

玫瑰 *RrWRKY47X1-2* 基因克隆及耐盐功能验证

孙超悦¹, 吴其超¹, 马燕¹, 郑心怡¹, 孟皓月¹, 鲁仪增², 刘丹², 臧凤岐^{1*}

1. 山东农业大学林学院, 国家林业局黄河下游造林重点实验室, 山东 泰安 271018

2. 山东省林草种质资源中心, 山东 济南 250100

摘要: 土壤盐渍化是制约植物生长的主要非生物胁迫之一。本研究以玫瑰(*Rosa rugosa*)为材料, 对玫瑰 *RrWRKY47X1-2* 基因的耐盐功能进行研究。该基因编码的蛋白质含有 440 个氨基酸, 属于 WRKY Group IIb 亚家族, 定位于细胞核且具有转录激活活性。200 mM NaCl 胁迫下 *RrWRKY47X1-2* 响应强烈, 在玫瑰叶片中呈双峰表达模式(峰值 4 h 和 72 h)。通过在本氏烟草中异源过表达该基因, 结果发现与野生型相比, 过表达株系(OE47)叶片萎蔫程度轻于野生型(WT), 叶片中丙二醛(MDA)含量降低, 超氧化物歧化酶(SOD)活性和可溶性蛋白含量显著升高, 盐胁迫相关基因表达上调。沉默玫瑰 *RrWRKY47X1-2* 后, 植株盐敏感性增强, 盐胁迫相关基因表达受到抑制。结果表明, *RrWRKY47X1-2*(GenBank 登录号: PX533116)可能通过调控抗氧化系统、渗透平衡及激素通路正向调节植物耐盐性, 研究可为玫瑰耐盐育种提供候选基因。

关键词: 玫瑰; *RrWRKY47X1-2*; 基因过表达; 基因沉默; 盐胁迫

中图法分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2026)05-0878-14

Cloning and Salt Tolerance Function Verification of Gene *RrWRKY47X1-2* from *Rosa rugosa*

SUN Chao-yue¹, WU Qi-chao¹, MA Yan¹, ZHENG Xin-yi¹, MENG Hao-yue¹,
LU Yi-zeng², LIU Dan², ZANG Feng-qi^{1*}

1. College of Forestry/Shandong Agricultural University; Key Laboratory of Afforestation in the Lower Reaches of the Yellow River, State Forestry Administration, Tai'an 271018, China

2. Shandong Provincial Forest and Grassland Genetic Resource Center, Jinan 250100, China

Abstract: Soil salinization is one of the main abiotic stresses that restrict plant growth. This study uses *Rosa rugosa* as a material to investigate the salt tolerance function of the *RrWRKY47X1-2* gene in roses. The protein encoded by this gene contains 440 amino acids and belongs to the WRKY Group IIb. It is located in the nucleus and has transcriptional activation activity. Under 200 mM NaCl treatment, *RrWRKY47X1-2* exhibits a strong response, with a bimodal expression pattern in rose leaves (peaking at 4 h and 72 h). By heterologous overexpression of this gene in *Nicotiana benthamiana*, it is found that compared to the wild type, the overexpressed line (OE47) has less leaf wilting than the wild type (WT), reducing levels of malondialdehyde (MDA), significantly increasing superoxide dismutase (SOD) activity and soluble protein content, and upregulating expression of salt stress-related genes. Virus-induced gene silencing (VIGS) of *RrWRKY47X1-2* in *R. rugosa* increases the plant's salt sensitivity and suppresses the expression of salt stress-related genes. The results indicate that *RrWRKY47X1-2*(GenBank accession number: PX533116) may positively regulate salt tolerance by modulating the antioxidant system, osmotic balance, and hormone pathways, providing a candidate gene for salt-tolerant rose breeding.

Keywords: *Rosa rugosa*; *RrWRKY47X1-2*; gene overexpression; gene silencing; salt stress

全球盐渍土壤面积已达 13.81 亿 hm^2 , 占全球陆地面积的 10.7%^[1]。据统计, 我国盐碱地的总面积约 $3.69 \times 10^7 \text{ hm}^2$ ^[2]。土壤盐渍化作为主要非生物胁迫因素, 严重影响植物生长。盐碱土结构差、肥力低, 易板结, 导致土壤质量下降、生物

多样性减少, 许多植物难以正常生长^[3]。植物在进化过程中, 形成了多种复杂机制以适应盐胁迫环境。因此, 研究植物的耐盐性相关的生理、代谢和分子机制, 解析耐盐基因功能, 是培育和应用耐盐种质资源、降低盐害影响的有效措施, 对

收稿日期: 2025-11-05

修回日期: 2026-09-15

基金项目: 山东省重点研发计划项目“林草种质资源精准鉴定与创新利用”(2024LZGC003); 国家自然科学基金委员会, 青年科学基金项目(C类)(32501683)

第1作者简介: 孙超悦(2001-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 森林培育。E-mail: sunchaoyue@sndjydh.wecom.work

*通讯作者: Author for correspondence. E-mail: fqzang@sdau.edu.cn

于盐碱地开发具有重要意义。玫瑰(*Rosa rugosa*)是蔷薇科蔷薇属植物,具有重要的观赏、生态及经济价值。玫瑰原产于我国吉林、辽宁和山东,自然分布在土壤含盐量较高的沿海地区,环境适应能力强,具有较强的耐盐、耐旱、耐瘠薄能力,是研究植物耐盐分子机制的良好物种。

植物能通过复杂的反应机制在盐胁迫下调节自身的生理反应,以应对胁迫带来的损伤,其中涉及多条信号诱导和代谢途径。在盐胁迫下,外源胁迫信号与内源发育信号相互结合,并通过 Ca^{2+} 、ROS等传递信号,利用转录因子进行转录调控,最终调控相关功能基因,达到增强植物细胞的抗渗透压能力、减弱过氧化损伤等目的^[4]。在此过程中,转录因子作为植物信号传导的重要参与者,对转录过程产生促进或者阻遏的作用。以往的研究发现许多类型的转录因子与植物对盐胁迫的响应有关,如MYB、bZIP、NAC、bHLH和WRKY。

WRKY转录因子家族主要存在于被子植物中,在植物的胁迫响应和生长发育方面起到重要作用^[5,6]。研究表明,在盐胁迫下,许多WRKY转录因子通过调节生理变化如抗氧化能力、光合效率等,完成对自身的保护^[7]。例如,拟南芥中的*TaWRKY19*基因可影响*DREB2A*、*RD29A*、*RD29B*和*Cor6.6*等基因表达,从而调控植株对盐、干旱和冷胁迫的耐受性^[8]。WRKY46通过上调*ABAI4*的表达和调节生长素结合基因来调节盐胁迫下的拟南芥侧根发育和生长素稳态^[9]。FcWRKY40通过调控*SOS2*和*P5CS1*在金桔(*Fortunella crassifolia*)中的耐盐性发挥正向调控作用^[10]。SIWRKY8通过调节番茄(*Solanum lycopersicum*)的抗氧化性、气孔开合及细胞内渗透物质对盐胁迫和干旱胁迫进行正向调节^[11]。RtWRKY23不仅通过维持长叶红砂(*Reaumuria trigyna*)的ROS和渗透平衡来增强盐胁迫耐受性,而且参与了盐胁迫下开花的调控^[12]。综上所述,WRKY基因家族广泛参与植物对盐胁迫的响应。玫瑰具有较强的耐受不良环境的能力,然而作为一种非模式植物,针对*RrWRKYs*基因耐盐相关的分子生物学研究和基因挖掘工作却很少。

本研究对玫瑰进行了盐胁迫实验,发现玫瑰*RrWRKY47X1-2*基因对盐胁迫敏感,其表达迅速被激活,推测该基因在玫瑰中参与耐盐调控。利

用异源过表达模式植物及VIGS基因沉默玫瑰对其功能进行进一步鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为二年生玫瑰扦插苗,用于基因克隆及表达模式分析。实验前置于光照培养箱中预培养,培养条件为光周期16 h光照/8 h黑暗(昼温25℃/夜温23℃),相对湿度60%,该材料用于后续基因克隆及盐胁迫下基因表达模式分析实验。使用一年生玫瑰扦插苗,通过基因沉默技术进行功能分析,上述植物材料均种植于山东农业大学林学试验站。培养一批4周苗龄的本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)用于亚细胞定位实验及异源转化介导的基因功能研究,其培养条件同上述玫瑰植株。

大肠杆菌菌株DH5 α 、农杆菌菌株GV3101、酵母菌株Y2HGold均购自上海唯地生物技术有限公司。克隆载体pCE2 TA/Blunt-Zero Vector用于基因片段克隆;病毒诱导的基因沉默(VIGS)载体pTRV1与pTRV2用于基因沉默实验;重组过表达载体pBI121-GFP用于目的基因过表达及亚细胞定位分析;pGBKT7载体用于转录激活活性检测。

1.2 盐胁迫下*RrWRKY47X1-2*基因的表达分析

使用200 mM NaCl溶液对玫瑰植株进行盐胁迫处理,分别于0 h、4 h、8 h、12 h、24 h、72 h提取叶片总RNA,使用反转录获得cDNA。

利用Primer Premier 5.0软件设计实时荧光定量PCR引物(序列见表1);内参基因选用*RrGAPDH*,实验设置3次生物学重复。qRT-PCR反应体系与反应程序见诺唯赞ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix说明书。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算相对表达量,使用SPSS进行数据显著性分析。

