

# 疣粒野生稻 WRKY 基因家族全基因组鉴定和分析

阮孙美<sup>1</sup>, 张攀<sup>1</sup>, 张敏<sup>1</sup>, 曾千春<sup>2</sup>, 张慧<sup>2</sup>, 罗琼<sup>1</sup>

<sup>1</sup>云南农业大学植物保护学院/云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201;

<sup>2</sup>云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201)

**摘要:** WRKY 转录因子是高等植物中成员数量较多的转录因子之一, 在植物的生长发育和衰老、非生物和生物胁迫等过程中发挥着重要的作用。疣粒野生稻是栽培稻的近缘野生种, 具有耐荫、耐旱和高抗白叶枯病等特性, 是改良栽培稻的重要种质资源。本研究利用 HMMER、Pfam、SMART、TBtools、NCBI 软件和网站, 在疣粒野生稻基因组中鉴定了 94 个编码 WRKY 转录因子的基因 (*OgWRKYs*), 不均一分布在 12 条染色体上, 根据其所含 WRKY 结构域的数量和锌指结构的特征, 分为 I、II、III 和 IV 组, II 组成员最多 (52 个), 与其他物种相似。除含有保守的 WRKYGQK 七肽序列外, 还鉴定到 6 种变异类型, 其中 WRKYGHK、WRRYGQK、WRKYAKK 和 WRKYSQK 是植物中首次报道的新变异类型。根据保守结构域分析, *OgWRKY61*、*OgWRKY71* 和 *OgWRKY77a* 可能与植物抗病相关。KEGG pathway 富集分析发现, 有 14 个 *OgWRKY* 转录因子富集在植物-病原互作通路, 其中 10 个同时富集在 MAPK 信号通路中。进一步结合顺式作用元件分析结果, 推测 *OgWRKY30b*、*OgWRKY53*、*OgWRKY88*、*OgWRKY96* 和 *OgWRKY111* 可能在疣粒野生稻响应生物和非生物胁迫中发挥重要作用。qRT-PCR 分析结果表明, *OgWRKY30b*、*OgWRKY53*、*OgWRKY88* 和 *OgWRKY111* 基因的表达均受白叶枯病菌 PXO99 诱导, 而 *OgWRKY96* 表达受白叶枯病菌感染抑制。研究结果对疣粒野生稻中优异 *OgWRKYs* 基因资源的挖掘具有重要参考价值。

**关键词:** 疣粒野生稻; WRKY 转录因子; *OgWRKYs*; 基因组学; KEGG 分析

## Genome-wide Identification and Bioinformatics Analysis of WRKY Gene Family in Wild Rice Species, *Oryza granulata*

RUAN Sunmei<sup>1</sup>, ZHANG Pan<sup>1</sup>, ZHANG Min<sup>1</sup>, ZENG Qianchun<sup>2</sup>, ZHANG Hui<sup>2</sup>, LUO Qiong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University/Yunnan State Key Laboratory of Biological Resources Conservation and Utilization, Kunming 650201; <sup>2</sup>College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

**Abstract:** WRKY transcription factor is one of the most abundant transcription factors in higher plants, and play an important role in plant growth and development, senescence, abiotic and biological stress. *O. granulata* (*Oryza meyeriana* subsp. *Granulata*), which serves as a closely related wild species of cultivated rice, represents the characteristics of shade tolerance, drought tolerance and high resistance to bacterial blight, becoming an important germplasm resources for cultivated rice improvement. In this study, using HMMER, Pfam, SMART, TBtools, NCBI software and website, 94 genes encoding WRKY transcription factors (*OgWRKYs*) were identified in *O. granulata*, which were unevenly distributed on 12 chromosomes. According to the number of WRKY domains and the characteristics of zinc finger structure, they were divided into groups I, II, III and IV. Group II had the most members (52), which was similar to other species. In addition to the conserved WRKYGQK heptaepitides, six variants were identified, among which WRKYGHK, WRRYGQK, WRKYAKK and WRKYSQK were new variants reported for the first time in plants. According to conserved domain analysis, *OgWRKY61*, *OgWRKY71* and *OgWRKY77a* may be associated with plant disease resistance.

收稿日期: 2023-09-04 修回日期: 2023-11-29 网络出版日期: 2023-12-15

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230904001>

第一作者研究方向为分子植物病理学, E-mail: 2503339358@qq.com; 张攀为共同第一作者

通信作者: 罗琼, 研究方向为植物发育与抗病分子遗传, E-mail: qiongbf@aliyun.com

基金项目: 国家自然科学基金(U2102219); 云南省陈学伟专家工作站(202305AF150124)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (U2102219); Yunnan Chen Xuewei Expert Workstation (202305AF150124)

KEGG pathway enrichment analysis showed that 14 *OgWRKY* transcription factors were enriched in plant-pathogen interaction pathways, and 10 of them were simultaneously enriched in MAPK signaling pathways. Further analysis of *cis*-acting elements suggested that *OgWRKY30b*, *OgWRKY53*, *OgWRKY88*, *OgWRKY96* and *OgWRKY111* might play important roles in response to biological and abiotic stresses in *O. granulata*. The results of qRT-PCR analysis showed that the expression of *OgWRKY30b*, *OgWRKY53*, *OgWRKY88* and *OgWRKY111* genes were induced by PXO99, while the expression of *OgWRKY96* was inhibited by infection. The results of this study provided important reference for future mining of *OgWRKY*s genes in *O. granulata*.

**Key words:** *Oryza granulata*; WRKY transcription factor; *OgWRKY*s; genomics; KEGG analysis

WRKY转录因子是高等植物中成员数量较多的转录因子之一,在植物的生长发育和衰老、非生物和生物胁迫等过程中发挥着重要的作用<sup>[1-2]</sup>。自1994年,第1个WRKY转录因子成员SPF1 (Sweet-Potato-Factor-1)从甘薯(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)中克隆<sup>[3-4]</sup>,此后,WRKY转录因子相继在拟南芥<sup>[5]</sup>、水稻<sup>[6]</sup>、大豆<sup>[7]</sup>等多个植物中被鉴定和研究。在过表达*TaWRKY19*基因的拟南芥中,编码脱水敏感元素结合蛋白2A (*DREB2A*, *dehydration responsive element binding protein 2A*)、脱水诱导蛋白29A (*RD29A*, *Responsive to Dehydration 29A*)、*RD29B*和冷调蛋白6.6 (*Cor6.6*, *Cold-regulated*)的基因表达上调,植株对盐、干旱和冷胁迫的耐受性增强<sup>[8]</sup>。甘蔗(*Saccharum officinarum* L.) *ScWRKY5*基因受盐胁迫和干旱胁迫诱导表达<sup>[9]</sup>。辣椒(*Capsicum annuum* L.)的WRKY蛋白CaWRKY27,可通过调节烟草(*Nicotiana tabacum* L.)植株中的水杨酸、茉莉酸和乙烯信号通路,增强对青枯雷尔氏菌感染的抗性<sup>[10]</sup>。在拟南芥中过表达水稻的*OsWRKY45*基因,可提高植株对盐胁迫和干旱胁迫的耐受性<sup>[11]</sup>。过表达*OsWRKY13*的水稻植株可增强对白叶枯病和稻瘟病的抗性,水杨酸合成和应答相关基因表达激活,茉莉酸合成和应答相关基因表达被抑制,表明*OsWRKY13*基因通过直接或间接调控水杨酸和茉莉酸上下游基因的表达,参与水稻的抗病性<sup>[12]</sup>。*OsWRKY30*正调控水稻对白叶枯病、纹枯病、稻瘟病和叶条纹病的抗性<sup>[13-14]</sup>。过表达*OsWRKY71*基因的水稻植株可增强对水稻白叶枯病菌的抗性<sup>[15]</sup>。最近研究表明,*OsWRKY31*是MPK信号通路中与稻瘟病抗性相关的一个关键组分<sup>[16]</sup>。此外,AVRPI9相互作用蛋白(*ANIP1*, *Avrpi9-interacting protein1*)和*OsWRKY62*的模块可以调节水稻抗稻瘟病菌的基础防御和Pi9介导的免疫<sup>[17]</sup>。

WRKY转录因子含有1~2个WRKY结构域,为DNA结合域,由约60个氨基酸残基组成,N端包含

典型的WRKYGQK七肽序列<sup>[18]</sup>或WRKYGEK、WRKYGKK、WRKYGRK、WRICGQK、WRMCGQK、WKYGGQK、WIKYGGQK、WKRYGGQK、WSKYEQK和WRKYSEK等变异序列<sup>[19-21]</sup>,C端包含锌指结构C2H2或C2HC<sup>[18]</sup>。WRKY转录因子可通过WRKY结构域与靶基因启动子区的顺式作用元件W-box (TTGACC/T)特异性结合,以此激活或抑制转录,进而调控下游基因的表达<sup>[22-24]</sup>。根据WRKY转录因子所含WRKY结构域数量和锌指结构的特征,将WRKY转录调控因子分为I、II、III和IV 4个组。I组WRKY蛋白含有2个WRKY结构域,进一步根据所含锌指结构类型又分为Ia和Ib亚组,分别含C2H2 (CX4-5-C-X22-23-H-X1-H)锌指结构和C2HC (CX5-7-C-X23-H-X1-C)锌指结构<sup>[25]</sup>;II组WRKY蛋白含有1个WRKY结构域和一个C2H2锌指结构,根据其锌指结构特征分为IIa,IIb,IIc,IId和IIe 5个亚组;III组WRKY蛋白含有1个WRKY结构域和一个C2HC锌指结构;IV组WRKY蛋白锌指基序部分缺失或完全缺失,但含有1个WRKYGQK基序<sup>[18, 26-27]</sup>。WRKY转录因子的进化分析对理解植物生物多样性的整体机制,以及WRKY基因在植物调控网络中发挥的特殊功能具有重要意义。

稻属有24个种,其中9个种(11个基因组)中的WRKY转录因子被鉴定和分析<sup>[28]</sup>,包括AA基因组的7个种:95个短舌野生稻(*Oryza barthii* A.Chev.)、93个展颖野生稻(*Oryza glumaepatula* Steud.)、88个南方野生稻(*Oryza meridionalis* Ng)、94个尼瓦拉野生稻(*Oryza nivara* Sharma & Shastri)、94个普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.)、87个非洲栽培稻(*Oryza glaberrima* Steud.)、98个亚洲栽培稻梗稻亚种日本晴(*Oryza sativa* subsp. *japonica*)、籼稻亚种(*Oryza sativa* subsp. *indica*)中94个明恢63和98个R498, BB基因组的94个斑点野生稻(*Oryza punctata* Kotschy ex Steud.)和FF基因组的83个短花药野生稻(*Oryza brachyantha* A. Chev. & Roehr.)<sup>[28]</sup>。GG基

因组的疣粒野生稻 (*Oryza meyeriana* subsp. *granulata*) 是稻属中已知基因组最大的种<sup>[29]</sup>, 具有对白叶枯病菌高抗甚至免疫、抗虫、抗旱、耐荫等特性, 但疣粒野生稻基因组中 WRKY 转录因子系统的生物信息学分析及其在抗病抗逆中的作用还鲜有报道。本研究基于发表的疣粒野生稻全基因组 (<http://bigd.big.ac.cn/gwh>) 和转录组数据<sup>[29-30]</sup>, 利用生物信息学手段、对疣粒野生稻 WRKY 家族基因进行基因组水平上的系统鉴定和分析, 为疣粒野生稻中优异 *OgWRKY* 基因的挖掘和功能研究奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 疣粒野生稻基因组中 WRKY 家族基因鉴定及分类

