 构建系统进化树(图 2)。木薯 MeWRKY 家族蛋白 MeWRKY4, MeWRKY6, MeWRKY10, MeWRKY13, MeWRKY16, MeWRKY26, MeWRKY28, MeWRKY30 与拟南芥植株中 AtWRKY4, AtWRKY27, AtWRKY33, AtWRKY48, AtWRKY70 的同源性超过 70%。现有研究表明, 这 5 个蛋白都在拟南芥与病原菌的相互作用中发挥重要作用<sup>[19-20]</sup>, 说明这些 MeWRKY 基因可能在木薯逆境应答和防御中起作用。

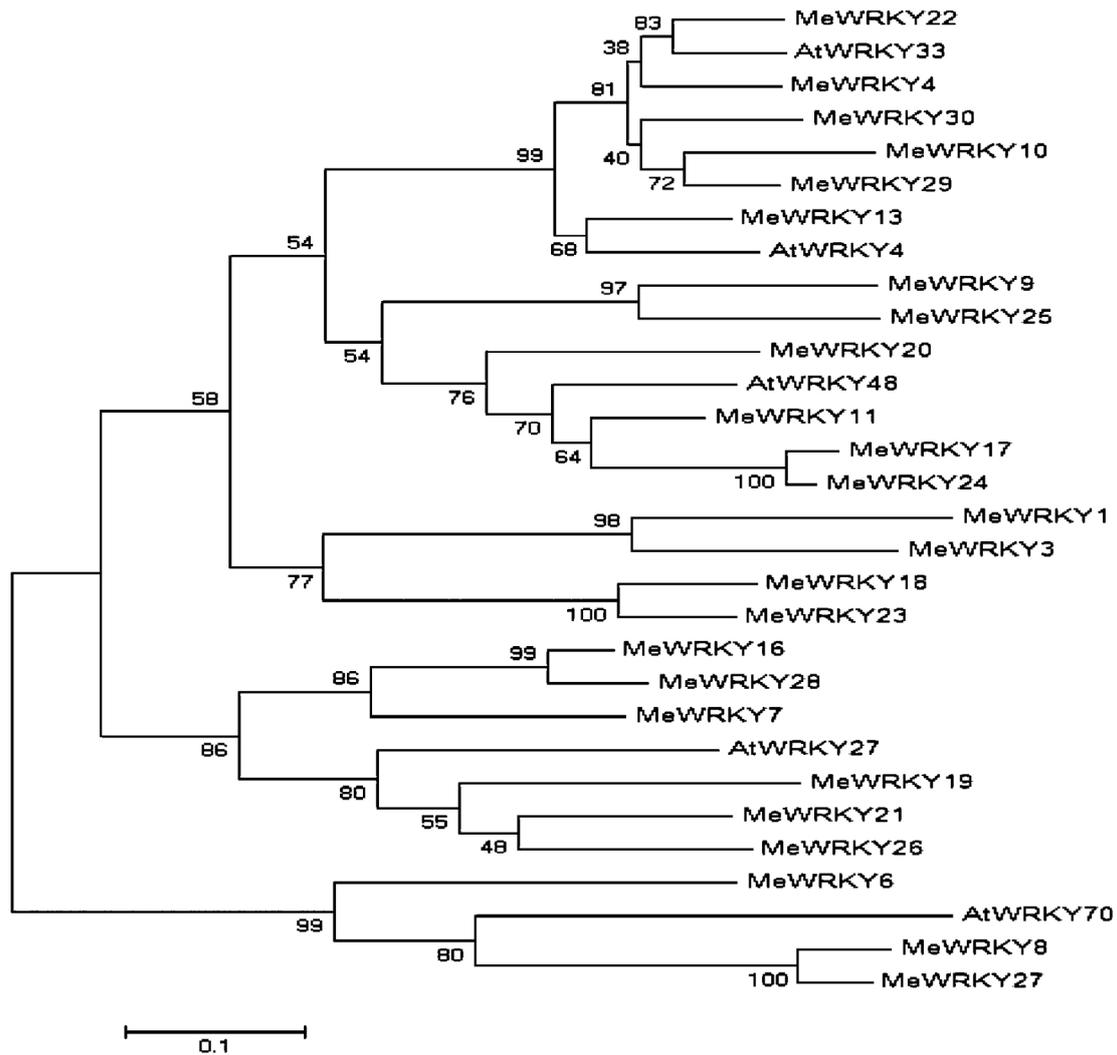


图 2 25 个木薯 MeWRKY 蛋白和 5 个拟南芥 WRKY 蛋白的系统进化分析

Fig. 2 The phylogenetic tree of 25 MeWRKY proteins of cassava and 5 WRKY proteins of *Arabidopsis thaliana*

2.3 木薯 WRKY 转录因子基因的表达模式分析 笔者用 flag22 和 Xam 处理木薯后,对 25 个 WRKY 基因的表达变化进行分析(图 3)。在 flag22 和黄单胞菌 Xam 诱导下, *MeWRKY3*, *MeWRKY4*, *MeWRKY7*, *MeWRKY8*, *MeWRKY23*, *MeWRKY25* 对这 2 种逆境处理的响应呈现无规律性。大部分基因表达模式呈先上后下的趋势,但 flag22 的作用效果明显高于病原菌 Xam。