1.3 *RrWRKY47X1-2*基因克隆及生物信息学分析

从玫瑰叶片中提取总RNA,参照逆转录试剂盒说明书进行实验,合成cDNA第一条链。基于玫瑰基因组序列信息^[13],利用Primer premier 5软件设计*RrWRKY47X1-2*基因克隆的特异性引物(表1),以合成的cDNA为模板对目标基因片段进行PCR扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳验证

后,使用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒进行回收纯化。上述实验过程中用到的试剂盒与高保真 DNA 聚合酶均由南京诺唯赞生物科技股份有限公司提供。高保真将纯化后的目的基因片段通过 5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit,克隆至 pCE2 TA/Blunt-Zero Vector 载体中,构建重组克隆载体;随后将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布于含卡那霉素(Kan)的 LB 固体培养基平板上,37 °C 倒置培养过夜以筛选阳性单菌落。挑取形态正常的单菌落进行菌落 PCR 验证,将验证阳性的克隆菌液送测序公司进行序列测定,确保目的基因序列无误。

通过 NCBI 数据库与 MEGA 7.0 软件,获取与 RrWRKY47X1-2 蛋白同源性较高的其他物种同源蛋白序列并利用系统发育树分析其进化关系;使用 DNAMAN 8.0 软件对 RrWRKY47X1-2 基因的结构特征进行分析;通过在线工具 ProtParam 预测分析 RrWRKY47X1-2 基因编码蛋白质理化性质;采用在线亚细胞定位预测工具 WOLF PSORT 对 RrWRKY47X1-2 蛋白的潜在定位区域进行预测。

1.4 RrWRKY47X1-2 的亚细胞定位和转录激活活性验证

将去除终止子的 RrWRKY47X1-2 CDS 序列,定向插入 pBI121-GFP 载体构建重组载体 pBI121-RrWRKY47-GFP(空载体 pBI121-GFP 为对照),转化至根癌农杆菌 GV310 后,瞬时侵染 4 周龄本氏烟草叶片。暗培养 60 h 后,制作烟草叶片下表皮细胞临时装片(制作前已用 DAPI 给叶片染色),在 Nikon C2-ER 激光共聚焦显微镜的 488 nm 和 405 nm 波长下,使用 20 倍物镜观察细胞中的荧光分布。

将 RrWRKY47X1-2 全长 CDS 序列融合到 pGBKT7 载体的 GAL4 DNA 结合结构域,转化酵

母菌 Y2HGold 感受态。使用 SD/-Trp 培养基筛选阳性菌落,用 1 mL 无菌 ddH₂O 重悬,OD₆₀₀ 调至 0.2,随后依次稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍,分别在 SD/-Trp 培养基和 SD/-Trp-Ade-His/X- α -gal 培养基上进行点板培养,通过酵母的生长和 X- α -gal 染色情况检测转录激活活性。

1.5 转基因本氏烟草稳定遗传转化株系的获得与胁迫处理

在无菌操作台上,将野生型(WT)本氏烟草种子接种于 MS 培养基,于 25 °C、16 h 光/8 h 暗条件下培养 30 d 获得无菌苗。参照 1.4 构建的 pBI121-GFP 与 pBI121-RrWRKY47-GFP 载体,采用农杆菌叶盘法侵染烟草叶片,使用含有 Kan 的培养基对愈伤组织及组培苗进行选择以获取转基因烟草。提取植株基因组 DNA(参照诺唯赞基因组 DNA 提取试剂盒),经 PCR 验证目的基因整合;提取总 RNA 逆转录为 cDNA,通过 qRT-PCR 检测目的基因的相对表达量,筛选过表达效率较高的株系用于后续实验。采用根部浇灌法,用 200 mM NaCl 处理转基因与 WT 植株,于 0 h、4 h、8 h、12 h、24 h、72 h 取样(每个时间点取 3 次生物学重复),液氮速冻后,-80 °C 保存备用。

1.6 盐胁迫下转基因烟草的相关生理指标及基因表达检测

使用考马斯亮蓝 G-250 法测定样品中可溶性蛋白含量,使用氮蓝四唑光还原法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性,使用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定样品中膜脂过氧化产物(MDA)含量。

通过 NbenBase (<https://nbenhamiana.jp>) 获取本氏烟草基因组数据,筛选烟草中的盐胁迫相关基因 NbCAT3、NbAPX2、NbNHX1、NbP5CS、NbSAPK2、NbGPX、NbAREB、NbLEA 序列,以 NbActin 为内参基因,通过 qRT-PCR 检测转基因烟草受盐胁迫处理后相关基因的表达变化趋势。

表 1 实验涉及引物序列及用途

Table 1 Primer sequences involved in this study and their purposes

引物名称 Primer name	核苷酸序列(5'-3') Nucleotide sequence	用途 Purpose
RrWRKY47X1-2-F	ATGGATGAACAACGCTGTGAC	RrWRKY47X1-2 基因克隆
RrWRKY47X1-2-R	TTAGGTGGTGGAGAAAGTGGTAC	
P-RrWRKY47X1-2-F	gagaacacgggggactctagaATGGATGAACAACGCTGTGACTT	pBI121-RrWRKY47X1-2 载体构建
P-RrWRKY47X1-2-R	ggactgaccacccggggatccGGTGGTGGAGAAAGTGGTGCA	
T-RrWRKY47X1-2-F	tgcccgggcctcgaggatccCTAGTTGAATCCCCAATAAAAGAAGA	pTRV2-RrWRKY47X1-2 载体构建
T-RrWRKY47X1-2-R	aaggttaccgaattctctagaGATCAAGATTGCTGTCTCTGCAC	

续表

引物名称 Primer name	核苷酸序列(5'-3') Nucleotide sequence	用途 Purpose
pBI121-F pBI121-R	GACGCACAATCCCACTATCC GTAAAACGACGGCCAGTGAA	pBI121 载体通用引物
TRV1-F TRV1-R TRV2-F TRV2-R GFP-F GFP-R	TTACAGGTTATTTGGGCTAG CCGGGTCAATTCCTTATC TGGGAGATGATACGCTGTT CCTAAACTTCAGACACG ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA CTTGTACAGCTCGTCCATGCC	TRV 分子检测
qRT- <i>RrWRKY47X1-2</i> -F qRT- <i>RrWRKY47X1-2</i> -R	TTTCTGGGGCTCAGTAGTA CTTCGTATTCTCGCTGTAAC	基因沉默及过表达效率检测
qRT- <i>RrGAPDH</i> -F qRT- <i>RrGAPDH</i> -R	TTCTGCCTGCTCTCAATG TGCCTTCTTCTCAAGTCTG	玫瑰内参基因
<i>NbCAT3</i> -F <i>NbCAT3</i> -R <i>NbAPX2</i> -F <i>NbAPX2</i> -R <i>NbNHX1</i> -F <i>NbNHX1</i> -R <i>NbP5CS</i> -F <i>NbP5CS</i> -R <i>NbSAPK2</i> -F <i>NbSAPK2</i> -R <i>NbGPX</i> -F <i>NbGPX</i> -R <i>NbAREB</i> -F <i>NbAREB</i> -R <i>NbLEA</i> -F <i>NbLEA</i> -R	CCAAATCCAAAGTCCCA ACACCGAGATCATCAAAACA TGATGTTCCCTTTACCCC TCAGATAGACCCATTTGCTT ACCGCTGGATAAATGAGTC ATGGCTGGAGCAAATGTA GCACTTGGAAGATTGGG ATCTAAGCCGCTGACGA AACCCAAATCTACAGTAGGAAC AACCCACAAGACCAAAC GATGCTAAGGGTAATGATGTC TTCCTGCCACCAAACCT TTGCTGGTGGAATGTAAGTGC GGAATGTAACATCCTTTGAGTATCG GGATCTAATTGACAAGGCGAAG CTCGCCGCTATAAGAGAGAG	烟草盐胁迫相关基因 qRT-PCR
<i>NbActin</i> -F <i>NbActin</i> -R	GGCTTACATTGCTCTTGACTATGAAC ATCAGGCAGCTCGTAGCTCTTCT	烟草内参基因
<i>RrHKT1</i> -F <i>RrHKT1</i> -R <i>RrGA2ox7</i> -F <i>RrGA2ox7</i> -R <i>RrGAI</i> -F <i>RrGAI</i> -R <i>RrSAPK</i> -F <i>RrSAPK</i> -R <i>RrGPX1</i> -F <i>RrGPX1</i> -R <i>RrNHX1</i> -F <i>RrNHX1</i> -R	ACCTTTTCGTTTCCTACTCT TCCTGGTTTTGTGACCCT TTGAAGGACTTGGAATGC CCACTTACCCTCTTTTGATC AGGAGCAAGAATCTGGAAG CGGATGGGTGTAATGAA CATTACAACCCAAATCAAC CATCTGCTATCTTCCCATCA TATAAAGCCGAATACCCC GTCACCTAAGAAACCTCCC GCATTATGTCAGACCCACCCTC AACAAAACCCGACCACCA	玫瑰盐胁迫相关基因 qRT-PCR
bd- <i>RrWRKY47X1-2</i> -F bd- <i>RrWRKY47X1-2</i> -R	tcagaggaggacctgcatatgATGGATGAACAACGCTGTGACTT ccgctgcaggtcgacggatccGGTGGTGAGAAAGTGGTGCA	pGBKT7- <i>RrWRKY47X1-2</i> 载体构建

注:小写字母为同源重组构建时载体上下游末端的同源序列;下划线序列中,‘tctaga’(XbaI)和‘ggatcc’(BamHI)为 pBI121、pTRV2 载体构建时线性化所用酶切位点,‘catatg’(NdeI)和‘ggatcc’(BamHI)为 pGBKT7 载体构建时线性化所用酶切位点。

Note: The lowercase letters represent the homologous sequences at the upstream and downstream ends of the vector during homologous recombination construction; in the underlined sequences, ‘tctaga’ (XbaI) and ‘ggatcc’ (BamHI) are the restriction enzyme sites used for linearization when constructing the pBI121 and pTRV2 vectors, and ‘catatg’ (NdeI) and ‘ggatcc’ (BamHI) are the restriction enzyme sites used for linearization when constructing the pGBKT7 vector.