从 Genome Warehouse (<http://bigd.big.ac.cn/gwh>) 下载疣粒野生稻的基因组数据<sup>[29]</sup>, 登录号为 GWHAAEL00000000。从 Pfam 数据库 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 下载 WRKY 保守结构域 HMM 隐马尔科夫模型 (PF03106) 文件。利用 HMMER 3.0 进行疣粒野生稻基因组搜索, 搜索条件为“含有 WRKY 结构域”。搜索结果提交到 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 Pfam 数据库, 对序列的保守结构域进行二次鉴定。剔除不含 WRKYGQK 基序或其变体 (WRKYGKK、WRKYGEK、WRKYGRK、WKKYGQK、WKRYGQK 和 WSKYEQK 等) 的序列。通过 TBtools v1.098769 软件与栽培稻日本晴 (*Nipponbare*) WRKY 蛋白进行同源比对, 选择与其同源性最高的基因进行命名, 其中日本晴中 WRKYs 蛋白序列在国家水稻数据中心下载 ([www.ricedata.com](http://www.ricedata.com))。OgWRKYs 蛋白全长序列采用 MEGA11 中的 MUSCLE 方法进行多序列比对, 按照 WRKY 结构域进行分组<sup>[27, 31]</sup>。分组后的多序列比对结果通过 DNAMAN 软件进行可视化。

### 1.2 染色体定位和共线性分析

利用 RagTag 工具包<sup>[32]</sup>基于参考基因组把疣粒野生稻基因组组装到染色体水平, TBtools 软件获取染色体长度及 *OgWRKY* 基因在染色体上的位置信息。最后用在线软件 MG2C<sup>[33]</sup>进行基因染色体位置可视化。通过 TBtools 的 MCScanX 功能进行物种间共线性分析, 并采用 TBtools 软件进行可视化。

### 1.3 *OgWRKY* 转录因子系统发育、保守基序和保守结构域分析

利用 MEGA 11 软件中的 MUSCLE 进行疣粒野生稻 WRKY 转录因子的 WRKY 结构域和全长氨基酸序列比对。基于疣粒野生稻的 WRKY 结构域 (包括 N-末端和 C-末端结构域) 和预测的完整蛋白序列, 利用 MEGA 11 构建邻接系统发育树, bootstrap 复制为 1000。最后使用 ggtree 对进化树进行美化<sup>[34]</sup>。通过 MEME (<http://meme.suite.org/tools/meme>) 在线工具预测分析保守基序, 基序最大数目设置为 10; 利用 TBtools v1.098769 软件的基因结构视图 (高级) 工具将 *OgWRKYs* 进化树数据、meme.xml 文件和多序列比对的保守结构域位置信息绘制为 *OgWRKY* 家族的系统发育进化树、保守基序分布、保守结构域组合图。

### 1.4 *OgWRKY* 转录因子 KEGG 富集分析

通过在线工具 eggNOG (<http://eggno-mapper.embl.de/>) 获取疣粒野生稻的注释文件, 使用 AnnotationForge 构建了疣粒野生稻的 Orgdb 包 *org.Oryza granulata.eg.db*, 然后使用 clusterProfiler 进行 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 富集分析。

### 1.5 *OgWRKYs* 启动子区域顺式作用元件分析

提取 *OgWRKYs* 基因 5' 端上游 2000 bp 的序列, 利用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 网站进行顺式作用元件信息分析, 并用 TBtools v1.098769 软件的 Simple BioSequence Viewer 工具进行可视化。

### 1.6 *OgWRKYs* 基因在白叶枯病菌胁迫下的表达分析

利用 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 试剂盒 (TaKaRa 公司) 提取接种 H<sub>2</sub>O (对照) 和白叶枯病菌 PXO99 后 0 h、24 h、48 h 和 72 h 的疣粒野生稻叶片总 RNA, 然后用 TOYOBO 公司的 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix RNA 反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。以 *Actin* 基因 (*LOC\_Os11g06390*) 作为内参, 使用 Promega 公司的 GoTaq qPCR Master Mix 荧光定量试剂盒进行 qRT-PCR 检测。反应体系 10  $\mu$ L: 5  $\mu$ L qPCR Master Mix, 0.25  $\mu$ L 正向引物, 0.25  $\mu$ L 反向引物, 2  $\mu$ L cDNA, 2.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。扩增程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 60 s, 40 个循环; 熔解程序: 95  $^{\circ}$ C, 15 s; 60  $^{\circ}$ C, 15 s; 95  $^{\circ}$ C, 15 s。使用 2<sup>- $\Delta$ ACT</sup> 方法测定相对表达水平<sup>[35]</sup>, 引物如表 1。

表 1 *OgWRKY* 基因表达分析的实时荧光定量引物Table 1 Real-time fluorescence quantitative primers for *OgWRKY* gene expression analysis

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence(5'-3')	
	正向 Forward	反向 Reverse
<i>Actin</i>	GAGTATGATGAGTCGGGTCCAG	ACACCAACAATCCCAAACAGAG
<i>OgWRKY30b</i>	ATGCTTCATCTGCACCACAGGC	TGGTTTCTTGGTGGGAGAATGAAG
<i>OgWRKY53</i>	CGAGTAGTAGAGGCGAGCAAGA	GCTTCCCTTCACCTGCTTCT
<i>OgWRKY88</i>	AGGATTGATGATGGATCTGCTGG	TCGCCACCTATAACCATCATCC
<i>OgWRKY96</i>	ACCACGTCTGGTCTGTCCAGGTG	TTCGTGTGGCCTTGATTACC
<i>OgWRKY111</i>	AGCACCGAATCGTGCTCCATG	TCCAAGAACTCCGTCGTCGTC

## 2 结果与分析

### 2.1 疣粒野生稻基因组中 WRKY 家族基因鉴定

利用软件 HMMER 3.0 在疣粒野生稻基因组中搜索到 98 条编码 WRKY 蛋白的候选 DNA 序列, 其中有 4 条序列 (GWHTAAEL007838、GWHTAAEL017314、GWHTAAEL017324 和 GWHTAAEL038547) 不含编码 WRKY 结构域的序列 (Genome Warehouse (<http://bigd.big.ac.cn/gwh>))。最终, 在疣粒野生稻基因

组中鉴定了 94 个编码 WRKY 蛋白的基因 (表 2)。与其他稻属 11 个基因组相比<sup>[28]</sup>, 在疣粒野生稻基因组中没有鉴定到 *WRKY40* 和 *WRKY60* 的同源基因, 而 *WRKY23*、*WRKY46*、*WRKY64*、*WRKY66*、*WRKY69*、*WRKY77* 和 *WRKY114* 的同源基因在疣粒野生稻基因组中鉴定到 2 个, *WRKY30* 的同源基因有 3 个 (*OgWRKY30a*、*OgWRKY30b* 和 *OgWRKY30c*) (表 2)。推测 WRKY 基因家族在稻属不同种中具有组成上的多样性。

表 2 *OgWRKYs* 基因相关信息Table 2 Information related to *OgWRKY* genes

基因名称 Gene name	MSU 基因座 MSU locus	编码区 ID CDS ID	氨基酸数量 Number of amino acid	WRKY 基序 WRKY motif	锌指类型 Zinc finger type	组/亚组 Group/ Subgroup	染色体 Chromosome
<i>OgWRKY1</i>	<i>LOC_Os01g14440</i>	GWHTAAEL025149	560	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIb	1
<i>OgWRKY2</i>	<i>LOC_Os10g42850</i>	GWHTAAEL017997	307	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIe	10
<i>OgWRKY3</i>	<i>LOC_Os03g55080</i>	GWHTAAEL008180	193	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIc	3
<i>OgWRKY4</i>	<i>LOC_Os03g55164</i>	GWHTAAEL008165	423	WRKYGQK/ WRKYGQK	C-X4-C-X22-HXH/ C-X4-C-X23-HXH	Ia	3
<i>OgWRKY5</i>	<i>LOC_Os05g04640</i>	GWHTAAEL018663	505	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIb	5
<i>OgWRKY6</i>	<i>LOC_Os03g58420</i>	GWHTAAEL049835	388	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IId	3
<i>OgWRKY7</i>	<i>LOC_Os05g46020</i>	GWHTAAEL027725	228	WRKYGKK	C-X4-C-X23-HXH	IIc	5
<i>OgWRKY8</i>	<i>LOC_Os05g50610</i>	GWHTAAEL012915	326	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIc	5
<i>OgWRKY9</i>	<i>LOC_Os01g18584</i>	GWHTAAEL003764	559	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIb	1
<i>OgWRKY10</i>	<i>LOC_Os01g09100</i>	GWHTAAEL016201	208	WRKYGKK	C-X4-C-X23-HXH	IIc	1
<i>OgWRKY11</i>	<i>LOC_Os01g43650</i>	GWHTAAEL042449	365	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIc	1
<i>OgWRKY12</i>	<i>LOC_Os01g43550</i>	GWHTAAEL042440	346	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIe	1
<i>OgWRKY13</i>	<i>LOC_Os01g54600</i>	GWHTAAEL009521	328	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIe	1
<i>OgWRKY14</i>	<i>LOC_Os01g53040</i>	GWHTAAEL020175	311	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIe	1
<i>OgWRKY15</i>	<i>LOC_Os01g46800</i>	GWHTAAEL039613	355	WRKYGQK	C-X7-C-X23-HXC	III	1
<i>OgWRKY16</i>	<i>LOC_Os01g47560</i>	GWHTAAEL009341	366	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIc	1

表 2 ( 续 )