*MeWRKY16*, *MeWRKY24*, *MeWRKY25* 和 *MeWRKY26* 在 flag22 和 Xam 诱导后显著上调表达(基因表达值在处理 and 对照之间倍数超过 2 倍为显著上调表达,小于 0.5 倍为显著下调表达); *MeWRKY10*, *MeWRKY19*, *MeWRKY27*, *MeWRKY28* 在 flag22 处理后显著上调表达,但 *MeWRKY1* 显著下调表达; *MeWRKY22* 在 flag22 和 Xam 诱导下,显著下调表达。这表明不同 WRKY 基因可能在抵抗病原菌侵染过程中起到不同的作用。

2.4 实时荧光定量分析基因在生物胁迫下的表达模式 为了检测多个木薯 WRKY 基因与生物胁迫的相关性,笔者对木薯幼苗(4~6 周)进行了 2 种生物胁迫的处理,包括 flag22 和黄单胞菌 Xam 分别处理 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 h 后分别提取幼苗叶片总 RNA 进行实时荧光定量 RT-qPCR 分析。从图 3 可知,6 个 WRKY 基因(*MeWRKY3*, *MeWRKY4*, *MeWRKY7*, *MeWRKY8*, *MeWRKY23*, *MeWRKY25*)对这 2 种逆境处理的响应呈现无规律性。但 *MeWRKY23* 和 *MeWRKY25* 的表达水平均表现出在接种 0, 0.25, 0.5, 1 h 后表达水平较低,接种 2, 4 h 后表达水平显著上升,说明其可能与木薯响应细菌性病害有关。