1.7 病毒诱导基因沉默(VIGS)对玫瑰基因的功能验证

选择目的基因中的 280 bp 特异性序列构建重组 TRV2-*RrWRKY47*-GFP 载体,转化农杆菌 GV3101。选取长势一致的一年生玫瑰苗,通过真空渗透法侵染玫瑰植株,压强 25 KPa,每株处理 2 min。处理完成后将植株黑暗处理 24 h。后续与对照植株保持一致的正常管理。侵染 10 d 后,使用 LUYOR-3415RG 双波长荧光蛋白激发光源检测 GFP 荧光并通过 qRT-PCR 检测沉默基因的效率,选取基因沉默成功植株进行 200 mM 盐胁迫处理。

分别在 0 h、4 h、8 h、12 h、24 h 进行取样,每组 3 个生物学重复,通过 qRT-PCR 分析目的基因被沉默前后随时间的表达情况及变化趋势。

筛选和盐胁迫相关基因 *RrHKT1*、*RrGA2ox7*、*RrGAI*、*RrSAPK*、*RrGPX1*、*RrNHX1* 序列,通过

qRT-PCR 检测基因沉默后玫瑰受盐胁迫处理后相关基因的表达变化趋势。

1.8 统计分析方法

各试验设 3 次生物学重复,结果以平均值表示;数据分析采用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析,图表绘制使用 Origin 2021 软件,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 *RrWRKY47X1-2* 基因克隆及生物信息学分析

以玫瑰叶片的 cDNA 为模板,克隆得到目的基因 *RrWRKY47X1-2*。玫瑰 *RrWRKY47X1-2* 基因全长为 1-1323bp(图 1),可编码 440 个氨基酸,含有一个 WRKYGQK 保守结构域,根据其保守结构域类型,将 *RrWRKY47X1-2* 归类为 Group IIb。

```

atg gat gaa caa cgc tgt gac ttg aaa cac ttg cac tcg gac cag agc ttt ctg ggg ctc
M D E Q R C D L K H L H S D Q S F L G L
agt agt agt tcc gat cat cgt cta gtt gaa ccc cca ata aaa gaa gaa aca tta ttc aaa
S S S S D H R L V E P P I K E E T L F K
gag atc aaa gaa gtt gat ttc ttt tcc aat aat aga ctt ccc gat caa cgc gcg cct ggt
E I K E V D F F S N N R L P D Q P A P G
cat gca gag ctg acc act ctt cag ctt caa gtt gag tta cag cga gaa tac gaa gag aat
H A E L T T L Q L Q V E L Q R E Y E E N
caa aag ctc aga acc atg ttg gac caa atc acc aaa agc tac aat ggg ttg cag gct cag
Q K L R T M L D Q I T K S Y N G L Q A Q
ctg cgc atg atc aga ctt caa aag cag ctg caa act tgt gca gaa gac agc att aat ctt
L R M I R L Q K Q L Q T C A E D S I N L
gat cgc aag tta tcc ttc cta cat gat gac caa tcc ccc aaa agt agt tct cat cac gat
D P K L S F L H D D Q S P K S S H H D
cat gat caa gaa caa gtt ctt gct gct act gat cat gat cag gtt cct tca aga agg gct
H D Q E Q V L A A T D H D Q V P S R R A
agg gtc tcc gta cga gca aga tcg gaa gct ccc atg att agc gat gga tgt caa tgg agg
R V S V R A R S E A P M I S D G C Q W R
aaa tac ggt caa aag atg gcc aag ggt aat cct tgt ccc cgt gct tac tat cgc tgc act
K Y G Q K M A K G N P C P R A Y Y R C T
atg ttc gct gga tgc ccc gtt cgg aaa cag gtc caa aga atg gca gag gac aag acc att
M F A G C P V R K Q V Q R M A E D K T I
ctg ata aca aca tat gaa ggt aat cac aac cac cct ctt cct gca gct gcg ata tct atg
L I T T Y E G N H N H P L P A A A I S M
gct aat acc aca tca gca gca gca gcc atg ttg ata tcg ggt tca aca acc agc aag gaa
A N T T S A A A M L I S G S T T S K E
gct cat cat cta aca cac cct aca ggc ttg ttc tct ctt cag cgc ctc tat ggt
A H H L T H P T G L F S S L Q P L Y G
tca tcc atg gcc acc ttt tca acc tct gca cca ttt ccc aca atc aca ctg gac atg acc
S M A T F S T S A P F P T I T L D M T
agc gcc cct aac cct aac cct aat ccc atg cag ttc atg cac agt agt gct aca ttt cct
S A P N P N P N P M Q F M H S S A T F P
att cct ttg cag ggt tat aat cat ccc ctt ata aag cac ccc ttg tgt ttg aat atc cct
I P L Q G Y N H P L I K H P L C L N I P
cga cat aat cat gca gcg cta aca cca gcg gca atg caa cta gca gat ctg cag cca ttt
R H N H A A L T P A A M Q L A D L Q P F
cta gaa caa ccc cac ggt tcg atg gtt ggg aca ata act gca gcc att act tct gac cgc
L E Q P H G S M V G T I T A A I T S D P
aag ttc act aca gcc cta gct gct gcc atc tca agt aga atg aat aat att gag aat att
K F T T A L A A A I S S R M N N I E N I
aat gct gga tta caa gga agt acc aat gat att agt tcc ctt aac agt aat ggg aat gag
N A G L Q G S T N D I S S L N S N G N E
gtt tgc gca gca tta tct ggc tcc cca cag ctt cct caa tcc tgt acc act ttc tcc acc
V C A A L S G S P Q L P Q S C T T F S T
acc taa
T

```

图 1 *RrWRKY47X1-2* 基因 CDS 序列及其氨基酸序列

Fig. 1 CDS sequence of *RrWRKY47X1-2* and its amino acid sequence

注:ATG(起始密码子)和 TAA(终止密码子)、WRKY 保守结构域、WRKYGQK 七肽序列及锌指结构已分别用红色、蓝色和紫色的记号标出。

Note: The ATG (start codon) and TAA (stop codon), WRKY conserved domain, WRKYGQK heptapeptide sequence and zinc finger are marked in red, blue and purple, respectively.

使用测序正确的 *RrWRKY47X1-2* 基因编码的蛋白序列,在NCBI数据库找到目的基因的同源蛋白序列。选取17条不同物种的WRKY47蛋白序列与玫瑰 *RrWRKY47X1-2* 蛋白序列比对。进行序列比对对齐后,应用MEGA 7.0运用邻接法构建 *RrWRKY47* 与其同源蛋白的系统进化树。其分析结果显示,月季 *RcWRKY47X2* 蛋白与野生玫瑰 *RrWRKY47X1-2* 蛋白聚为同一分支,二者亲缘关系最近;蕨麻 *PaWRKY47* 与野草

莓 *FvWRKY47X1* 蛋白与上述分支具有共同祖先起源;梅 *PmWRKY47* 蛋白单独形成一个分支;与玫瑰 *RrWRKY47X1-2* 蛋白的亲缘关系相对较远的葡萄 *VuWRKY47X1* 与3种豆科植物的WRKY47蛋白聚类为一支;玫瑰 *RrWRKY47X1-2* 与可可 *TeWRKY47*、榴梿 *DzWRKY47* 等其余同源蛋白的亲缘关系最远(图2)。使用WoLFPSORT在线软件预测 *RrWRKY47X1-2* 蛋白在细胞核中表达。