基因名称 Gene name	MSU 基因座 MSU locus	编码区 ID CDS ID	氨基酸数量 Number of amino acid	WRKY 基序 WRKY motif	锌指类型 Zinc finger type	组/亚组 Group/ Subgroup	染色体 Chromosome
<i>OgWRKY17</i>	<i>LOC_Os01g74140</i>	GWHTAAEL021294	366	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIC	1
<i>OgWRKY18</i>	<i>LOC_Os10g18099</i>	GWHTAAEL003187	262	WRKYGEK	C-X7-C-X24-HXC	III	10
<i>OgWRKY19</i>	<i>LOC_Os05g49620</i>	GWHTAAEL051876	134	WRKYGQK	C-X7-C-X23-HXC	III	5
<i>OgWRKY20</i>	<i>LOC_Os01g60540</i>	GWHTAAEL035800	366	WRKYGQK	C-X7-C-X24-HXC	III	1
<i>OgWRKY21</i>	<i>LOC_Os01g60640</i>	GWHTAAEL035798	283	WRKYGQK	C-X7-C-X23-HXC	III	1
<i>OgWRKY22</i>	<i>LOC_Os01g60490</i>	GWHTAAEL035802	245	WRKYGQK	C-X7-C-X24-HXC	III	1
<i>OgWRKY23a</i>	<i>LOC_Os01g53260</i>	GWHTAAEL020198	246	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIC	1
<i>OgWRKY23b</i>	<i>LOC_Os01g53260</i>	GWHTAAEL011964	185	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIC	5
<i>OgWRKY24</i>	<i>LOC_Os01g61080</i>	GWHTAAEL007473	546	WRKYGQK/ WRKYGQK	C-X4-C-X22-HXH/ C-X4-C-X23-HXH	Ia	1
<i>OgWRKY25</i>	<i>LOC_Os08g13840</i>	GWHTAAEL007440	281	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IId	8
<i>OgWRKY26</i>	<i>LOC_Os01g51690</i>	GWHTAAEL013662	224	WRKYGKK	C-X4-C-X23-HXH	IIC	1
<i>OgWRKY27</i>	<i>LOC_Os01g40430</i>	GWHTAAEL014181	162	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIB	1
<i>OgWRKY28</i>	<i>LOC_Os06g44010</i>	GWHTAAEL042148	336	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	Ia	6
<i>OgWRKY29</i>	<i>LOC_Os07g02060</i>	GWHTAAEL008658	303	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIC	7
<i>OgWRKY30a</i>	<i>LOC_Os08g38990</i>	GWHTAAEL023546	692	WRKYGQK/ WRKYGQK	C-X4-C-X22-HXH/ C-X4-C-X23-HXH	Ia	8
<i>OgWRKY30b</i>	<i>LOC_Os08g38990</i>	GWHTAAEL032254	699	WRKYGHK/ WRKYGQK	C-X4-C-X22-HXH/ C-X4-C-X23-HXH	Ia	9
<i>OgWRKY30c</i>	<i>LOC_Os08g38990</i>	GWHTAAEL023550	433	WRKYGQK	NO	IV	8
<i>OgWRKY31</i>	<i>LOC_Os06g30860</i>	GWHTAAEL010974	383	WRKYGQK	C-X5-C-X23-H-X2-H	IIE	6
<i>OgWRKY32</i>	<i>LOC_Os02g53100</i>	GWHTAAEL017354	555	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIB	2
<i>OgWRKY34</i>	<i>LOC_Os02g43560</i>	GWHTAAEL010736	236	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIC	2
<i>OgWRKY35</i>	<i>LOC_Os04g39570</i>	GWHTAAEL040303	602	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIC	4
<i>OgWRKY36</i>	<i>LOC_Os04g46060</i>	GWHTAAEL006992	244	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIC	4
<i>OgWRKY37</i>	<i>LOC_Os04g50920</i>	GWHTAAEL016377	458	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIE	4
<i>OgWRKY39</i>	<i>LOC_Os02g16540</i>	GWHTAAEL019838	347	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIE	2
<i>OgWRKY42</i>	<i>LOC_Os02g26430</i>	GWHTAAEL048897	256	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IId	2
<i>OgWRKY43</i>	<i>LOC_Os05g49210</i>	GWHTAAEL011863	601	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIB	5
<i>OgWRKY45</i>	<i>LOC_Os05g25770</i>	GWHTAAEL048986	318	WRKYGQK	C-X7-C-X23-HXC	III	5
<i>OgWRKY46a</i>	<i>LOC_Os11g02480</i>	GWHTAAEL040814	226	WRKYGEK	C-X7-C-X24-HXC	III	12
<i>OgWRKY46b</i>	<i>LOC_Os11g02480</i>	GWHTAAEL009148	224	WRKYGEK	C-X7-C-X24-HXC	III	11
<i>OgWRKY47</i>	<i>LOC_Os07g48260</i>	GWHTAAEL014235	293	WRKYGQK	C-X7-C-X23-HXC	III	7
<i>OgWRKY48</i>	<i>LOC_Os05g40060</i>	GWHTAAEL042918	247	WRKYGQK	C-X7-C-X23-HXC	III	5
<i>OgWRKY49</i>	<i>LOC_Os05g49100</i>	GWHTAAEL042365	418	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIC	5
<i>OgWRKY51</i>	<i>LOC_Os04g21950</i>	GWHTAAEL034539	326	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IId	4

表 2 (续)

基因名称 Gene name	MSU 基因座 MSU locus	编码区 ID CDS ID	氨基酸数量 Number of amino acid	WRKY 基序 WRKY motif	锌指类型 Zinc finger type	组/亚组 Group/ Subgroup	染色体 Chromosome
<i>OgWRKY53</i>	<i>LOC_Os05g27730</i>	GWHTAAEL032827	503	WRKYGQK/ WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH/ C-X4-C-X23-HXH	Ia	5
<i>OgWRKY54</i>	<i>LOC_Os05g40080</i>	GWHTAAEL042921	322	WRKYGQK	C-X7-C-X26-HXC	III	5
<i>OgWRKY55</i>	<i>LOC_Os03g20550</i>	GWHTAAEL025612	210	WRKYGEK	C-X7-C-X24-HXC	III	3
<i>OgWRKY56</i>	<i>LOC_Os01g62514</i>	GWHTAAEL024338	342	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIc	1
<i>OgWRKY57</i>	<i>LOC_Os12g01180</i>	GWHTAAEL037899	441	WRKYGQK	C-X4-C-X22-HXH	IIc	11
<i>OgWRKY61</i>	<i>LOC_Os11g45850</i>	GWHTAAEL033777	1434	WRRYGQK/ WRKYGQK	C-X7-C-X23-HXC/ C-X7-C-X23-HXC	Ib	11
<i>OgWRKY62</i>	<i>LOC_Os09g25070</i>	GWHTAAEL040421	298	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIa	9
<i>OgWRKY64a</i>	<i>LOC_Os12g02450</i>	GWHTAAEL040816	315	WRKYGQK	C-X7-C-X34-HXC	III	12
<i>OgWRKY64b</i>	<i>LOC_Os12g02450</i>	GWHTAAEL007837	309	WRKYGQK	C-X7-C-X33-HXC	III	12
<i>OgWRKY65</i>	<i>LOC_Os12g02470</i>	GWHTAAEL034479	333	WRKYGQK	C-X7-C-X30-HXC	III	12
<i>OgWRKY66a</i>	<i>LOC_Os02g47060</i>	GWHTAAEL006945	477	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIe	2
<i>OgWRKY66b</i>	<i>LOC_Os02g47060</i>	GWHTAAEL043471	227	WRKYSQK	NO	IV	9
<i>OgWRKY67</i>	<i>LOC_Os05g09020</i>	GWHTAAEL005696	215	WRKYGKK	C-X4-C-X23-HXH	IIc	5
<i>OgWRKY68</i>	<i>LOC_Os04g51560</i>	GWHTAAEL027974	305	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	II d	4
<i>OgWRKY69a</i>	<i>LOC_Os08g29660</i>	GWHTAAEL035782	315	WRKYGQK	C-X7-C-X23-HXC	III	8
<i>OgWRKY69b</i>	<i>LOC_Os08g29660</i>	GWHTAAEL015346	405	WRKYGQK	C-X7-C-X23-HXC	III	5
<i>OgWRKY70</i>	<i>LOC_Os05g39720</i>	GWHTAAEL050973	573	WRKYGQK/ WRKYGQK	C-X4-C-X22-HXH/ C-X4-C-X23-HXH	Ia	5
<i>OgWRKY71</i>	<i>LOC_Os02g08440</i>	GWHTAAEL038027	342	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIa	2
<i>OgWRKY72</i>	<i>LOC_Os11g29870</i>	GWHTAAEL015332	238	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIc	11
<i>OgWRKY73</i>	<i>LOC_Os06g05380</i>	GWHTAAEL031376	531	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIb	6
<i>OgWRKY74</i>	<i>LOC_Os09g16510</i>	GWHTAAEL025256	342	WRKYGQK	C-X7-C-X23-HXC	III	9
<i>OgWRKY76</i>	<i>LOC_Os09g25060</i>	GWHTAAEL040423	330	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIa	9
<i>OgWRKY77a</i>	<i>LOC_Os01g40260</i>	GWHTAAEL034111	1021	WRKYAKK	C-X4-C-X23-HXH	IIc	8
<i>OgWRKY77b</i>	<i>LOC_Os01g40260</i>	GWHTAAEL014193	213	WRKYGKK	C-X4-C-X23-HXH	IIc	1
<i>OgWRKY79</i>	<i>LOC_Os03g21710</i>	GWHTAAEL014699	357	WRKYGQK	C-X7-C-X23-HXC	III	3
<i>OgWRKY80</i>	<i>LOC_Os03g63810</i>	GWHTAAEL014025	372	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIe	3
<i>OgWRKY81</i>	<i>LOC_Os03g33012</i>	GWHTAAEL013315	364	WRKYGQK/ WRKYGQK	C-X4-C-X22-HXH/ C-X4-C-X23-HXH	Ia	3
<i>OgWRKY84</i>	<i>LOC_Os05g40070</i>	GWHTAAEL042919	264	WRKYGEK	C2XX	IV	5
<i>OgWRKY87</i>	<i>LOC_Os07g39480</i>	GWHTAAEL027488	617	WRKYGQK/ WRKYGQK	C-X4-C-X22-HXH/ C-X4-C-X23-HXH	Ia	7
<i>OgWRKY88</i>	<i>LOC_Os07g40570</i>	GWHTAAEL023512	364	WRKYGQK/ WRKYGQK	C-X4-C-X22-HXH/ C-X4-C-X23-HXH	Ia	7
<i>OgWRKY89</i>	<i>LOC_Os08g17400</i>	GWHTAAEL015781	401	WRKYGQK/ WRKYGQK	C-X4-C-X22-HXH/ C-X4-C-X23-HXH	Ia	8

表 2 (续)

基因名称 Gene name	MSU 基因座 MSU locus	编码区 ID CDS ID	氨基酸数量 Number of amino acid	WRKY 基序 WRKY motif	锌指类型 Zinc finger type	组/亚组 Group/ Subgroup	染色体 Chromosome
<i>OgWRKY94</i>	<i>LOC_Os12g40570</i>	GWHTAAEL024415	437	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IId	12
<i>OgWRKY96</i>	<i>LOC_Os12g32250</i>	GWHTAAEL050054	442	WRKYGQK/ WRKYGQK	C-X4-C-X22-HXH/ C-X4-C-X23-HXH	Ia	12
<i>OgWRKY102</i>	<i>LOC_Os01g08710</i>	GWHTAAEL016232	279	WRKYGQK	C-X4-C-X23-HXH	IIc	1
<i>OgWRKY104</i>	<i>LOC_Os11g02520</i>	GWHTAAEL009146	277	WRKYGQK	C-X7-C-X27-HXC	III	12
<i>OgWRKY107</i>	<i>LOC_Os01g09080</i>	GWHTAAEL016202	519	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIb	1
<i>OgWRKY108</i>	<i>LOC_Os01g60600</i>	GWHTAAEL035799	337	WRKYGQK	C-X7-C-X25-HXC	III	1
<i>OgWRKY109</i>	<i>LOC_Os05g03900</i>	GWHTAAEL018707	180	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIe	5
<i>OgWRKY111</i>	<i>LOC_Os05g50700</i>	GWHTAAEL012910	307	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IIe	5
<i>OgWRKY113</i>	<i>LOC_Os06g06360</i>	GWHTAAEL007274	385	WRKYGQK	C-X7-C-X23-HXC	III	6
<i>OgWRKY114a</i>	<i>LOC_Os12g02400</i>	GWHTAAEL009150	360	WRKYGEK	C-X7-C-X24-HXC	III	11
<i>OgWRKY114b</i>	<i>LOC_Os12g02400</i>	GWHTAAEL038377	324	WRKYGEK	C-X7-C-X24-HXC	III	12
<i>OgWRKY115</i>	<i>LOC_Os07g27670</i>	GWHTAAEL008610	218	WRKYGQK	NO	IV	7
<i>OgWRKY116</i>	<i>LOC_Os01g60520</i>	GWHTAAEL035801	275	WRKYGQK	C-X7-C-X24-HXC	III	1
<i>OgWRKY121</i>	<i>LOC_Os03g53050</i>	GWHTAAEL000091	388	WRKYGQK	C-X5-C-X23-HXH	IId	8