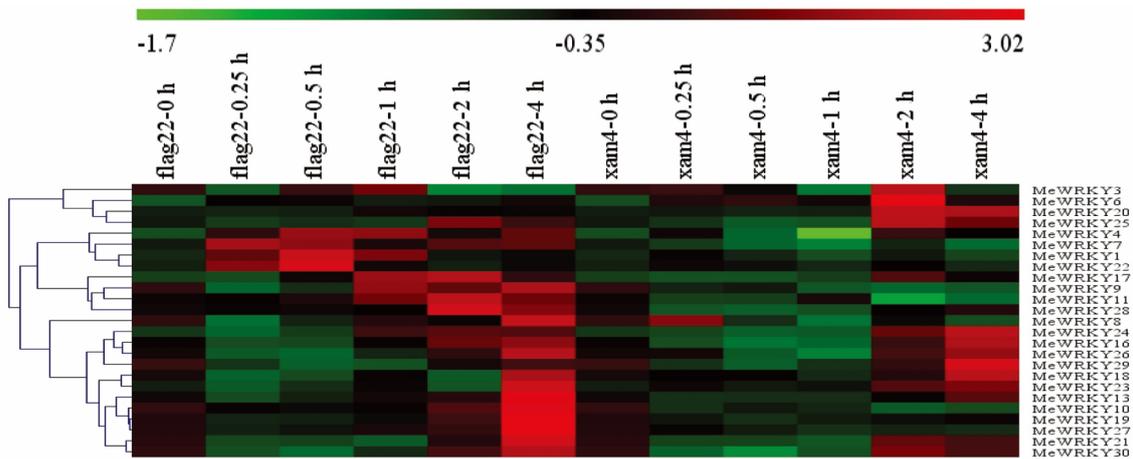


图 3 木薯 WRKY 基因在 flag22 和 Xam 处理后的表达谱

Fig. 3 Expression profiles of 25 cassava MeWRKY genes in response to flag22 and Xam

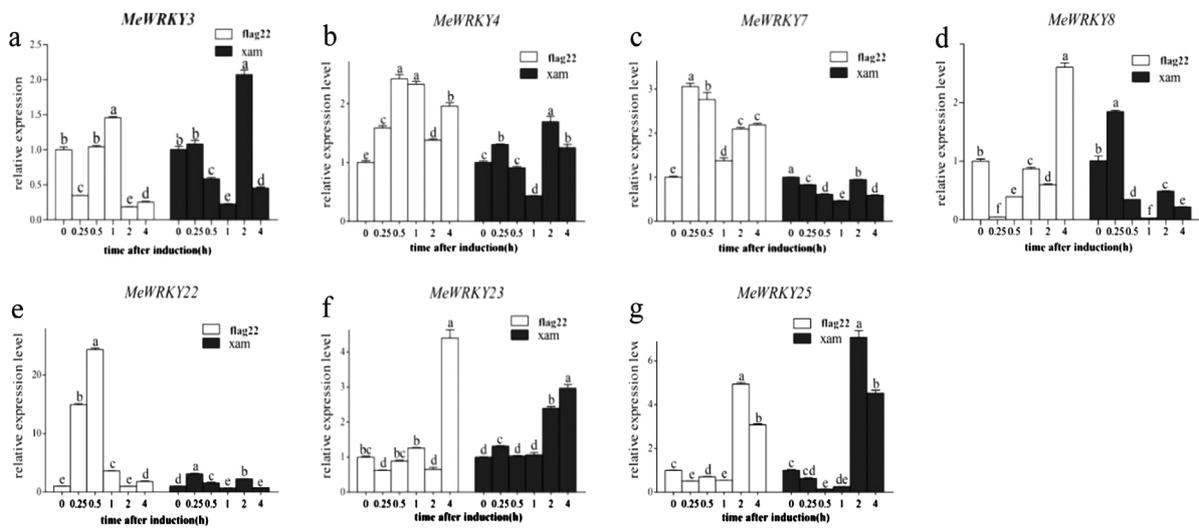


图 4 flag22 和 Xam 处理木薯后表达呈现无规律的 WRKY 基因

Fig. 4 The MeWRKY genes whose expressions are irregular in cassava treated with flag 22 and Xam

从图 5 可知,部分 WRKY 基因在接种 flag22 和 Xam 后表达量出现上调。(1) 接种 flag22 后,表达量上调的基因有: *MeWRKY1*, *MeWRKY11*, *MeWRKY17*, *MeWRKY20*, *MeWRKY24*, *MeWRKY28*。其中, *MeWRKY11*, *MeWRKY17*, *MeWRKY24*, *MeWRKY28* 在病原菌侵入 2 h 时表达量达到最大,而 *MeWRKY1* 和 *MeWRKY20* 基因分别在 0.5 h 和 1 h 时表达量达到最高峰。(2) 接种 Xam 后,表达量上调的有: *MeWRKY6*, *MeWRKY20*, *MeWRKY24*。其中, *MeWRKY6* 和 *MeWRKY20* 在处理 2 h 后表达量达到最高, *MeWRKY24* 则在 4 h 时表达水平最高。结果表明,这些基因可能在病原菌侵入早期起作用。