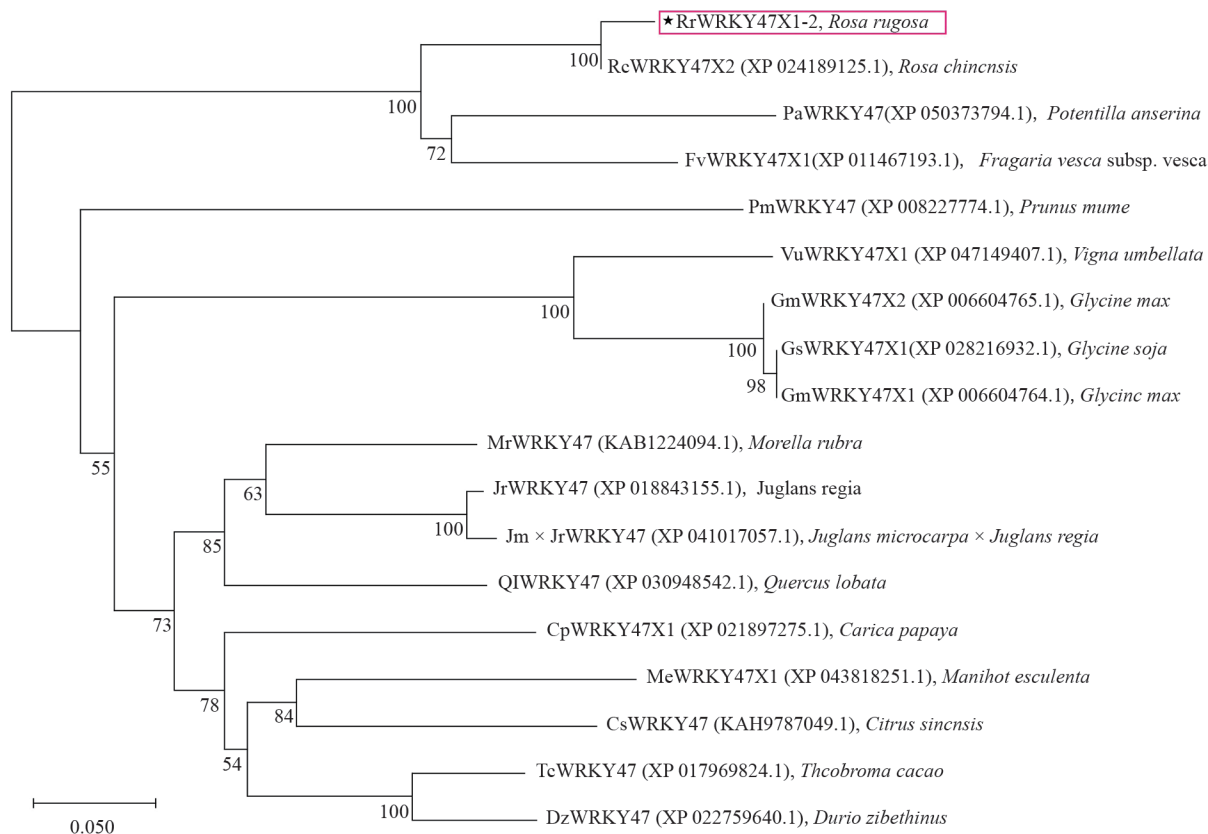


图2 *RrWRKY47X1-2* 与其他同源WRKY蛋白的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *RrWRKY47X1-2* and other homologous WRKYs

注:左下为进化距离标尺(每个位点平均氨基酸替换率为0.050,用于衡量序列间差异程度);分支处下方数字为bootstrap支持率(取值0-100,反映分支聚类可信度);红色框内为目标蛋白。

Note: The scale bar at the bottom left indicates the evolutionary distance (an average amino acid substitution rate of 0.050 per site, which is used to measure the degree of sequence divergence). The numbers below the branches represent bootstrap support values (ranging from 0 to 100, reflecting the reliability of the branch clustering). The red box indicates the target protein.

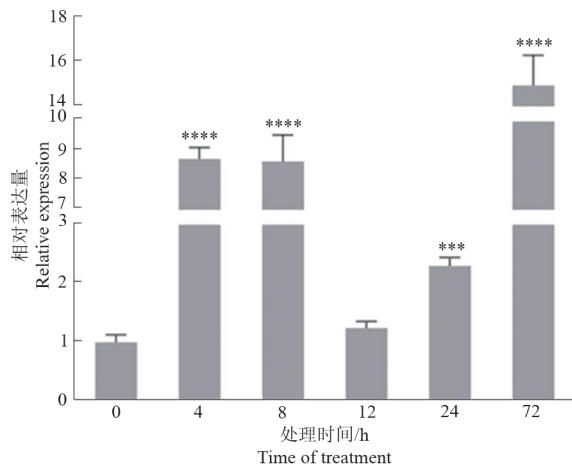
2.2 *RrWRKY47X1-2* 在盐胁迫下的表达模式分析

使用200 mM NaCl处理二年生野生扦插玫瑰苗,通过qRT-PCR分析目的基因在盐胁迫下的表达模式。结果表明 *RrWRKY47X1-2* 对盐胁迫响应体现出上升-下降-上升的模式,在4 h达

到第一个峰值,为对照组的8.7倍,72 h达到第二个峰值,为对照组的14.9倍(图3)。说明 *RrWRKY47X1-2* 对盐胁迫有强烈响应。

2.3 *RrWRKY47X1-2* 的转录激活活性及亚细胞定位

构建pGBKT7-*RrWRKY47X1-2* 载体,转化酵

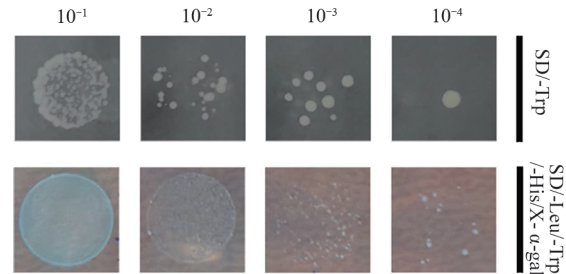
图3 盐胁迫下 *RrWRKY47X1-2* 的表达模式Fig. 3 Expression patterns of *RrWRKY47X1-2* under salt stress

注: *表示 $0.01 < P < 0.05$, **表示 $0.001 < P < 0.01$, ***表示 $0.0001 < P < 0.001$, ****表示 $P < 0.0001$ 。

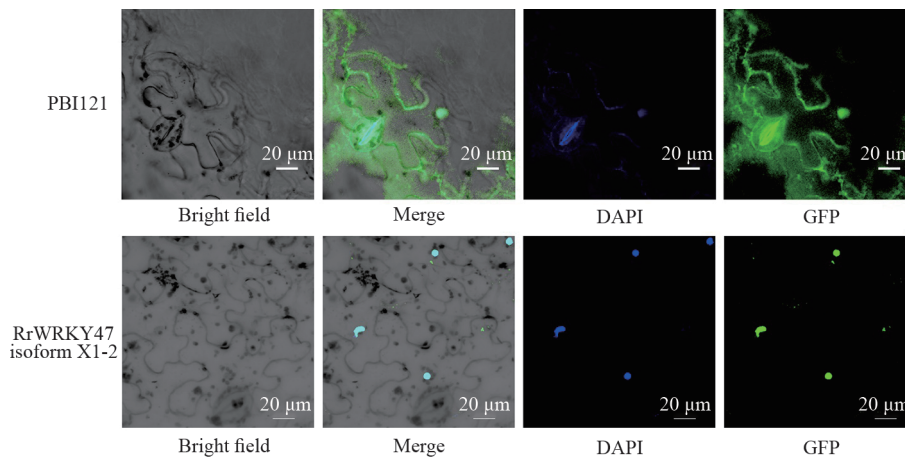
Note: * indicates $0.01 < P < 0.05$, ** indicates $0.001 < P < 0.01$, *** indicates $0.0001 < P < 0.001$, and **** indicates $P < 0.0001$.

母菌感受态 Y2HGold。挑取转化成功能够正常生长在 SD/-Trp 平板上的酵母菌点板于 SD/-Trp-Ade-His/X- α -gal 平板, 发现转入 pGBKT7-

RrWRKY47X1-2 载体的酵母菌可以正常生长, 且在 X- α -gal 作用下变蓝, 说明 *RrWRKY47X1-2* 具备转录激活活性(图4)。

图4 *RrWRKY47X1-2* 的转录激活活性验证Fig. 4 Verification of transcriptional activation activity of *RrWRKY47X1-2*

为了进一步确认 *RrWRKY47X1-2* 蛋白的表达定位, 在共聚焦显微镜下观察使用农杆菌瞬时侵染过的本氏烟草叶片。如图5所示, 在 pBI121-GFP 对照的细胞质和细胞核中能检测到大量绿色荧光信号。*RrWRKY47X1-2*-GFP 在细胞中绿色荧光信号和 DAPI 与 DNA 结合激发的蓝色荧光重合, 说明其定位在细胞核中, 实验结果与预测基本一致。

图5 *RrWRKY47X1-2* 的亚细胞定位Fig. 5 Subcellular localization of *RrWRKY47X1-2*

注: 其中 GFP 为绿色荧光信号, DAPI 与 DNA 结合后可激发蓝色荧光, 显示细胞核位置; Bright field 和 Merge 分别为明场信号和叠加信号。

Note: GFP represents the green fluorescence signal, while DAPI, when combined with DNA, can trigger blue fluorescence, indicating the location of the cell nucleus; Bright field and Merge refer to the bright field signal and the merged signal, respectively.