疣粒野生稻中有两个或三个预测的 *WRKY* 基因搜索到日本晴中同一个 *WRKY* 基因时, 按相似性高低, 分别在基因名后加 a、b、c, 进行区分

When two or three predicted *WRKY* genes in *O.granulata* search for the same *WRKY* gene in *Nipponbare*, they are distinguished by adding a, b, and c after the gene name according to the similarity

## 2.2 *OgWRKY* 转录因子分类

参考 Xie 等<sup>[27]</sup>的方法, 使用 MEGA11 中的 MUSCLE 进行 *OgWRKYs* 蛋白的氨基酸全长序列比对和结构域分析, 94 个 *OgWRKY* 蛋白分为 I、II、III 和 IV 4 组。I 组有 12 个成员, 含有两个 WRKY 结构域, 其中含 C2H2 (C-X4-C-X22-23-HXH) 型锌指基序的为 Ia 亚组 (11 个蛋白), 含 C2HC (C-X7-C-X23-HXC) 型锌指基序的为 Ib 亚组 (1 个蛋白)。II 组有 52 个成员, 含有一个 WRKY 基序和 C2H2 型锌指基序, 进一步根据锌指基序的序列特征又分为 IIa、IIb、IIc、IId 和 IIe 5 个亚组。IIa 亚组含有 C-X5-CPVKKKVQR 基序 (4 个蛋白); IIb 亚组含有 C-X5-CPV(R/K)KQVQRC 基序 (8 个蛋白); IIc 亚组含有 C-X4-C 基序 (22 个蛋白); IId 亚组含有 C-X5-CPARKHVER 基序 (7 个蛋白); IIe 亚组含有 C-X5-C(P/A/M/S)ARK(Q/M)V(E/D)基序 (11 个蛋白)。III 组有 26 个成员, 含有一个 WRKY 基序和一个 C2HC 型锌指基序。IV 组有 4 个成员, 含有 WRKY 基序, 但缺少锌指基序或锌指基序不完整 (图 1)。

本研究结果表明, Ib 亚组也存在于 GG 染色体

组的疣粒野生稻基因组中。疣粒野生稻基因组中绝大多数 WRKY 成员 (78 个) 都包含保守的 WRKYGQK 基序, 少数为 WRKYGHK (1 个)、WRKYGKK (5 个)、WRKYGEK (7 个)、WRRYGQK (1 个)、WRKYAKK (1 个) 和 WRKYSQK (1 个) 变异体, 其中 WRKYAKK、WRKYGHK、WRRYGQK 和 WRKYSQK, 是本研究在疣粒野生稻中鉴定的新变异体 (图 1, 表 2)。

## 2.3 染色体定位和共线性分析

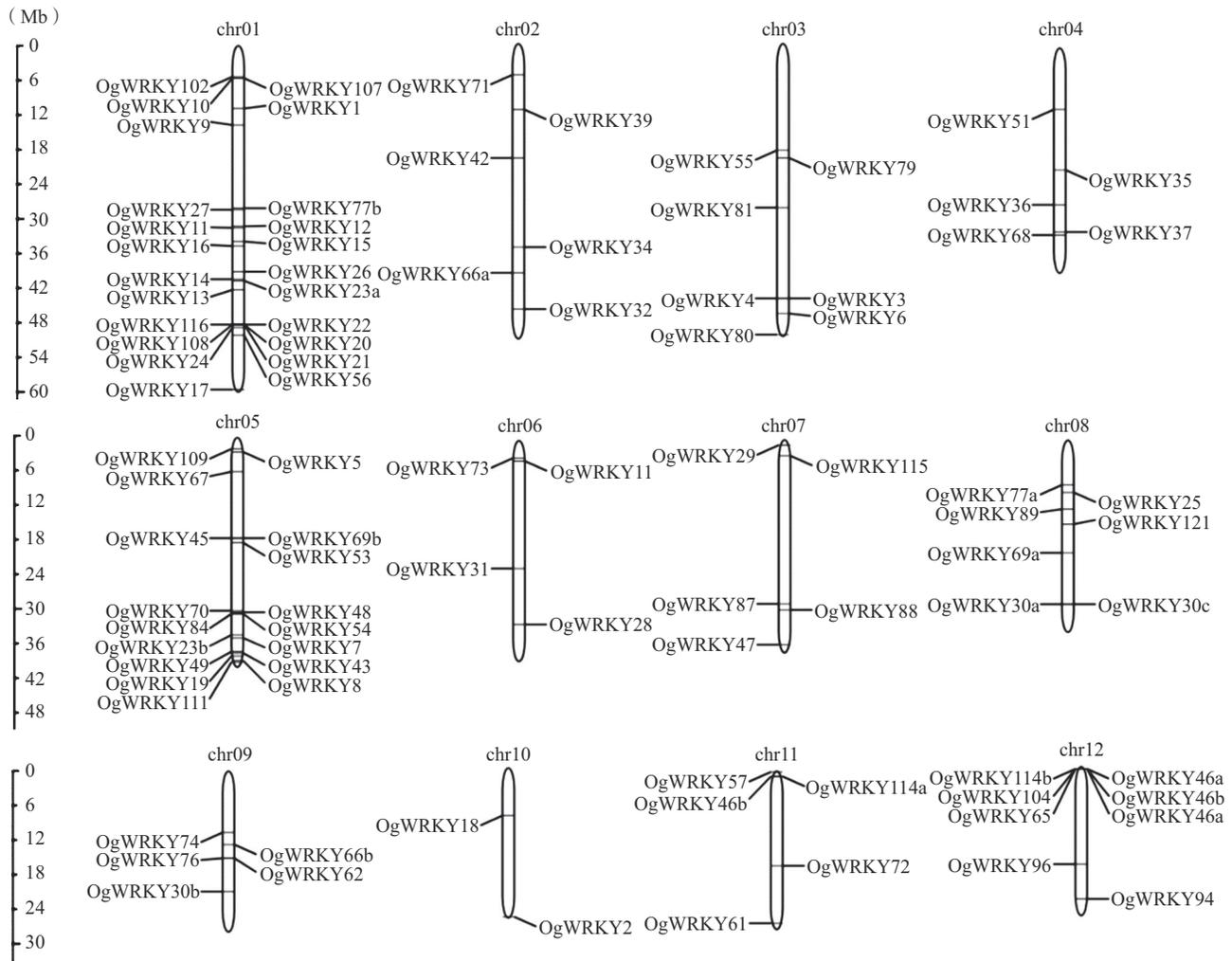
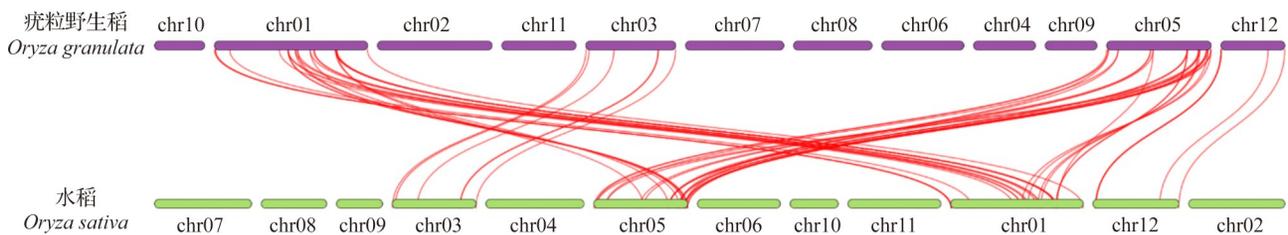
94 个 *OgWRKY* 基因不均匀地分布在疣粒野生稻的 12 条染色体上, 分布数量最多的是 1 号染色体 (23 个), 其次是 5 号染色体 (17 个), 最少的是 10 号染色体 (2 个), 一些 *OgWRKY* 基因在染色体 1、5 和 12 上成簇分布 (图 2), 可能由基因重复事件产生。此外, 对疣粒野生稻和水稻进行了共线性分析 (图 3)。结果显示, 疣粒野生稻有 64 个 *OgWRKYs* 基因与水稻形成共线性基因对。说明疣粒野生稻和水稻在进化过程中有较高的基因交流和相似性, 但在驯化过程中部分 WRKY 家族基因发生了遗传变异, 这些变异可能对水稻的性状和适应性产生影响。





图1 OgWRKYs保守结构域多序列比对 (MSA)

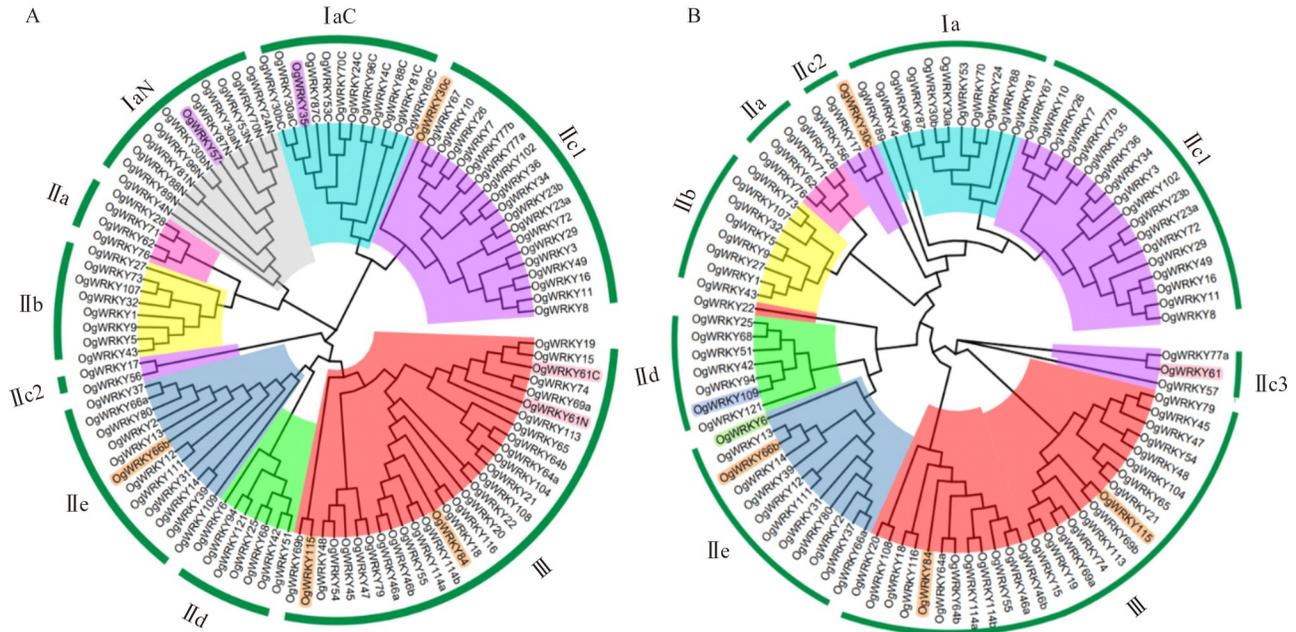
蓝色代表 100% 序列一致性, 粉色表示大于 75% 的序列, 青色表示小于 75% 的序列。红框表示保守的七肽序列, 红线表示锌指结构域。Os: 水稻; Og: 疣粒野生稻  
 Blue represents 100% sequence consistency, pink represents sequences greater than 75%, cyan represents sequences less than 75%. The red box indicates conserved heptapeptide sequences, and the red line indicates zinc finger domains. Os: *Oryza sativa*; Og: *Oryza granulata*