从图 6 可知,另一部分基因在接种 flag22 和 Xam 后表达量出现明显下调,但在后期存在升高的趋势。(1) 接种 flag22 后,表达量下调的基因有: *MeWRKY10*, *MeWRKY13*, *MeWRKY16*, *MeWRKY19*, *MeWRKY21*, *MeWRKY26*, *MeWRKY27*, *MeWRKY29*, *MeWRKY30*。这些基因在接种 flag22 后表达量均呈现出先降低后升高的趋势,在接种 4 h 后表达量最高,在 0.25 和 0.5 h 时表达量最低。(2) 接种 Xam 后,表达量发生下调的基因有: *MeWRKY9*, *MeWRKY13*, *MeWRKY16*, *MeWRKY18*, *MeWRKY19*, *MeWRKY26*, *MeWRKY28*, *MeWRKY29*。多数基因在接种 4 h 后表达量达到最大值,然而, *MeWRKY9* 和 *MeWRKY19* 基因在 0 h 的表达量最高。多数基因在接种 0.5 和 1 h 后表达量最低, *MeWRKY9* 在接种 2 h 后表达水平最低。有趣的是, *MeWRKY28* 在用 flag22 接种后表达量发生上调,而用 Xam 处理后表达量先下调后上调。

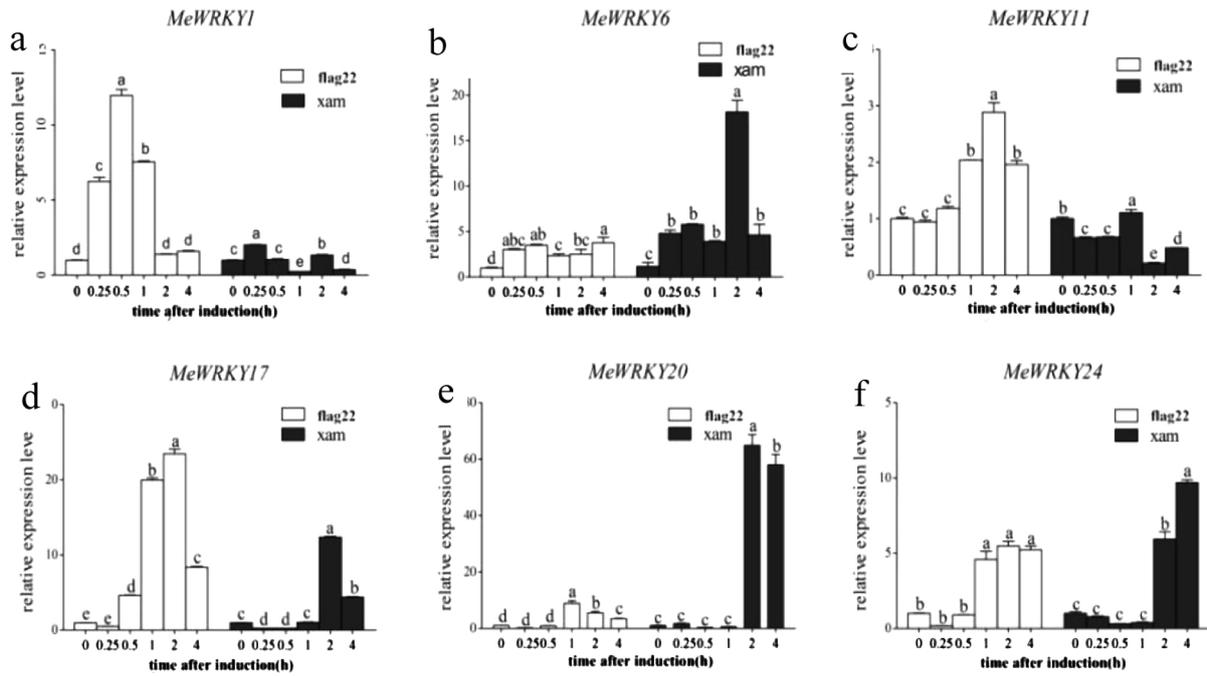


图 5 flag22 和 Xam 处理木薯后上调表达的 WRKY 基因

Fig. 5 The MeWRKY genes whose expressions are up-regulated in cassava treated with flag22 and Xam