2.4 过表达 *RrWRKY47X1-2* 可提高本氏烟草耐盐性

本研究利用农杆菌介导的叶盘法获得转基因本氏烟草。检测过表达 *RrWRKY47X1-2* 的植株的过表达效率如图6所示, 表达量显著高于野生型,

而转入 pBI121 的株系则与野生型无明显差异。

使用 200 mM NaCl 溶液对野生型(后称对照组)、转入 pBI121(后称空载体组)、过表达 *RrWRKY47X1-2* 的本氏烟草(后称 OE47)进行盐胁迫(图7)。盐胁迫 120 h 后, 烟草全部存活, 对照组和空载体组

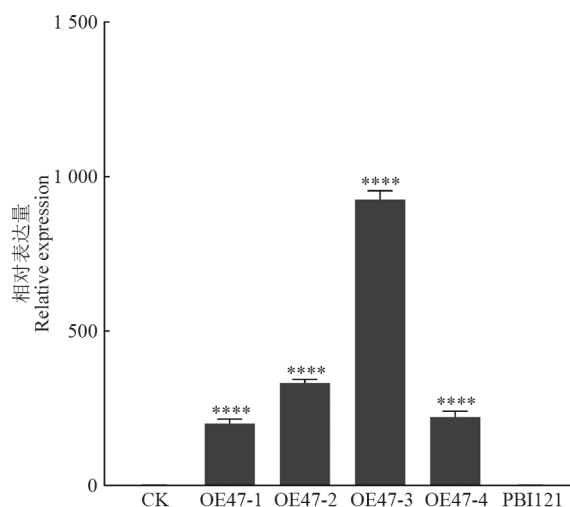


图6 转基因烟草目的基因相对表达量

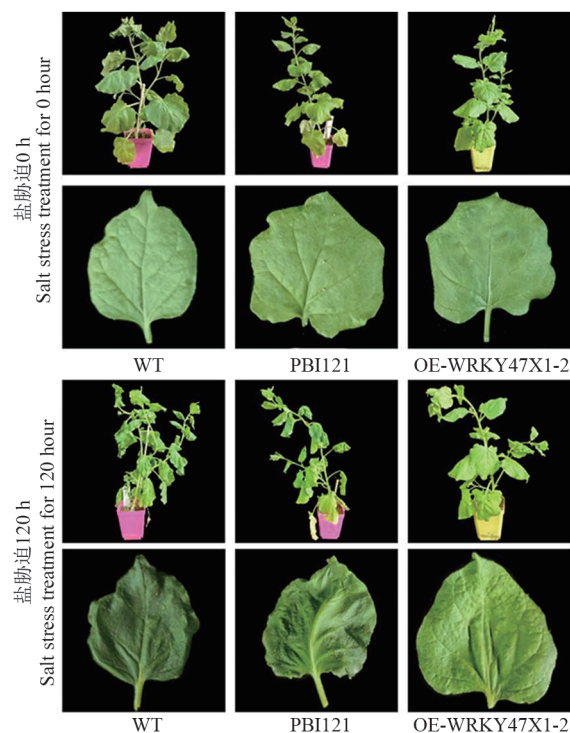
Fig. 6 Relative expression levels of target genes in transgenic *Nicotiana benthamiana*

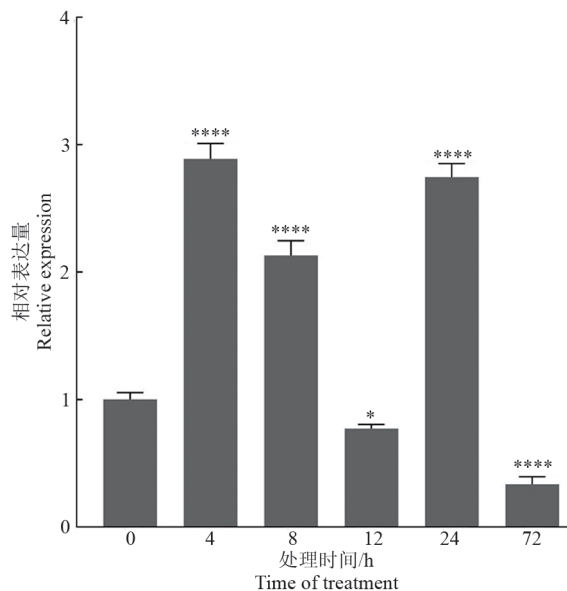
图7 盐胁迫下对照组、空载体组和转基因烟草的表型变化

Fig. 7 Phenotypes of control group, empty carrier group and transgenic *Nicotiana benthamiana* under salt stress

表现出对盐胁迫更加敏感,出现叶片剧烈皱缩失水、茎秆弯曲下垂等明显表型性状的变化。而OE47仅表现出轻微胁迫表型,因此转入 *RrWRKY47X1-2* 能提高烟草对于盐胁迫的耐受能力。

使用 qRT-PCR 检测本氏烟草中 *RrWRKY47X1-2* 在不同时间的表达量变化趋势(图8)。结果

显示,转基因本氏烟草中的 *RrWRKY47X1-2* 受到盐胁迫的诱导,表达量呈现出上升-下降-上升-下降的模式。

图8 盐胁迫下转基因烟草的 *RrWRKY47X1-2* 相对表达量变化趋势Fig. 8 Relative expression trends of *RrWRKY47X1-2* in transgenic *Nicotiana benthamiana* under salt stress

注: *表示 $0.01 < P < 0.05$, **表示 $0.001 < P < 0.01$, ***表示 $0.0001 < P < 0.001$, ****表示 $P < 0.0001$ 。

Note: * indicates $0.01 < P < 0.05$, ** indicates $0.001 < P < 0.01$, *** indicates $0.0001 < P < 0.001$, and **** indicates $P < 0.0001$.

在盐胁迫处理后,本研究比较了不同时间段内对照组、空载体组和OE47本氏烟草叶片中的丙二醛含量、SOD酶活性和可溶性蛋白含量的变化。由图9可知,对照组、空载体组与OE47叶片中的丙二醛含量均呈现出先升高再降低的趋势;在盐胁迫后8 h-24 h,OE47的丙二醛含量显著低于对照组和空载体组。总体上OE47、对照组和空载体组本氏烟草的SOD活性均呈现先升高后降的趋势;相较于对照组和空载体组,OE47的SOD活性升高较早,在4 h前后已经开始显著升高,而对照组和空载体组在8 h前后才有显著变化。盐胁迫下本氏烟草的可溶性蛋白呈现出一种波动上升的趋势。OE47的可溶性蛋白含量较两个对照组升高更快;盐胁迫72 h时,OE47的可溶性蛋白含量仍然略高于另外两组。

以上结果显示,过表达 *RrWRKY47X1-2* 能够有效提高植物的抗氧化能力和渗透压调节能力,从而增强植物对盐胁迫的耐受能力。生理指标测定和烟草

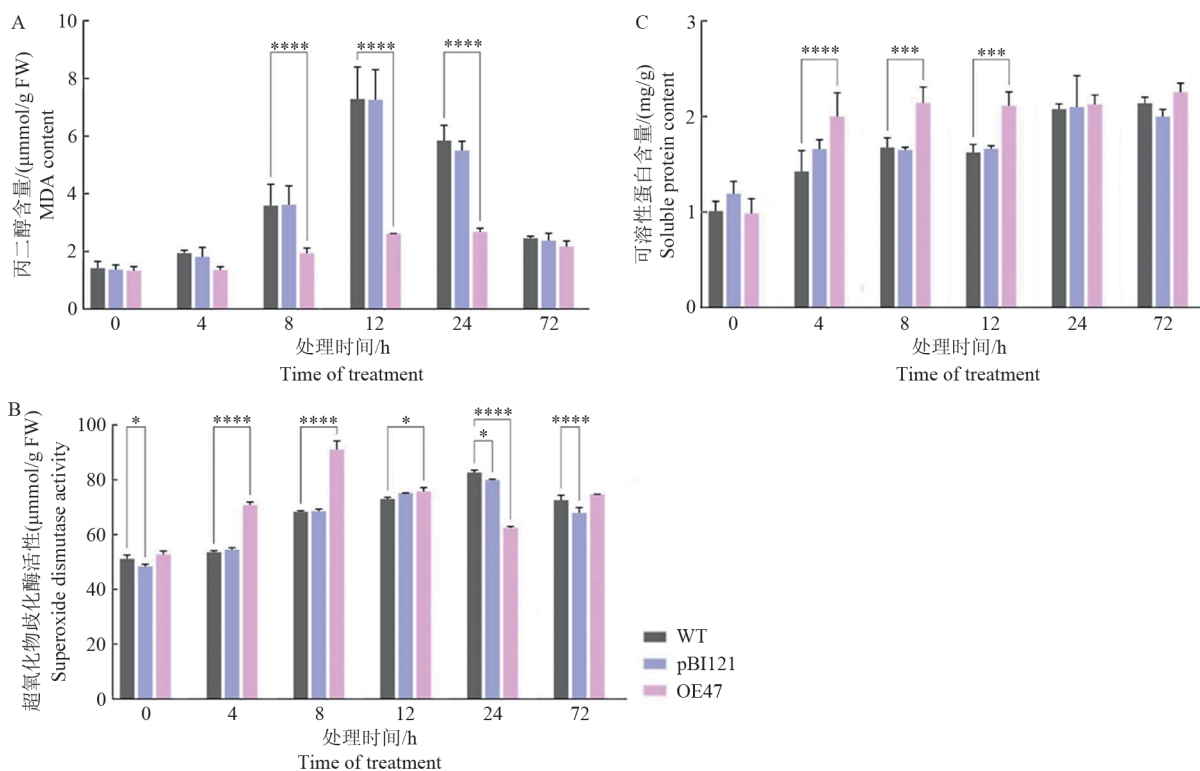


图9 盐胁迫下转基因烟草叶片生理指标变化

Fig. 9 Physiology changes in transgenic *Nicotiana benthamiana* leaves under salt stress

注:A. 丙二醛含量变化;B. 超氧化物歧化酶活性变化;C. 可溶性蛋白含量变化。*表示 $0.01 < P < 0.05$, **表示 $0.001 < P < 0.01$, ***表示 $0.0001 < P < 0.001$, ****表示 $P < 0.0001$ 。

Note: A. content of malondialdehyde (MDA) Changes; B. activity of superoxide dismutase (SOD) Changes; C. content of soluble proteins Changes. * indicates $0.01 < P < 0.05$, ** indicates $0.001 < P < 0.01$, *** indicates $0.0001 < P < 0.001$, **** indicates $P < 0.0001$.