图2 *OgWRKY* 基因家族染色体分布及数量Fig. 2 Chromosome distribution and number of *OgWRKY* gene family图3 疣粒野生稻和水稻 *WRKY* 基因家族共线性分析Fig. 3 Collinearity analysis of *WRKY* gene families in *O. granulata* and rice

#### 2.4 *OgWRKY* 转录因子系统发育分析

首先利用 MUSCLE 对 94 个 *OgWRKY* 蛋白的 *WRKY* 结构域序列进行比对, 并利用 MEGA 11 构建具有 1000 个 bootstrap 重复的邻接进化树(图 4)。Ia 亚组 *OgWRKY*s 的聚为两个分支, N 端结构域聚为 IaN 支, C 端结构域聚为 IaC 支。Ib 亚组只有一个成员 *OgWRKY61*, N 端和 C 端结构域聚在一起, 与 III 组成员聚集为一个分支, 暗示疣粒野生稻 Ib 亚组成员可能由 III 亚组进化而来。II 组成员聚为 4 个分支, IIa 和 IIb 亚组聚为一支, IId 和 IIe 亚组聚

为一支。IIc 亚组聚为 IIc1 和 IIc2 两个分支, 大多数 IIc 亚组成员聚在与 IaC 分支相邻的 IIc1 分支中, 但 *OgWRKY35* 聚在 IaC 分支中, *OgWRKY57* 聚在 IaN 分支中, 暗示疣粒野生稻 IIc 亚组和 Ia 亚组成员之间存在某种进化上的联系。疣粒野生稻 IV 组的成员有 4 个(*OgWRKY30c*、*OgWRKY66b*、*OgWRKY84* 和 *OgWRKY115*), 分别聚在 IIc1、IIe、III 和 III 组, 表明 IV 组 *WRKY* 基因可以通过其他任何组的 *WRKY* 基因失去 *WRKY* 结构域的一部分衍生而来。



A: 疣粒野生稻 WRKY 结构域构建的系统发育树; B: 疣粒野生稻 WRKY 蛋白的全长氨基酸序列构建的系统发育树; 不同颜色的演化支代表不同的组/亚组, 蛋白名称带橘色标示 IV 组成员, 淡粉色标示 Ib 亚组成员, 紫色标示 IIc 亚组成员, 绿色标示 IIId 亚组成员, 蓝色标示 IIe 亚组成员

A: Phylogenetic tree constructed by WRKY domain of *O. granulata*; B: Phylogenetic tree constructed from full-length amino acid sequence of WRKY protein of *O. granulata*; Different colors of clades represent different groups/subgroups, the protein names are orange for group IV members, light pink for group Ib members, and purple for group IIc members. Members of the IIId subgroup are identified in green, and members of the IIe subgroup are identified in blue

图 4 疣粒野生稻 WRKY 蛋白的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of WRKY proteins in *O. granulata*

由 WRKY 结构域构建的系统发育树可能会遗漏一些基因进化的重要信息。为此,进一步利用 OgWRKYs 蛋白的氨基酸全长序列构建了邻接系统发育树(图 4A)。结果显示,蛋白氨基酸全长系统发育树与域树总体相似,但也存在一些差异(图 4B)。在结构域树中 IIc 亚组成员聚在 2 个分支中,而蛋白氨基酸全长系统发育树中聚为 IIc1、IIc2 和 IIc3 三个分支;在结构域树中,IIc 亚组成员 OgWRKY35 与 IaC 聚在一起,而在蛋白氨基酸全长系统发育树中位于 IIc1 分支中;在结构域树中的 IIId 亚组成员 OgWRKY6 在蛋白氨基酸全长系统发育树中与 IIe 亚组成员聚在一起;结构域树中 IIe 亚组成员 OgWRKY109 在蛋白氨基酸全长系统发育树中与 IIId 亚组成员聚在同一分支。以上结果进一步表明,疣粒野生稻 IIc 亚组和 Ia 亚组成员进化关系密切,并且进一步支持 IIId 和 IIe 亚组合并为一个亚组的观点。

## 2.5 OgWRKYs 蛋白保守基序和结构域分析

为了进一步了解 OgWRKY 蛋白基序的相似性和多样性,使用 MEME Online 软件对 OgWRKY 蛋白的 10 个保守基序进行了分析。结果显示,不同

OgWRKY 蛋白中含有 motif 数量 1~7 个不等,同一组或亚组的 OgWRKYs 具有基本一致的保守基序(图 5A)。Ia 亚组基序数量最多,含有 7 个 motif。motif 1 位于 I 组的 C 端 WRKY 结构域, motif 3 位于 N 端 WRKY 结构域。除 IV 组 OgWRKY66b 外,所有 OgWRKY 蛋白均含有 motif 1,而 motif 3 仅存在于 Ia 亚组蛋白中。Motif 2 位于锌指结构域。在 Ia 亚组中,C 端 WRKY 结构域主要由 motif 1、motif 2、motif 4 和 motif 7 组成。Ia 亚组 N 端 WRKY 结构域含有 motif 3、motif 6 和 motif 10, motif 10 为 Ia 亚组 N 端 WRKY 结构域所特有。在 Ib 亚组中,N 端和 C 端 WRKY 结构域都含有 motif 1 和 motif 2,与半数 III 组 WRKY 家族成员的所含基序一致。此外,III 组一些成员的 WRKY 结构域还含有特有的 motif 5。IIa 和 IIb 亚组含有基序 motif 1、motif 2、motif 7 和 motif 9, motif 9 为其特有;IIId 和 IIe 亚组含有共同基序 motif 1、motif 2 和 motif 8, motif 8 为 IIId 和 IIe 亚组所特有。IIId 和 IIe 亚组区别在于,IIe 亚组除 OgWRKY31 外,其余蛋白皆含有 motif 7;而 IIId 亚组只有 OgWRKY6 含有 motif 7。

在疣粒野生稻基因组中鉴定的 94 个 WRKY 家

族基因中,有90个基因都编码含有至少一个约由60个氨基酸组成的典型WRKY结构域,而OgWRKY30c、OgWRKY66b、OgWRKY84和OgWRKY115的WRKY结构域不完整,鉴定的WRKY结构域只有19~48个氨基酸。除WRKY结构域之外,有15个OgWRKY蛋白还含有其他结构域(图5B)。Ia亚组的OgWRKY30b和Iic亚组的OgWRKY35包含一个PHA03247 Superfamily,但其功能尚不清楚。Ib亚组的OgWRKY61包含NB-ARC、PLN03091和Rx\_N结构域。NB-ARC结构域,由植物抗性基因产物和调节子共享,在植物抗性中作为信号基序起作用<sup>[36]</sup>;Rx\_N结构域代表植物抗性蛋白中发现的N端结构域;PLN03091功能尚不清楚。IIa亚组OgWRKY71包含一个bZIP Superfamily结构域,植物bZIP参与调控花的发育、种子成熟、休眠和衰老等诸多生物学过程中担任重要作用<sup>[37]</sup>。IIb亚组OgWRKY32包含一个MDN1超家族结构域,Mdn1是一种重要的AAA(与各种活动相关的ATP酶)蛋白,它利用ATP水解产生的能量对核糖体的60S亚基进行物理重塑和重构,从而使其成熟<sup>[38-39]</sup>。IIc亚组的OgWRKY57包含一个ULP1超家族结构域,Ulp1是小泛素样修饰物(SUMO, Small ubiquitin-like modifier)蛋白酶,负责从特定靶蛋白中去除SUMO/Smt3,并将前体小泛素样修饰物加工成其共轭功能形式<sup>[40]</sup>。OgWRKY77a含NB-ARC和RX-CC\_like结构域,其中RX-CC\_like结构域主要有3种功能:一是具有保守的EDVID基序,参与Rx分子内相互作用;二是与Rx的细胞内辅因子RanGAP2直接相互作用,这种相互作用为Rx抗病功能所必需;三是RX-CC\_like结构域本身具有在细胞核内定位的特性,能够影响Rx的亚细胞分布,而Rx的核质分布对其抗病功能的发挥也有显著影响<sup>[41]</sup>。6个IId亚组的OgWRKYs(OgWRKY25、OgWRKY42、OgWRKY51、OgWRKY68、OgWRKY94和OgWRKY121)中存在植物锌簇结构域(Plant\_Zn\_clust),与Jiang等<sup>[42]</sup>对药用野生稻的研究结果相似,但植物锌簇结构域功能尚不清楚。以上结果表明,OgWRKY61、OgWRKY71和OgWRKY77a可能与植物抗病相关。

## 2.6 OgWRKYs 家族 KEGG 富集分析

对94个OgWRKYs基因进行了KEGG通路富集分析,14个OgWRKY富集在基因植物-病原互作(Plant-pathogen interaction)通路,其中OgWRKY12、

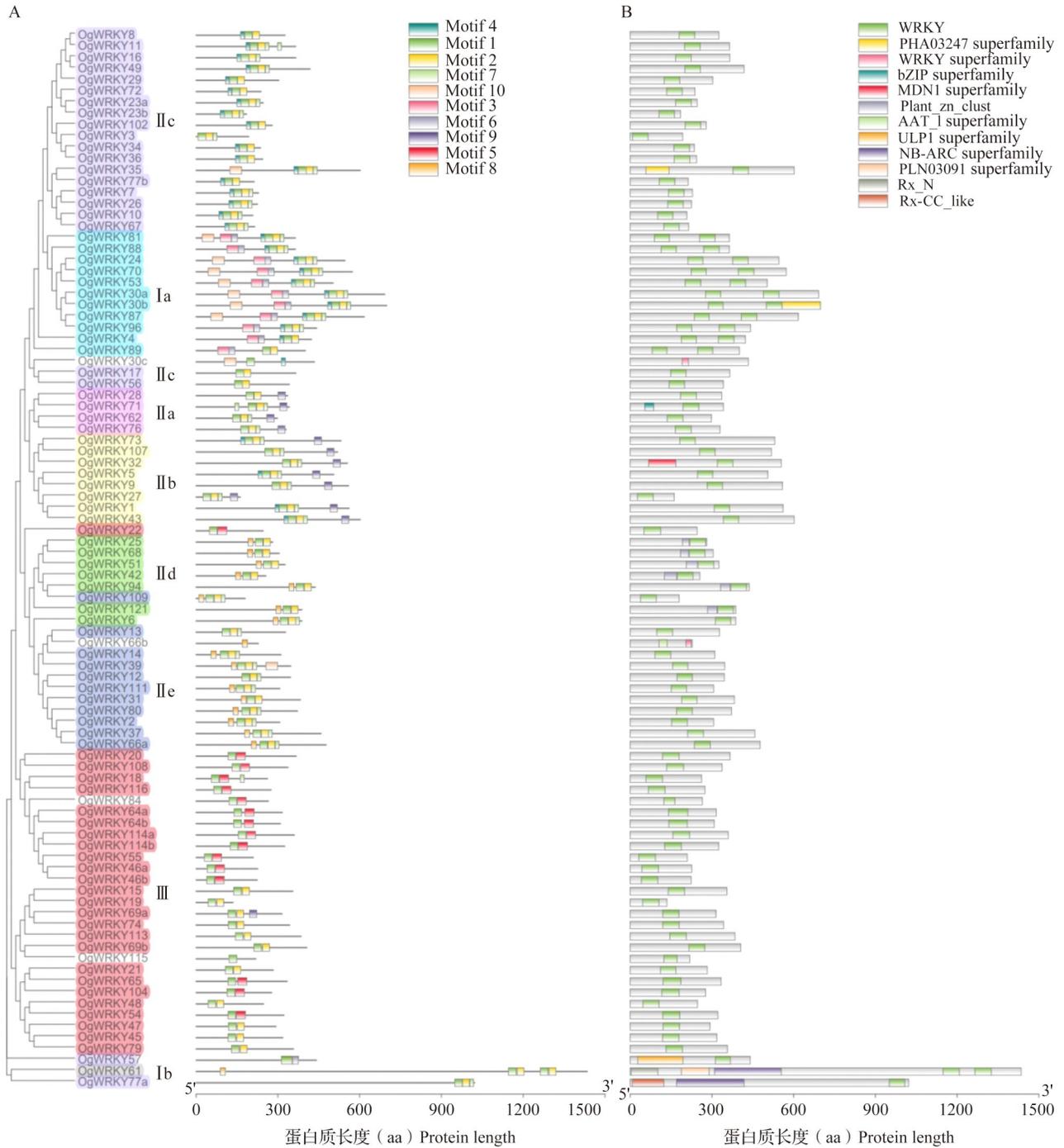
OgWRKY24、OgWRKY31、OgWRKY39、OgWRKY53、OgWRKY70、OgWRKY81、OgWRKY88、OgWRKY96、和OgWRKY111同时富集在MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)(图6)。除OgWRKY30c的WRKY结构域不完整,功能可能丧失外,这些基因可能在疣粒野生稻抗病抗中具有重要作用。