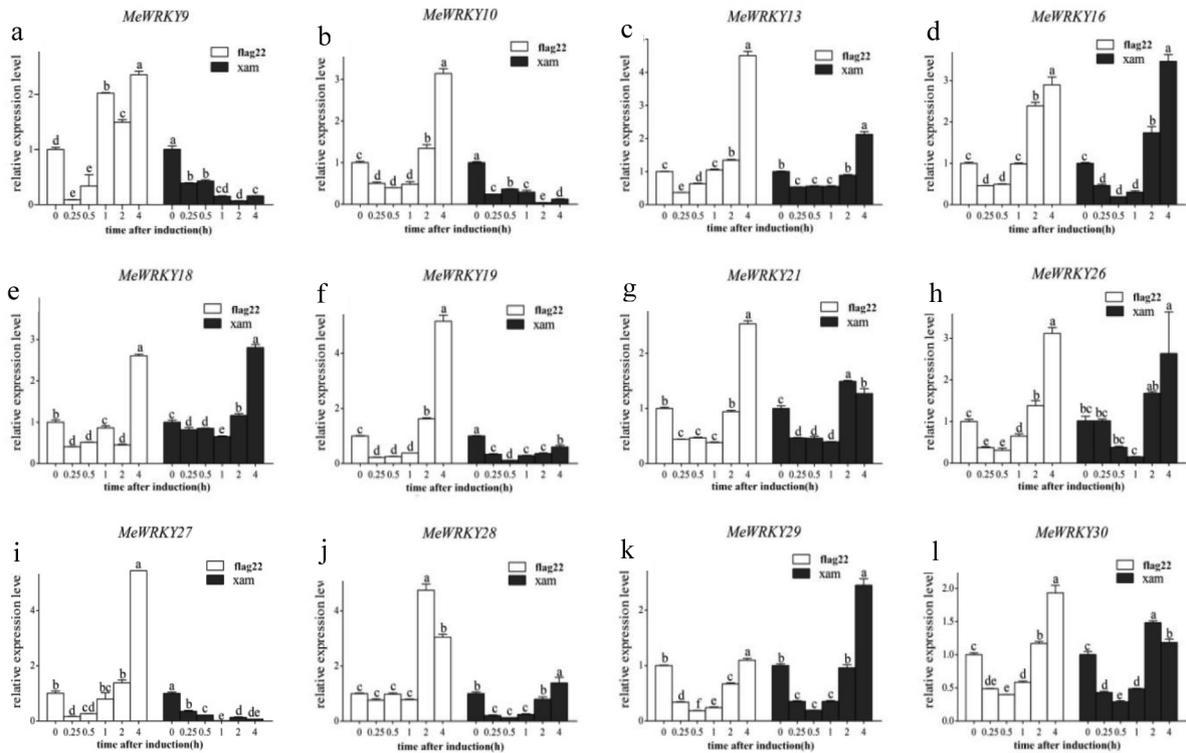


图 6 flag22 和 Xam 处理木薯后先下调后升高表达的 WRKY 基因

Fig. 6 The MeWRKY genes whose expressions are down-regulated after cassava was treated with flag22 and Xam