表型变化均可以表明转入 *RrWRKY47X1-2* 基因降低了本氏烟草对于盐胁迫的敏感程度,且受到盐胁迫的强烈诱导。*RrWRKY47X1-2* 基因参与了烟草对盐胁迫的抵抗,其对烟草的抗盐性起正向调控作用。

选取了8个与盐胁迫密切相关的基因,分析它们在过表达 *RrWRKY47X1-2* 基因后响应盐胁迫的表达变化(图10)。在盐胁迫24 h后取样进行检测分析,结果显示,在 OE47 中,基因 *NbCAT3*、*NbAPX2*、*NbNHX1*、*NbP5CS*、*NbGPX*、*NbAREB*、*NbLEA* 的表达量均出现显著的上调。这说明 *RrWRKY47X1-2* 在转基因本氏烟草中影响了上述基因表达与调控,从而提高植株的抗盐性。

2.5 病毒诱导基因沉默(VIGS)对玫瑰基因的功能验证

使用 TRV-*RrWRKY47*-GFP 沉默载体侵染玫瑰扦插苗。处理10 d后,GFP 荧光检测、TRV 条带扩增及 qRT-PCR 检测均显示玫瑰被侵染且有

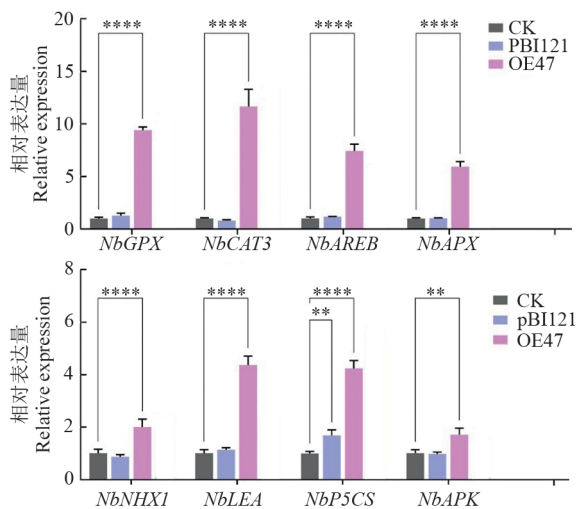


图10 盐胁迫下转基因烟草叶片盐胁迫相关基因表达变化

Fig. 10 Salt-stress-related gene expression changes in transgenic *Nicotiana benthamiana* leaves under salt stress

注:*表示 $0.01 < P < 0.05$, **表示 $0.001 < P < 0.01$, ***表示 $0.0001 < P < 0.001$, ****表示 $P < 0.0001$ 。

Note: * indicates $0.01 < P < 0.05$, ** indicates $0.001 < P < 0.01$, *** indicates $0.0001 < P < 0.001$, **** indicates $P < 0.0001$.

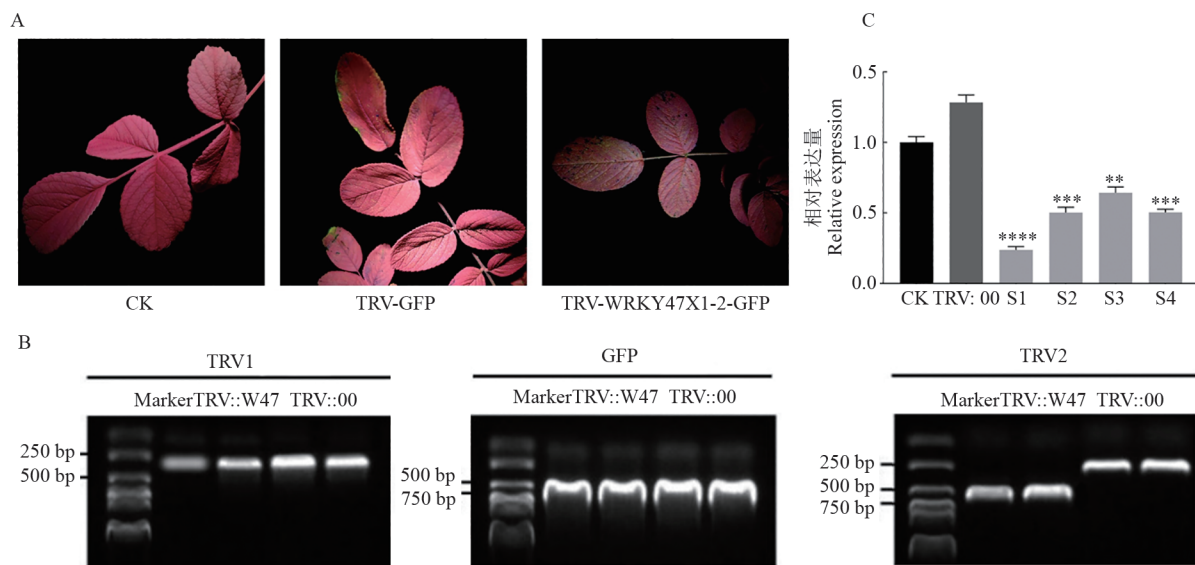


图11 玫瑰叶片基因沉默效率检测

Fig. 11 Detection of gene-silencing efficiency in *Rosa rugosa* leaves

注:A.玫瑰叶片GFP荧光检测;B. TRV条带扩增;C. *RrWRKY47X1-2* 沉默效率检测。S1、S2、S3和S4代表4组独立重复的TRV-GFP-*RrWRKYs*个体。*表示 $0.01 < P < 0.05$, **表示 $0.001 < P < 0.01$, ***表示 $0.0001 < P < 0.001$, ****表示 $P < 0.0001$ 。

Note: A. GFP fluorescence detection of *R. rugosa* leaves; B. TRV band amplification; C. Silent efficiency detection of *RrWRKY47X1-2*. S1, S2, S3 and S4 represent 4 independent replicate groups of TRV-GFP-*RrWRKYs* individuals. * indicates $0.01 < P < 0.05$, ** indicates $0.001 < P < 0.01$, *** indicates $0.0001 < P < 0.001$, **** indicates $P < 0.0001$.

效沉默,可进行下一步实验(图11)。

对沉默组 and 对照组分别进行 200 mM 的 NaCl 溶液的盐胁迫处理,在 0 h 到 24 h 之间取样进行基因相对表达量的检测,结果如下图所示(图12)。在盐胁迫的诱导下,*RrWRKY47X1-2* 在沉默组中的整体相对表达量均明显低于对照组,响应时间推迟。由此可以看出,使用 TRV-VIGS 的方法进行基因沉默,可以降低 *RrWRKY47X1-2*

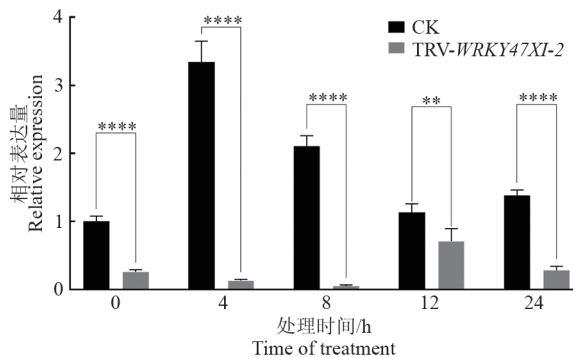


图12 *RrWRKY47X1-2* 沉默前后盐胁迫下目的基因表达分析
Fig. 12 Expression analysis of target gene *RrWRKY47X1-2* before and after silencing under salt stress

注: *表示 $0.01 < P < 0.05$, **表示 $0.001 < P < 0.01$, ***表示 $0.0001 < P < 0.001$, ****表示 $P < 0.0001$ 。

Note: * indicates $0.01 < P < 0.05$, ** indicates $0.001 < P < 0.01$, *** indicates $0.0001 < P < 0.001$, **** indicates $P < 0.0001$.