## 2.7 OgWRKYs 基因的启动子区域顺式元件分析

进一步对上述除OgWRKY30c外的13个基因起始密码子上游2000 bp序列中5个与植物防御应答有关的顺式作用元件进行分析,发现在9个基因中(OgWRKY12、OgWRKY24、OgWRKY30b、OgWRKY53、OgWRKY70、OgWRKY81、OgWRKY88、OgWRKY96和OgWRKY111)鉴定到茉莉酸甲酯应答元件(TGACG/CGTCA-motif)。在OgWRKY30b、OgWRKY53、OgWRKY88和OgWRKY96的启动子中还鉴定到乙烯响应元件(ERE),在OgWRKY111中还鉴定到水杨酸应答元件(TCA),OgWRKY53中鉴定到参与防御和应激反应的TC富集区(TC-rich repeats)(图7)。

## 2.8 OgWRKYs 基因在白叶枯病菌胁迫下的表达分析

为了进一步研究OgWRKY30b、OgWRKY53、OgWRKY88、OgWRKY96和OgWRKY111在白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, Xoo)PXO99胁迫下的表达特征,分别检测这5个基因在接种H<sub>2</sub>O(对照)和白叶枯病菌PXO99后0 h,24 h,48 h和72 h的表达水平(图8)。结果显示,同对照相比,OgWRKY30b在接种白叶枯病菌后24 h、48 h和72 h表达水平显著上升,分别为对照的2.3倍、2.04倍和1.62倍。同对照相比,OgWRKY53在接种白叶枯病菌后48 h表达水平显著上调,为对照的1.44倍,而接种后24 h和72 h与对照无显著差异。同对照相比,OgWRKY88在接种白叶枯病菌后0 h表达水平开始上升,并在24 h和48 h显著上调,分别为对照的2.21倍和1.91倍,72 h后与对照无显著差异。同对照相比,OgWRKY96在接种白叶枯病菌后48 h和72 h表达水平降低,分别为对照的0.7倍和0.52倍。同对照相比,OgWRKY111在接种白叶枯病菌后24 h、48 h和72 h后表达水平显著上升,分别为对照的2倍、3.28倍和1.9倍。以上结果表明,OgWRKY30b、OgWRKY53、OgWRKY88和OgWRKY111基因的表达均受白叶枯病菌PXO99诱导,而OgWRKY96表达受白叶枯病菌侵染抑制。

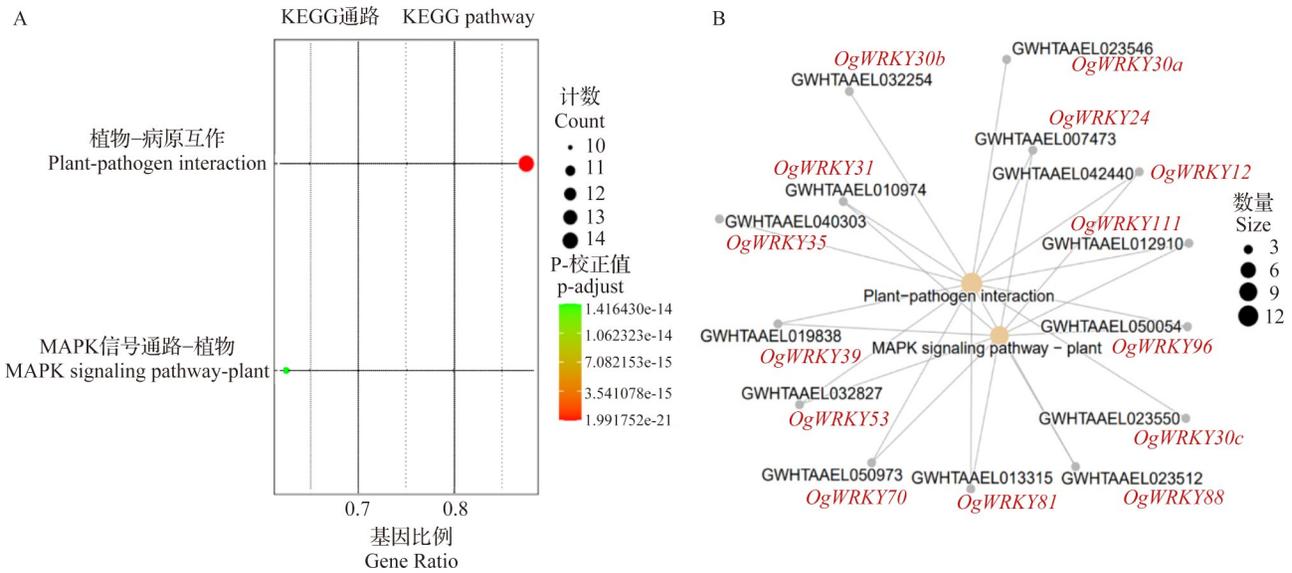


系统发育树中,青色代表Ia亚组,灰色代表Ib亚组,粉色代表IIa亚组,黄色代表IIb亚组,紫色代表IIc,绿色代表IId亚组,蓝色代表IIe亚组,红色代表III组,白色代表IV组

In phylogenetic trees, cyan shading represents subgroup Ia, gray represents subgroup Ib, pink represents subgroup IIa, yellow represents subgroup IIb, purple represents subgroup IIc, green represents subgroup IId, blue represents subgroup IIe, red represents group III, and white represents group IV

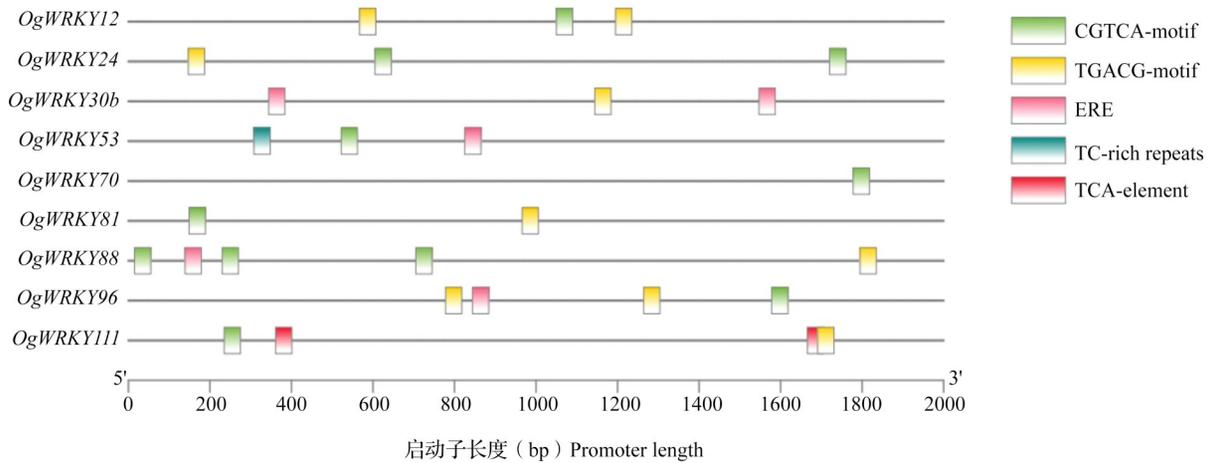
图5 OgWRKYs 保守基序 (A) 和保守结构域 (B)

Fig.5 Conserved motif (A) and conserved domain(B) of OgWRKYs



A: KEGG 富集到的两个通路; B: KEGG 的植物-病原互作通路和 MAPK 信号通路中富集到的 *OgWRKYs*  
 A: Two pathways enriched by KEGG; B: *OgWRKYs* enriched in KEGG's plant-pathogen interaction and MAPK signaling pathway-plant

图 6 *OgWRKYs* KEGG 富集分析  
 Fig.6 KEGG enrichment analysis of *OgWRKYs*

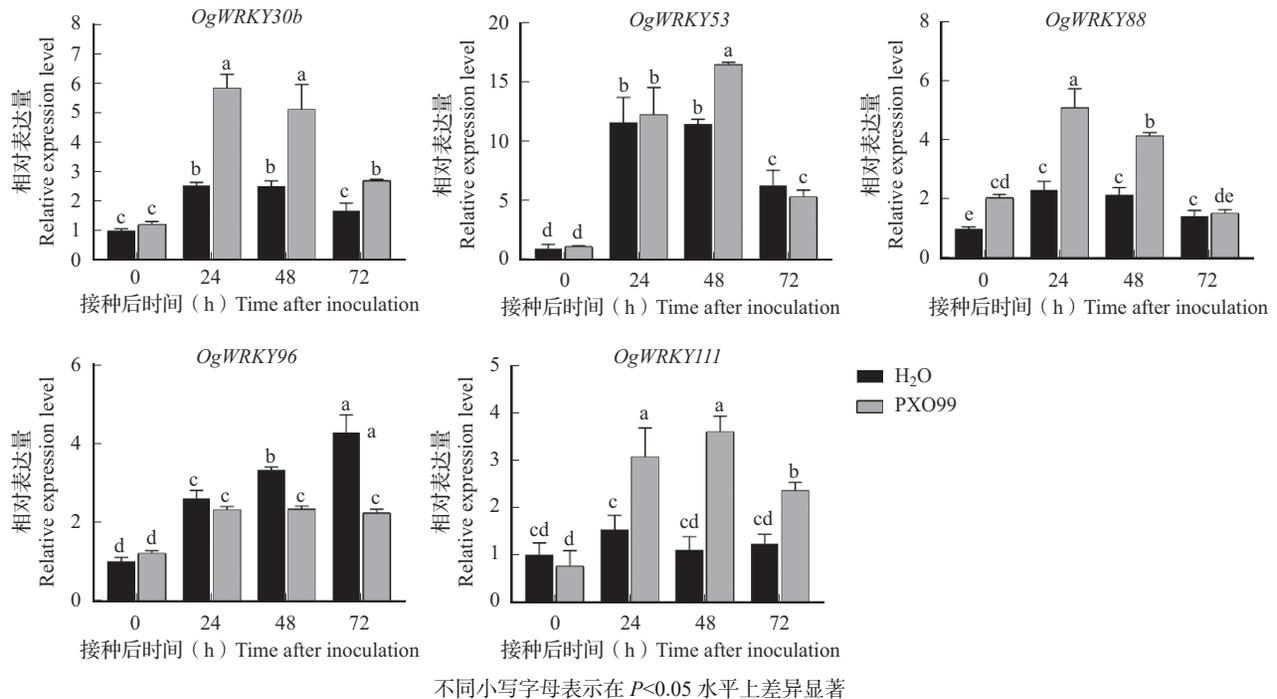


TGACG-motif: 茉莉酸甲酯响应元件; CGTCA-motif: 茉莉酸甲酯响应元件; TCA 元件: 水杨酸响应元件; ERE: 乙烯响应元件; TC-rich 重复序列: 防御和应激反应元件