### 3 讨论

WRKY 转录因子广泛参与植物代谢调控、形态建成、种子萌发、发育和衰老调控、生物胁迫和非生物胁迫应答等过程。研究表明,水稻中 1 对编码蛋白质有 10 个氨基酸不同的等位基因 *OsWRKY45-1* 和 *OsWRKY45-2* 在水稻与病原菌的互作中发挥着相反的作用<sup>[24]</sup>。*OsWRKY45-1* 在水稻粳亚种中发现,而 *OsWRKY45-2* 在籼亚种中发现。对 2 个等位基因的过表达研究结果表明,它们都具有正调节稻瘟病菌抗性的作用,但是在调节水稻白叶枯病菌抗性时表现出差异<sup>[24-25]</sup>。在植物响应白叶枯病菌过程中,*OsWRKY45-1* 似乎是一个负调节子,而 *OsWRKY45-2* 是一个正调节因子。此外,这 2 个等位基因的作用途径似乎不同,因为差异化表达 *OsWRKY45-1* 会改变水杨酸和茉莉酸水平,而差异化表达 *OsWRKY45-2* 似乎只会显著调节茉莉酸水平<sup>[1]</sup>。感染线虫后,拟南芥 *AtWRKY23* 基因表达量几乎立即上调,而 *AtWRKY23* 突变体对孢囊线虫表现出抗性增强<sup>[26]</sup>。拟南芥的 *AtWRKY38*, *AtWRKY62*, *AtWRKY11* 和 *AtWRKY17* 都是对病原体抗性的负调控因子,沉默这些基因后,使拟南芥对病原菌的抗性增强;过表达 *AtWRKY38* 和 *AtWRKY62* 后,病原菌对拟南芥的感染性增强<sup>[26]</sup>。在拟南芥中有 18 个 *AtWRKY* 基因能被 NaCl 诱导<sup>[28]</sup>。这些结果显示 WRKY 可能参与高等生物的抗病调控。

笔者用 flag22 和 Xam 处理木薯后,对 25 个 WRKY 基因的表达变化进行分析。结果显示,部分基因 (*MeWRKY3*, *MeWRKY4*, *MeWRKY7*, *MeWRKY8*, *MeWRKY23*, *MeWRKY25*) 对这 2 种逆境处理的响应呈现无规律性,推测其与木薯抗病性无关,或由于处理时间过短,表达量尚未出现趋势性差异。部分基因在逆境处理下表达水平发生明显变化,表明这些基因可能是木薯生物胁迫中的调控因子。在响应病原菌胁迫时,16 个基因的表达受到明显的影响,部分基因 (*MeWRKY1*, *MeWRKY6*, *MeWRKY20*, *MeWRKY24*, *MeWRKY28*) 表现为表达量上调,说明其可能在木薯响应生物胁迫时具有正调控作用;部分基因 (*MeWRKY9*, *MeWRKY10*, *MeWRKY13*, *MeWRKY16*, *MeWRKY18*, *MeWRKY19*, *MeWRKY21*, *MeWRKY24*, *MeWRKY26*, *MeWRKY27*, *MeWRKY28*, *MeWRKY29*, *MeWRKY30*) 表现为表达量下调,说明其可能是生物胁迫的负调控子。

综上所述,*MeWRKY1*, *MeWRKY6*, *MeWRKY9*, *MeWRKY10*, *MeWRKY13*, *MeWRKY16*, *MeWRKY18*, *MeWRKY19*, *MeWRKY20*, *MeWRKY21*, *MeWRKY24*, *MeWRKY26*, *MeWRKY27*, *MeWRKY28*, *MeWRKY29*, *MeWRKY30* 16 个 WRKY 基因可能与木薯抗病相关,对今后研究木薯抗病性和选育木薯抗病品种具有一定的指导意义。笔者的研究只针对了细菌性病害,对于其他生物胁迫如真菌或病毒对 WRKY 基因表达的影响还未见报道。以后的研究需要在这方面加强,以便全面了解木薯 WRKY 基因在生物胁迫中的作用。

### 参考文献:

- [1] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, et al. WRKY transcription factors [J]. Trends Plant Sci., 2010, 15(5): 247-258.
- [2] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. Trends Plant Sci., 2000, 5(5): 199-206.
- [3] 祖倩丽, 尹丽娟, 徐兆师, 等. 谷子 WRKY36 转录因子的分子特性及功能鉴定 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(5): 851-860.
- [4] Yuan T, Wang S. Pathogen-responsive cis-elements [M] // Mérrillon J M, Ramawa K G. Plant Defence: Biological Control. Heidelberg: Springer, 2012: 363-378.
- [5] 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.
- [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 Mol. Biol., 2008, 68: 81-92.
- [7] Eulgem T, Rushton. Early nuclear events in plant defense signaling: rapid gene activation by WRKY transcription factors [J]. EMBO J., 1999, 18: 4689-4699.
- [8] Ishiguro S, Nakamura K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 se-