的表达效率。而在被沉默的情况下,目的基因依然对盐胁迫有响应。

盐胁迫处理 120 h 后,对照组和空载体组的玫瑰部分叶片出现卷曲,呈现出轻微胁迫的性状。沉默组玫瑰叶片受盐胁迫损伤程度更严重,叶片失水,叶边缘出现卷曲焦枯。表型差异表明 *RrWRKY47X1-2* 沉默后,玫瑰耐盐性降低。

在基因沉默和盐胁迫处理下, *RrGA2ox7*、*RrGAI*、*RrSAPK*、*RrGPX1*、*RrNHX1* 基因的表达量均降低,但 *RrHKT1* 表达量在一些时间点呈现出显著的升高趋势。

3 讨论

WRKY 转录因子是植物体内一类广泛参与生长发育和胁迫响应的蛋白,通过调控不同基因表达以参与各种生物学过程^[14]。研究表明,在盐胁迫条件下,多个 WRKY 基因在不同植物中被显著诱导表达^[15-18]。例如,桦木 *BpWRKY32* 通过介导气孔关闭增强渗透势、减少 ROS 积累,从而提高耐盐性^[19]。厚藤 *IpWRKY16* 通过上调根系离子转运蛋白来增强耐盐性^[20]。目前对 WRKY47 蛋白的研究较少,主要集中在调控衰老、低硼适应性和铝胁迫适应性方面,在调控植物响应盐胁迫

图 13 *RrWRKY* 沉默玫瑰受盐胁迫表型Fig. 13 Phenotype changes of *Rosa rugosa* with silenced *RrWRKYs* under salt stress

迫方面研究较少^[21-23]。本研究发现,玫瑰 *RrWRKY47X1-2* 基因 (GenBank 登录号: PX533116) 在盐胁迫下表达量变化显著,推测其可能与耐盐调控相关。

亚细胞定位分析结果表明, *RrWRKY47X1-2* 蛋白特异性定位于细胞核中;重组载体 pGBKT7-*RrWRKY47X1-2* 转化的可在 SD/-Trp/-Ade 培养基上正常生长的酵母菌通过 X- α -gal 显色反应变蓝;说明其不仅在细胞核中发挥生理功能,还能有效激活酵母菌体内下游报告基因的转录活性。结合其核定位特征与转录激活能力,可明确判定该蛋白为具备完整功能的转录因子。转录因子的激活或抑制作用依赖于它对靶基因的转录起何种作用^[24],说明 *RrWRKY47X1-2* 作为具有转录激活功能的转录因子,可能通过促进下游基因或互作蛋白的表达行使其功能。

本研究表明,过表达 *RrWRKY47X1-2* 能够有效降低盐胁迫下烟草的 MDA 含量,并使可溶性蛋白含量和 SOD 活性峰值提前。许多研究表明, *WRKY* 基因家族在植物体内参与活性氧和信号传递过程。例如拟南芥中 *AtWRKY55* 通过调控 *RbohD*、*ICS1*、*PBS3* 和 *SAG13* 表达,调节 ROS 和 SA 途径正向调控叶片衰老过程和细菌病原体抗性^[25]。盐胁迫处理后, *AhWRKY75* 的过表达花生植株生长优于野生型花生;SOD、POD 和 CAT 活性显著高于野生型对照株系^[26]。在拟南芥中过表达 *MfWRKY40* 可促使拟南芥积累更多的渗透压调节物质来促进干旱和盐胁迫下的渗透调节^[27]。因此推测 *RrWRKY47X1-2* 能够正向调控渗透调节物质的积累和抗氧化酶的活性,协助维持活性氧产生与清除的动态平衡,从而缓解盐胁迫对植物造成的损伤。

本研究中, *RrWRKY47X1-2* 在烟草中过表达

后, *NbAREB*、*NbNHX1* 均上调;在玫瑰本体进行基因沉默后, *RrSAPK*、*RrNHX1* 均下调。AREB 受 ABA 依赖性磷酸化调节,需要 ABA 才能完全激活,响应营养生长过程中的渗透胁迫的 ABA 信号传导^[28]。SAPK 是一种 ABA 活化蛋白激酶,能够参与干旱胁迫响应过程^[29]。NHX 家族通过调节细胞中 K^+ 、 H^+ 和 Na^+ 的转运,以降低 Na^+ 的浓度,减轻其对植物细胞的伤害,其对渗透胁迫的反应具有 ABA 依赖性^[30,31]。ABA 积累是触发 ROS 信号的重要条件,ROS 可以在植物抗氧化的过程中起到信号传递的作用,但 ROS 爆发会引起细胞的氧化伤害^[32]。其中 MDA 是衡量细胞膜过氧化伤害程度的重要指标, SOD 酶能作为抗氧化酶调节 ROS 平衡,本研究中 OE47 在盐胁迫后测定的 MDA 含量较对照组低, SOD 酶活性高于对照组,其生理指标变化与之相符。这表明 *RrWRKY47X1-2* 基因有可能参与到 ABA 信号传导的过程中以响应盐胁迫。

另外,本研究中 *RrWRKY47X1-2* 在烟草中过表达后, *NbGA2ox8* 显著上调,在玫瑰中沉默 *RrWRKY47X1-2* 后, *RrGA2ox7* 和 *RrGAI* 表达量也随之降低。GAI 是植物激素赤霉素信号传导的负调节因子,可抑制 GAs 活性^[33]。研究表明,植物可通过减少赤霉素的方式使生长减缓,从而缓解干旱、高盐等环境胁迫下的损伤。例如, *AtGA2ox7* 表达升高,导致活性 GAs 的含量降低,从而提高拟南芥的耐盐性和耐旱性^[34,35]; *GA2ox8* 在气孔细胞中起作用,且使 GAs 失活^[36];水稻中 *OsGA2ox8* 的过表达通过增加渗透调节剂和抗氧化剂的数量显著增强了转基因水稻植株的渗透胁迫耐受性^[37]。根据上述现象能推测 *RrWRKY47X1-2* 可能通过参与不同的激素通路来调控玫瑰对盐胁迫的响应。然而,由于目前玫

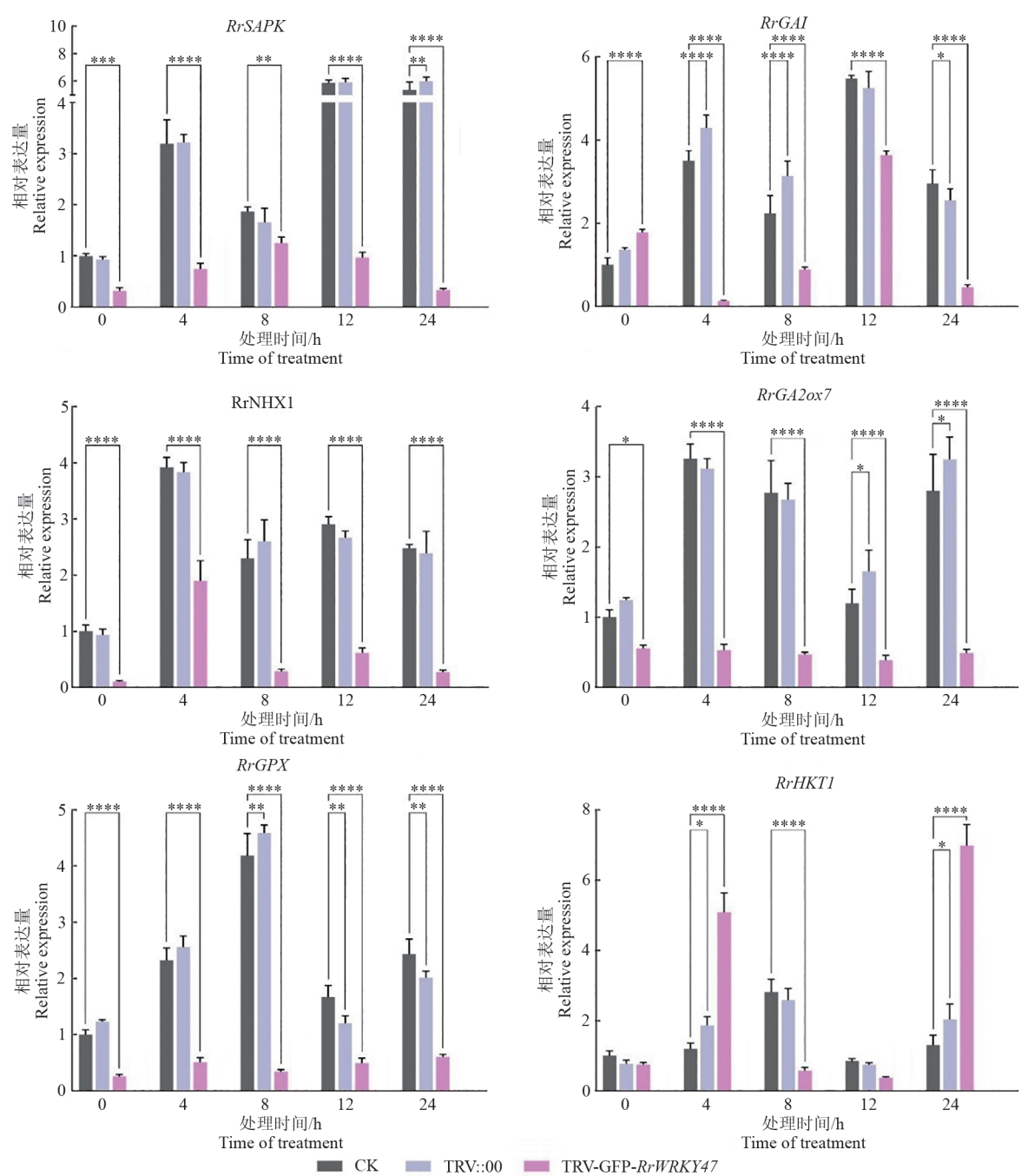


图 14 *RrWRKY* 基因沉默后玫瑰盐胁迫相关基因表达情况

Fig. 14 Expression of salt-stress-related genes in *Rosa rugosa* after *RrWRKYs* silencing

注: *表示 0.01 < P < 0.05, **表示 0.001 < P < 0.01, ***表示 0.0001 < P < 0.001, ****表示 P < 0.0001。
Note: * indicates 0.01 < P < 0.05, ** indicates 0.001 < P < 0.01, *** indicates 0.0001 < P < 0.001, **** indicates P < 0.0001.