TGACG-motif: MeJA response element; CGTCA-motif: MeJA response element; TCA element :SA response element; ERE: Ethylene response element; TC-rich repeat sequences: Defense and stress response elements

图 7 *OgWRKYs* 基因启动子区顺式元件的鉴定

Fig.7 Identification of *cis*-regulatory elements in the promoter region of the *OgWRKYs* gene



Different lowercase letters indicate significant difference at the  $P < 0.05$  level

图8 疣粒野生稻 *OgWRKYs* 基因接种 PXO99 后的相对表达水平

Fig. 8 Relative expression level of *OgWRKYs* gene in *O. granulata* inoculated with PXO99

### 3 讨论

WRKY 家族是植物成员数量较多的转录因子家族之一,在植物发育和对生物和非生物胁迫的响应中具有重要作用<sup>[43]</sup>。疣粒野生稻具有高抗细菌性条斑病、免疫白叶枯病菌<sup>[44]</sup>、抗虫、耐旱和耐荫等特性<sup>[45-46]</sup>。2018年发表了第1个疣粒野生稻全基因组和不同组织部位转录组数据<sup>[29, 47]</sup>,2020年发表了第2个疣粒野生稻的组学数据<sup>[48]</sup>,这为本研究利用这些数据从基因组水平上系统分析WRKY家族基因提供了条件。

本研究鉴定了94个 *OgWRKYs* 基因,将其分为4组, I (Ia 和 Ib)、II (IIa、IIb、IIc、IId 和 IIe) III、IV 组分别有12、52、26和4个成员。Rinerson 等<sup>[49]</sup>认为 Ia 亚组是 WRKY 家族最原始的祖先,其他亚组的 WRKY 都是从 Ia 亚组蛋白的 C-末端结构域进化而来。本研究的 *OgWRKYs* 系统发育分析显示, IIc 亚组 *OgWRKY35* 的结构域聚集在 IaC 分支中, *OgWRKY57* 的结构域聚集在 IaN 分支中。*OgWRKY* 结构域序列分析结果显示, Ia 亚组蛋白 N 端和 C 端的 WRKY 结构域皆与 IIc 亚组 WRKY 结构域具有一样的锌指模型 (C-X4-C-X22-23-HXH)。推测部分 Ia 亚组 WRKY 基因是由 IIc 亚组 WRKYs 通过复制 WRKY 结构域进化而来,部分 IIc 亚组的 WRKY 基通过 Ia 亚组丢失 N 端 WRKY 结构域进化

而来,支持 Xu 等<sup>[50]</sup> 的“Ia 亚组直接从古老的 IIc 亚组 WRKY 基因进化而来,大多数 IIc WRKY 基因从 Ia WRKY 基因进化而来”的假说。先前报道认为, III 组 WRKYs 从 Ia 和 IId 亚组进化而来<sup>[51-52]</sup>。本研究发现疣粒野生稻中 III 组 WRKY 蛋白在 WRKY 结构域树中与 IIc2 和 IId 聚在一个分支,与 Ia 亚组关系较远,并且所有 Ia 亚组 *OgWRKYs* 成员所含锌指结构为 C2H2 类型,而所有 III 组成员所含锌指结构为 C2HC 类型。以及由于绿色鞭毛藻 (*O. lucimarinus*) 仅含有两个分别属于 IIc 亚组和 III 组的 WRKY 基因<sup>[53-54]</sup>,所以本研究认为 III 组 WRKYs 从 IId 亚组进化而来的可能性不大,更倾向于支持 Xu 等<sup>[50]</sup> 的“III 组 *OgWRKYs* 基因从古老的 IIc 亚组进化而来”的观点,这与 Jiang 等<sup>[42]</sup> 药用野生稻的研究结果一致。

Villacastin<sup>[28]</sup> 对稻属 9 个种的 11 个基因组研究发现, WRKY 转录因子 Ib 亚组基因仅特异存在于 AA 基因组中。本研究在 GG 基因组的疣粒野生稻中鉴定到 1 个 Ib 亚组基因 *OgWRKY61*,表明 Ib 亚组基因并非 AA 基因组所特有。除保守的 WRKYGQK 基序外,在稻属不同种的 WRKY 转录因子家族中还报道了 WRKYGEK、WRKYGKK、WKKYGQK、WRMCGQK、WSKYGQK 和 WVKYGQK 变异基序<sup>[28]</sup>。在疣粒野生稻 WRKY 转录因子家族中,除 WRKYGQK 基序外,共鉴定到 WRKYGHK、WRKYGKK、WRKYGEK、WRRYGQK、WRKYAKK

和 WRKYSQK 变异基序, 其中 WRKYGHK、WRRYGQK、WRKYAKK 和 WRKYSQK 是疣粒野生稻中鉴定的新的变异体。然而在稻属 11 个基因组中都鉴定到的 WKYGGQK 基序, 普通野生稻、尼瓦拉野生稻、非洲栽培稻、日本晴、明恢 63 和 R498 鉴定到的 WRMCGQK 基序, 明恢 63、尼瓦拉野生稻和普通野生稻中鉴定到的 WVKYGGQK 基序, 日本晴、明恢 63 和 R498 鉴定到的 WSKYGGQK 基序在疣粒野生稻中没有鉴定到。这些结果表明, 稻属不同种中 WRKYGGQK 基序的进化具有保守性和多样性。

本研究对 94 个 *OgWRKYs* 转录因子进行 KEGG 富集分析, 对其中 13 个富集在植物-病原相互作用通路的 *OgWRKYs* 进一步结合基因启动子区域进行顺式作用元件分析, 推测 *OgWRKY30b*、*OgWRKY53*、*OgWRKY88*、*OgWRKY96* 和 *OgWRKY111* 在疣粒野生稻响应生物和非生物逆境中具有重要作用。在水稻植株中过表达 *OgWRKY30b* 同源基因 *OsWRKY30* 能显著提高水稻植株的耐旱性和白叶枯病抗性<sup>[13, 55]</sup>。过表达 *OgWRKY53* 的同源基因 *OsWRKY53* 的水稻植株叶夹角增加, 株高和叶片中纤维素含量降低, 白叶枯病抗性下降<sup>[56]</sup>, 说明 *OsWRKY53* 负调控厚壁组织细胞壁发育和白叶枯病抗性。*OgWRKY30b* 与水稻同源蛋白 *OsWRKY30* 的氨基酸序列一致性为 56.2%, 两个蛋白在 N 端 WRKY 结构域 (285~343 aa) 中有 15 个氨基酸的差异, 在 C 端 WRKY 结构域 (500~559 aa) 内有 2 个氨基酸的差异, 即 532 aa 的脯氨酸 (P) 替换为谷氨酰胺 (Q), 543 aa 的丝氨酸 (S) 替换为丙氨酸 (A); *OgWRKY53* 与水稻同源蛋白 *OsWRKY53* 的氨基酸序列一致性为 85.4%, 在 N 端 WRKY 结构域 (202~261 aa) 内有 2 个氨基酸的差异, 而 C 端 WRKY 结构域 (367~426 aa) 内氨基酸序列完全一致 (未发表资料)。*OgWRKY30b* 和 *OgWRKY53* 与其水稻同源蛋白 *OsWRKY30* 和 *OsWRKY53* 的氨基酸序列差异是否会导致其功能的异同, 还有待进一步研究。除 *OsWRKY96/85* 受茉莉酸诱导表达<sup>[57]</sup>, *OgWRKY88*、*OgWRKY96* 和 *OgWRKY111* 水稻中同源基因的功能知之甚少。为了进一步验证这 5 个基因的功能, 本研究检测了它们在白叶枯病菌胁迫下的表达水平, 结果发现 *OgWRKY30b*、*OgWRKY53*、*OgWRKY88* 和 *OgWRKY111* 基因的表达均受白叶枯病菌 PXO99 诱导, 而 *OgWRKY96* 表达受白叶枯病菌侵染抑制, 说明这 5 个 WRKY 基因可能参与调控疣粒野生稻对白叶枯病的抗性。疣粒野生稻这些基因的克隆和深入的功能研究将为

全面解析 WRKY 转录因子家族生物学功能提供有价值的信息。

#### 参考文献

- [1] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, Shen Q J. WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, 2010, 15 (5): 247-258
- [2] 黄幸, 丁峰, 彭宏祥, 潘介春, 何新华, 徐炯志, 李琳. 植物 WRKY 转录因子家族研究进展. *生物技术通报*, 2019, 35 (12): 129-143  
Huang X, Ding F, Peng H X, Pan J C, He X H, Xu J Z, Li L. Research progress on family of plant WRKY transcription factors. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(12): 129-143
- [3] 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. *Molecular & General Genetics*, 1994, 244(6): 563-571
- [4] 陈林英, 李佳佳, 王博, 杜婉清, 高梦雪, 刘慧, 檀淑琴, 邱丽娟, 王晓波. WRKY 转录因子在大豆响应生物和非生物胁迫中的功能研究进展. *植物遗传资源学报*, 2022, 23 (2): 323-332  
Chen L Y, Li J J, Wang B, Du W Q, Gao M X, Liu H, Tan S Q, Qiu L J, Wang X B. Research progress on the function of WRKY transcription factor response to biotic and abiotic stresses in soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(2): 323-332
- [5] Eulgem T, Somssich I E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(4): 366-371
- [6] Ross C A, Liu Y, Shen Q J. The *WRKY* gene family in Rice (*Oryza sativa*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49 (6): 827-842
- [7] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten D L, Song Q, Thelen J J, Cheng J, Xu D, Hellsten U, May G D, Yu Y, Sakurai T, Umezawa T, Bhattacharyya M K, Sandhu D, Valliyodan B, Lindquist E, Peto M, Grant D, Shu S, Goodstein D, Barry K, Futrell-Griggs M, Abernathy B, Du J, Tian Z, Zhu L, Gill N, Joshi T, Libault M, Sethuraman A, Zhang X, Shinozaki K, Nguyen H T, Wing R A, Cregan P, Specht J, Grimwood J, Rokhsar D, Stacey G, Shoemaker R C, Jackson S A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 2010, 463 (7278): 178-183
- [8] Niu C F, Wei W, Zhou Q Y, Tian A G, Hao Y J, Zhang W K, Ma B, Lin Q, Zhang Z B, Zhang J S, Chen S Y. Wheat *WRKY* genes *TaWRKY2* and *TaWRKY19* regulate abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35(6): 1156-1170
- [9] Wang D J, Wang L, Su W H, Ren Y J, You C H, Zhang C, Que Y X, Su Y C. A class III WRKY transcription factor in