- quences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato [J]. *Mol. Gen. Genet.* , 1994 , 244 ( 6 ) : 563 – 571.
- [9] Ross C A , Liu Y , Shen Q J. The WRKY gene family in rice ( *Oryza sativa* ) [J]. *Journal of Integrative Plant Biology* , 2007 , 49( 6 ) : 827 – 842.
- [10] Huang S , Gao Y , Liu J , et al. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum* [J]. *Molecular Genetics and Genomics* , 2012 , 287( 6 ) : 495 – 513.
- [11] Ling J , Jiang W , Zhang Y , et al. Genome-wide analysis of WRKY gene family in *Cucumis sativus* [J]. *BMC Genomics* , 2011 , 12( 1 ) : 471.
- [12] He H , Dong Q , Shao Y , et al. Genome-wide survey and characterization of the WRKY gene family in *Populus trichocarpa* [J]. *Plant Cell Reports* , 2012 , 31 : 1199.
- [13] 许瑞瑞 张世忠 曹慧 等. 苹果 WRKY 转录因子家族基因生物信息学分析 [J]. *园艺学报* 2012 , 39( 10 ) : 2049 – 2060.
- [14] Dou L , Zhang X , Pang C , et al. Genome-wide analysis of the WRKY gene family in cotton [J]. *Molecular Genetics and Genomics* , 2014 , 289( 6 ) : 1103 – 1121.
- [15] Li H , Guo D , Yang Z , et al. Genome-wide identification and characterization of WRKY gene family in *Hevea brasiliensis* [J]. *Genomics* , 2014 , 104( 1 ) : 14 – 23.
- [16] Dong J , Chen C. and Chen , Z. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response [J]. *Plant Mol. Biol.* , 2003 , 51 : 21 – 37.
- [17] 李岢 周春江. 植物 WRKY 转录因子的研究进展 [J]. *植物生理学报* 2014( 9 ) : 1329 – 1335.
- [18] Zhou G X. Transcriptional Analysis of rice plants infested by rice stripped stem borer *Chilo suppressalis* ( Walker) and the functional characterization of a defense-related gene OsHI-LOX [D]. Hangzhou: Zhejiang University , 2009.
- [19] Eulgem T , Somssich I E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling [J]. *Current Opinion in Plant Biology* , 2007 ( 10 ) : 366 – 371.
- [20] Rushton D L1 , Tripathi P , Rabara R C , et al. WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signaling [J]. *Plant Biotechnology Journal* , 2012 ( 10 ) : 2 – 11.
- [21] Göhre V , Jones A M , Sklenář J , et al. Molecular crosstalk between PAMP-triggered immunity and photosynthesis [J]. *Mol. Plant Microbe Interact* , 2012 , 25 : 1083 – 1092.
- [22] 岑贞陆 黄思良. 木薯抗细菌性枯萎病鉴定技术初报 [J]. *作物杂志* 2008( 6 ) : 33 – 35.
- [23] 方佳 濮文辉 张慧坚. 国内外木薯产业发展近况 [J]. *中国农学通报* 2010 , 26( 16 ) : 353 – 361.
- [24] Tao Z , Liu H B , Qiu D Y. A pair of allelic WRKY genes play opposite roles in rice-bacteria interactions [J]. *Plant Physiol* , 2009 , 151 : 936 – 948.
- [25] Shimono M , Sugano S , Nakayama A , et al. Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance [J]. *Plant Cell* 2007( 19 ) : 2064 – 2076.
- [26] Grunewald W , Karimi M , Wieczorek K , et al. A role for AtWRKY23 in feeding site establishment of plant-parasitic nematodes [J]. *Plant Physiol* , 2008 , 148 : 358 – 368.
- [27] Kim K C , Lai Z , Fan B , et al. Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense [J]. *The Plant Cell Online* , 2008 , 20( 9 ) : 2357 – 2371.
- [28] Jiang Y , Deyholos M K. Comprehensive transcriptional profiling of Na Cl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes [J]. *BMC Plant Biology* , 2006 , 6( 1 ) : 25.
- [29] Pandey S P , Somssich I E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity [J]. *Plant Physiol* , 2009 , 150( 4 ) : 1648 – 1655.
- [30] Popescu S C , Popescu G V , Bachan S , et al. MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays [J]. *Genes Dev.* , 2009 ( 23 ) : 80 – 92.
- [31] Wei Y , Shi H , Xia Z , et al. Genome-wide identification and expression analysis of the WRKY gene family in cassava [J]. *Plant Sci.* , 2016( 7 ) : 25.