玫瑰遗传转化体系尚不成熟,难以获得稳定遗传的转基因植株,因此该基因的具体调控途径仍有待进一步探索与验证。

另外,本研究利用了含有组成型 CaMV 35S 启动子的 pBI121 载体在烟草中异源过表达 *RrWRKY47X1-2* 基因。一个有趣的发现是,尽管

使用了组成型启动子,转基因的表达仍然显示出对盐胁迫的诱导性。但此前有研究表明,基因的表达不仅受启动子调控,也受到转录后水平调控。例如在棉属植物中转座子(TE)能够通过影响基因的选择性剪接(AS)或引入翻译调控元件(如uORFs),使得同源基因在不同物种或条件下

呈现不同的表达模式^[38];植物响应 ABA 胁迫时,会激活一个存在时间动态变化且具有细胞类型特异性的 miRNA 调控网络,以精细控制基因的表达^[39]。这表明玫瑰 *RrWRKY47X1-2* 在转入烟草后其表达不仅受启动子活性的控制,还可能通过转录后调控影响其表达,其具体机制需深入研究。

4 结论

实验表明,过表达 *RrWRKY47X1-2* 能够正向调控本氏烟草渗透调节物质的积累和抗氧化酶的活性,从而提高耐盐性;在玫瑰本体中沉默 *RrWRKY47X1-2*,其耐盐性降低。综上所述,玫瑰 *RrWRKY47X1-2* 可能对玫瑰的耐盐性具有正向调控作用,研究结果可为耐盐种质创制提供分子生物学理论依据。

参考文献

- [1] Srarfi F, Majar A. Global status of salt-affected soils main report[M]// Rome, Italy: FAO, 2024: 83-107.
- [2] 杨劲松, 姚荣江, 王相平, 等. 中国盐渍土研究: 历程、现状与展望[J]. 土壤学报, 2022, 59(01): 10-27.
- [3] Meharg A. Marschner's mineral nutrition of higher plants[J]. Experimental Agriculture, 2012, 48(2): 305-305.
- [4] Zhu J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. Cell, 2016, 167(2): 313-324.
- [5] 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 and General Genetics, 1994, 244(6): 563-571.
- [6] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, et al. WRKY transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(5): 247-258.
- [7] Cheng Y, Zhou Y, Yang Y, et al. Structural and functional analysis of VQ motif-containing proteins in Arabidopsis as interacting proteins of WRKY transcription factors[J]. Plant Physiology, 2012, 159(2): 810-825.
- [8] 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 and Environment, 2012, 35(6): 1156-1170.
- [9] Feng L, Ding H, Wang J, et al. Molecular cloning and expression analysis of RrNHX1 and RrVHA-c genes related to salt tolerance in wild Rosa rugosa[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2015, 22(4): 417-423.
- [10] Dai W, Wang M, Gong X, et al. The transcription factor FcWRKY40 of Fortunella crassifolia functions positively in salt tolerance through modulation of ion homeostasis and proline biosynthesis by directly regulating SOS2 and P5CS1 homologs[J]. New Phytologist, 2018, 219(3): 972-989.
- [11] Gao Y F, Liu J K, Yang F M, et al. The WRKY transcription factor WRKY8 promotes resistance to pathogen infection and mediates drought and salt stress tolerance in Solanum lycopersicum[J]. Physiologia Plantarum, 2020, 168(1): 98-117.
- [12] Du C, Ma B, Wu Z, et al. Reaumuria trigyna transcription factor RtWRKY23 enhances salt stress tolerance and delays flowering in plants[J]. Journal of Plant Physiology, 2019, 239(8): 38-51.
- [13] Zang F, Ma Y, Tu X, et al. A high-quality chromosome-level genome of wild Rosa rugosa[J]. DNA Research, 2021, 28(5): dsab017.
- [14] Mahiwal S, Pahuja S, Pandey G K. Review: Structural-functional relationship of WRKY transcription factors: Unfolding the role of WRKY in plants[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 257(Pt 2): 128769.
- [15] Babitha K C, Ramu S V, Pruthvi V, et al. Co-expression of AtbHLH17 and AtWRKY28 confers resistance to abiotic stress in Arabidopsis[J]. Transgenic Research, 2013, 22(2): 327-341.
- [16] Krishnamurthy P, Vishal B, Ho W J, et al. Regulation of a cytochrome P450 gene CYP94B1 by WRKY33 transcription factor controls apoplastic barrier formation in roots to confer salt tolerance[J]. Plant Physiology, 2020, 184(4): 2199-2215.
- [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] Finatto T, Viana V E, Woyann L G, et al. Can WRKY transcription factors help plants to overcome environmental challenges? [J]. Genetics and Molecular Biology, 2018, 41(3): 533-544.
- [19] Liu Z, Wang P, Wang Z, et al. Birch WRKY

- transcription factor, BpWRKY32, confers salt tolerance by mediating stomatal closing, proline accumulation, and reactive oxygen species scavenging[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024,210:108599.
- [20] Wu J, Su Y, Pan Z, et al. Identification of WRKY transcription factors in *Ipomoea pes-caprae* and functional role of IpWRKY16 in sweet potato salt stress response[J]. *BMC Plant Biology*, 2024,24(1): 1190.
- [21] Cui X, Fan X, Xu S, et al. WRKY47 transcription factor modulates leaf senescence through regulating PCD-associated genes in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024,213:108805.
- [22] Feng Y, Cui R, Wang S, et al. Transcription factor BnaA9. WRKY47 contributes to the adaptation of *Brassica napus* to low boron stress by up-regulating the boric acid channel gene BnaA3.NIP5;1[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020,18(5):1241-1254.
- [23] Li C X, Yan J Y, Ren J Y, et al. A WRKY transcription factor confers aluminum tolerance via regulation of cell wall modifying genes[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020,62(8):1176-1192.
- [24] 赵荣. 蜡梅类黄酮合成相关转录因子 CpbHLH1 和 CpMYB111 的功能解析[D]. 武汉:华中农业大学, 2020:90-91.
- [25] Wang Y, Cui X, Yang B, et al. WRKY55 transcription factor positively regulates leaf senescence and the defense response by modulating the transcription of genes implicated in the biosynthesis of reactive oxygen species and salicylic acid in *Arabidopsis*[J]. *Development*, 2020,147(16):dev189647.
- [26] Zhu H, Jiang Y, Guo Y, et al. A novel salt inducible WRKY transcription factor gene, AhWRKY75, confers salt tolerance in transgenic peanut[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021,160(3):175-183.
- [27] Huang Z, Wang J, Li Y, et al. A WRKY protein, MfWRKY40, of resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia* plays a positive role in regulating tolerance to drought and salinity stresses of *Arabidopsis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022,23(15):8145.
- [28] Fujita Y, Fujita M, Satoh R, et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2005,17(12):3470-3488.
- [29] Lou D, Lu S, Chen Z, et al. Molecular characterization reveals that OsSAPK3 improves drought tolerance and grain yield in rice[J]. *BMC Plant Biology*, 2023,23(1):53.
- [30] Cabot C, Sibole J V, Barceló J, et al. Lessons from crop plants struggling with salinity[J]. *Plant Science*, 2014,226(9):2-13.
- [31] Yokoi S, Quintero F J, Cubero B, et al. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response [J]. *The Plant Journal*, 2002,30(5):529-539.
- [32] Hu X, Zhang A, Zhang J, et al. Absciscic acid is a key inducer of hydrogen peroxide production in leaves of maize plants exposed to water stress[J]. *Plant Cell Physiol.* 2006,47(11):1484-1495.
- [33] Tyler L, Thomas S G, Hu J, et al. DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2004,135(2):1008-1019.
- [34] Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, et al. The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, GA2ox7, under high-salinity stress in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2008,56(4):613-626.
- [35] Kang H G, Kim J, Kim B, et al. Overexpression of FTL1/DDF1, an AP2 transcription factor, enhances tolerance to cold, drought, and heat stresses in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Science*, 2011,180(4): 634-641.
- [36] Li C, Zheng L, Wang X, et al. Comprehensive expression analysis of *Arabidopsis* GA2-oxidase genes and their functional insights[J]. *Plant Science*, 2019,285(8):1-13.
- [37] Wang Y, Du F, Wang J, et al. Molecular dissection of the gene OsGA2ox8 conferring osmotic stress tolerance in rice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021,22(17):9107.
- [38] Tian X, Wang R, Liu Z, et al. Widespread impact of transposable elements on the evolution of post-transcriptional regulation in the cotton genus *Gossypium*[J]. *Genome Biology*, 2025,26(1S60):60.
- [39] Samat A T, Soltabayeva A, Bekturova A, et al. Plant responses to heat stress and advances in mitigation strategies[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2025,16(3): 45-62.