- sugarcane was involved in biotic and abiotic stress responses. *Scientific Reports*, 2020,10(1):20964
- [10] Dang F F, Wang Y N, She J J, Lei Y F, Liu Z Q, Eulgem T, Lai Y, Lin J, Yu L, Lei D, Guan D Y, Li X, Yuan Q, He S L. Overexpression of CaWRKY27, a subgroup IIe WRKY transcription factor of *Capsicum annuum*, positively regulates tobacco resistance to *Ralstonia solanacearum* infection. *Physiologia Plantarum*, 2014,150(3):397-411
- [11] Qiu Y, Yu D. Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Environmental and Experimental Botany*, 2009,65(1):35-47
- [12] Qiu D Y, Xiao J, Ding X H, Xiong M, Cai M, Cao Y L, Li X H, Xu C G, Wang S P. OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 2007,20:492-499
- [13] Han M, Ryu H S, Kim C Y, Park D S, Ahn Y K, Jeon J S. OsWRKY30 is a transcription activator that enhances rice resistance to the *Xanthomonas oryzae pathovar oryzae*. *Journal of Plant Biology*, 2013,56(4):258-265
- [14] Wang L H, Chen J, Zhao Y Q, Wang S P, Yuan M. OsMAPK6 phosphorylates a zinc finger protein OsLIC to promote downstream OsWRKY30 for rice resistance to bacterial blight and leaf streak. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022,64(5):1116-1130
- [15] Liu X Q, Bai X Q, Wang X J, Chu C C. OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response. *Journal of Plant Physiology*, 2007,164(8):969-979
- [16] Wang S, Han S Y, Zhou X G, Zhao C J, Guo L N, Zhang J Q, Liu F, Huo Q X, Zhao W S, Guo Z J, Chen X J. Phosphorylation and ubiquitination of OsWRKY31 are integral to OsMKK10-2-mediated defense responses in rice. *The Plant Cell*, 2023,35(6):2391-2412
- [17] Shi X T, Xiong Y H, Zhang K, Zhang Y S, Zhang J Q, Zhang L L, Xiao Y T, Wang G L, Liu W D. The ANIP1-OsWRKY62 module regulates both basal defense and Pi9-mediated immunity against *Magnaporthe oryzae* in rice. *Molecular Plant*, 2023,16(4):739-755
- [18] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, Somssich I E. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 2000,5(5):199-206
- [19] Zhang Y J, Wang L J. The WRKY transcription factor superfamily: Its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evolutionary Biology*, 2005,5:1-12
- [20] Wu K L, Guo Z J, Wang H H, Li J. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins. *DNA Research*, 2005,12(1):9-26
- [21] Wang L N, Zhu W, Fang L C, Sun X M, Su L Y, Liang Z C, Wang N, Londo J P, Li S H, Xin H P. Genome-wide identification of WRKY family genes and their response to cold stress in *Vitis vinifera*. *BMC Plant Biology*, 2014,14:103
- [22] Ulker B, Somssich I E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004,7(5):491-498
- [23] Bakshi M, Oelmüller R. WRKY transcription factors. *Plant Signaling & Behavior*, 2014,9(2):e27700
- [24] 王磊, 高晓清, 朱苓华, 周永力, 黎志康. 植物WRKY转录因子家族基因抗病相关功能的研究进展. *植物遗传资源学报*, 2011,12(1):80-85
- Wang L, Gao X Q, Zhu H L, Zhou Y L, Li Z K. Advances in Research on Function of WRKY Transcription Factor Genes in Plant Resistance. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011,12(1):80-85
- [25] 傅明川, 李浩, 陈义珍, 王立国, 柳展基, 刘任重. 海岛棉WRKY转录因子的全基因组鉴定及响应黄萎病菌侵染的表达分析. *植物遗传资源学报*, 2019,20(5):1289-1300
- Fu M C, Li H, Chen Y Z, Wang L G, Liu Z J, Liu R Z. Genome-wide investigation of WRKY transcription factors in *Gossypium barbadense* and their expression patterns in response to *Verticillium dahliae* infection. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019,20(5):1289-1300
- [26] Wu K L, Guo Z J, Wang H H, Li J. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins. *DNA Research*, 2005,12(1):9-26
- [27] Xie Z, Zhang Z L, Zou X L, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen Q J. Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiology*, 2005,137(1):176-189
- [28] Villacastin A J, Adams K S, Boonjue B, Rushton P, Han M, Shen J Q. Dynamic differential evolution schemes of WRKY transcription factors in domesticated and wild rice. *Scientific Reports*, 2021,11:14887
- [29] Wu Z G, Fang D M, Yang R, Gao F, An X Y, Zhuo X X, Li Y F, Yi C D, Zhang T, Liang C Z, Cui P, Cheng Z K, Luo Q. De novo genome assembly of *Oryza granulata* reveals rapid genome expansion and adaptive evolution. *Communications Biology*, 2018,1(1):84
- [30] Cheng X J, He B, Chen L, Xiao S Q, Fu J, Chen Y, Yu T Q, Cheng Z Q, Feng H. Transcriptome analysis confers a complex disease resistance network in wild rice *Oryza meyeriana* against *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. *Scientific Reports*, 2016,6:38215
- [31] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, Somssich I, Somssich I E. WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 2000,5(5):199-206
- [32] Alonge M, Lebeigle L, Kirsche M, Jenike K, Ou S, Aganezov S, Wang X, Lippman Z B, Schatz M C, Soyk S. Automated assembly scaffolding using RagTag elevates a new tomato system for high-throughput genome editing. *Genome Biology*, 2022,23:258
- [33] Chao J T, Li Z Y, Sun Y H, Aluko O O, Wu X R, Wang Q, Liu G S. MG2C: A user-friendly online tool for drawing

- genetic maps. *Molecular Horticulture*, 2021, 1(1):16
- [34] Yu G C. Using ggtree to visualize data on tree-like structures. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2020, 69(1):e96
- [35] 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. *Methods (San Diego, Calif.)*, 2001, 25(4):402-408
- [36] van Loon L C, Rep M, Pieterse C M J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, 44:135-162
- [37] 崔荣秀, 张议文, 陈晓倩, 谷彩红, 张荃. 植物bZIP参与胁迫应答调控的最新研究进展. *生物技术通报*, 2019, 35(2):143-155  
Cui R X, Zhang Y W, Chen X Q, Gu C H, Zhang Q. The latest research progress on the stress responses of bZIP involved in plants. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35:143-155
- [38] Chen Z, Suzuki H, Kobayashi Y, Wang A C, DiMaio F, Kawashima S A, Walz T, Kapoor T M. Structural insights into Mdn1, an essential AAA protein required for ribosome biogenesis. *Cell*, 2018, 175(3):822-834
- [39] Mickolajczyk K J, Olinares P D B, Niu Y, Chen N, Warrington S E, Sasaki Y, Walz T, Chait B T, Kapoor T M. Long-range intramolecular allostery and regulation in the dynein-like AAA protein Mdn1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(31):18459-18469
- [40] Elmore Z C, Donaher M, Matson B C, Murphy H, Westerbeck J W, Kerscher O. Sumo-dependent substrate targeting of the SUMO protease Ulp1. *BMC Biology*, 2011, 9:74
- [41] 郝炜. 马铃薯抗病蛋白Rx与其辅因子RanGAP2结合机制的结构生物学研究. 北京: 中国农业大学, 2014  
Hao W. Structural study of the interaction mechanism between potato disease resistance protein Rx with its cofactor RanGAP2. Beijing: China Agricultural University, 2014
- [42] Jiang C M, Shen Q X J, Wang B, He B, Xiao S Q, Chen L, Yu T Q, Ke X, Zhong Q F, Fu J, Chen Y, Wang L X, Yin F Y, Zhang D Y, Ghidan W, Huang X Q, Cheng Z Q. Transcriptome analysis of WRKY gene family in *Oryza officinalis* Wall ex Watt and WRKY genes involved in responses to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* stress. *PLoS ONE*, 2017, 12(11):e188742
- [43] Jiang J J, Ma S H, Ye N H, Jiang M, Cao J S, Zhang J H. WRKY transcription factors in plant responses to stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2017, 59(2):86-101
- [44] 李定琴, 陈玲, 李维蛟, 柯学, 余腾琼, 李娥贤, 黄兴奇, 程在全. 云南3种野生稻中抗白叶枯病基因的鉴定. *作物学报*, 2015, 41(3):386-393  
Li D Q, Chen L, Li W J, Ke X, Yu T Q, Li E X, Huang X Q, Cheng Z Q. Identification of bacterial blight resistance gene in Yunnan wild rice. *Acta Agronomica Sinica*, 2015, 41(3):386-393
- [45] Brar D S, Khush G S. Alien introgression in rice. *Plant Molecular Biology*, 1997, 35(1-2):35-47
- [46] Jena K K. The species of the genus *Oryza* and transfer of useful genes from wild species into cultivated rice, *O. sativa*. *Breeding Science*, 2010, 60:518-523
- [47] Yang R, Li J, Zhang H, Yang F, Wu Z G, Zhuo X X, An X Y, Cheng Z Q, Zeng Q C, Luo Q. Transcriptome analysis and functional identification of *Xa13* and *Pi-ta* orthologs in *Oryza granulata*. *The Plant Genome*, 2018, 11(3)
- [48] Shi C, Li W, Zhang Q, Zhang Y, Tong Y, Li K, Liu Y, Gao L. The draft genome sequence of an upland wild rice species, *Oryza granulata*. *Scientific Data*, 2020, 7(1):131
- [49] Rinerson C I, Rabara R C, Tripathi P, Shen Q J, Rushton P J. The evolution of WRKY transcription factors. *BMC Plant Biology*, 2015, 15:66
- [50] Xu H J, Watanabe K A, Zhang L Y, Shen Q X J. WRKY transcription factor genes in wild rice *Oryza nivara*. *DNA research*, 2016, 23(4):311-323
- [51] Brand L H, Fischer N M, Harter K, Kohlbacher O, Wanke D. Elucidating the evolutionary conserved DNA-binding specificities of WRKY transcription factors by molecular dynamics and *in vitro* binding assays. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(21):9764-9778
- [52] Rinerson C I, Rabara R C, Tripathi P, Shen Q J, Rushton P J. The evolution of WRKY transcription factors. *BMC Plant Biology*, 2015, 15:66.
- [53] Zhang H, Jin J P, Tang L, Zhao Y, Gu X C, Gao G, Luo J C. PlantTFDB 2.0: Update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(Database issue):D1114-D1117
- [54] Palenik B, Grimwood J, Aerts A, Rouzé P, Salamov A, Putnam N, Dupont C, Jorgensen R, Derelle E, Rombauts S, Zhou K, Otiillar R, Merchant S S, Podell S, Gaasterland T, Napoli C, Gendler K, Manuell A, Tai V, Vallon O, Piganeau G, Jancek S, Heijde M, Jabbari K, Bowler C, Lohr M, Robbens S, Werner G, Dubchak I, Pazour G J, Ren Q, Paulsen I, Delwiche C, Schmutz J, Rokhsar D, Van de Peer Y, Moreau H, Grigoriev I V. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(18):7705-7710
- [55] Shen H S, Liu C T, Zhang Y, Meng X P, Zhou X, Chu C C, Wang X P. OsWRKY30 is activated by MAP kinases to confer drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*, 2012, 80(3):241-253
- [56] Xie W Y, Ke Y G, Cao J B, Wang S P, Yuan M. Knock out of transcription factor *WRKY53* thickens sclerenchyma cell walls, confers bacterial blight resistance. *Plant Physiology*, 2021, 187(3):1746-1761
- [57] Ryu H, Han M, Lee S, Cho J, Ryoo N, Heu S, Lee Y, Bhoo S, Wang G L, Hahn T, Jeon J. A comprehensive expression analysis of the *WRKY* gene superfamily in rice plants during defense response. *Plant Cell Reports*, 2006, 25:836-847