## Inhibitory Effects of the Extracts of 5 Invasive Plants Against 2 Major Pathogenic Fungi on Mango

HE Shuting<sup>1</sup>, HE Ruilin<sup>2</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, LI Xiuzhu<sup>2</sup>, SONG Haichao<sup>1</sup>, AO Su<sup>3</sup>, SHI Xuequn<sup>2</sup>

( 1. College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 3 Post-Entry Quarantine Station for Tropical Plants, Hainan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Haikou, Hainan 570311, China)

**Abstract:** Five common invasive plants, *Lantana camara* Linn, *Mikania micrantha* Kunth, *Mimosa pudica* Linn, *Praxelis clematidea* Cassini and *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc were extracted with ethanol to detect their antifungal activities on *Botryodiplodia theobromae* Pat and *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc by using mycelial growth rate method. The major components of the extracts were determined by using gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS). The results showed that the extracts from the five alien invasive plants contained anti-fungal activities against these two fungi and that their inhibition rate of the fungi increased with the concentration of the extracts. Among the extracts the extract of *L. camara* Linn displayed the highest inhibitory activity on *B. theobromae* Pat., with an  $EC_{50}$  being  $10.39 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . The extracts of *Mikania micrantha* had strong antimicrobial activity on *B. theobromae* Pat and *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc, with the  $EC_{50}$  of  $14.70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $14.77 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. GC-MS analysis revealed a total of 14 chemical constituents in the extract of *M. micrantha*. The major components in the extracts of *M. micrantha* included 4H-1-Benzopyran-4-one 5,6,7-trimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-, Arbutin and 1,2,4-Cyclohexanetriol, which made up 81.85% of the total content. These components might be the active chemical ingredients which inhibited *B. theobromae* Pat and *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

**Keywords:** Invasive plants; mango; plant extract; antifungal activity; GC-MS.

(上接第 21 页)

## Expression Analysis of 25 WRKY Transcription Factors in Cassava under Biotic Stresses

LI Ke, XIONG Xi, XIAO Xiaorong, LI Yumin, NIU Xiaolei, LI Chunxia, CHEN Yinhu

(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, Hainan University/College of Agronomy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** WRKY family is one of the largest families of transcription factors in higher plants. The WRKY transcription factors play a central role in signal networks and plant growth. The WRKY transcription factors have been extensively studied in response to biotic stresses in model plants, but little information about their roles in cassava is available. According to the WRKY sequences of Arabidopsis and rice, and cassava genome sequences, 25 WRKY genes in cassava were predicted and analyzed including their phylogenetic relationships and conserved domains. Expression profiles of these genes in response to pathogen were analyzed by quantitative PCR. The results showed that the 25 identified MeWRKY genes in cassava had the conserved WRKY domain and zinc-finger structure and had distinct expression patterns in response to pathogen infection, out of which 16 were significantly up- or down-regulated, implying that these members might participate in defense response to biotic stresses in cassava.

**Keywords:** Cassava; WRKY transcriptional factor; expression pattern