

DOI: 10.11686/cyxb2025014

http://cyxb.magtech.com.cn

李永龙, 周生辉, 薛梦瑶, 等. 结缕草 *ZjWRKY63* 基因的克隆及转基因拟南芥的耐盐性分析. 草业学报, 2025, 34(12): 157—169.

LI Yong-long, ZHOU Sheng-hui, XUE Meng-yao, et al. Cloning of the gene *ZjWRKY63* from *Zoysia japonica* and its salt resistance analysis in transgenic *Arabidopsis*. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(12): 157—169.

结缕草 *ZjWRKY63* 基因的克隆及转基因拟南芥的耐盐性分析

李永龙, 周生辉, 薛梦瑶, 高远, 巨乐, 陈奕冰, 付松林, 郝建昊, 李恒, 张昆*, 左志芳*

(青岛农业大学草业学院, 黄河三角洲草地资源与生态国家林业和草原局重点实验室, 山东省耐盐碱草木种质创新重点实验室, 青岛市滩涂盐碱地特色植物种质创制与利用重点实验室, 山东 青岛 266109)

摘要: WRKY 转录因子在植物生长发育、病原菌防御和非生物胁迫应答过程中发挥重要调控作用。根据前期结缕草中 WRKY 转录因子的基因家族鉴定以及耐盐和敏盐结缕草品系在盐胁迫下的转录组分析, 筛选得到 1 个盐胁迫响应 WRKY 转录因子基因 *ZjWRKY63*。为进一步研究该基因的耐盐性功能, 设计引物进行 PCR 扩增, 克隆得到开放阅读框为 921 bp 的基因编码区 (CDS) 序列。*ZjWRKY63* 基因编码 1 个含有 306 个氨基酸的蛋白质, 具有 1 个 WRKY 功能保守结构域和 1 个 C₂H₂ 锌指结构基序, 属于 WRKY IIa 亚族。生物信息学分析表明, *ZjWRKY63* 氨基酸残基平均信号肽最大得分为 0.267, 提示该蛋白不具备信号肽; 疏水性预测分析显示编码蛋白总平均疏水指数 (GRAVY) 为 -0.395, 提示该蛋白质为亲水性蛋白质, 且 *ZjWRKY63* 不存在跨膜区; 亚细胞定位预测分析显示该转录因子定位于细胞核内。系统发育分析显示, 结缕草 *ZjWRKY63* 与芦苇 *PaWRKY65* 亲缘关系最近。对过表达 *ZjWRKY63* 的转基因拟南芥种子和植株分别进行盐胁迫处理发现, 过表达植株的种子萌发率、存活率和侧根数均显著高于野生型。同时, 在 *ZjWRKY63* 转基因拟南芥中, 盐胁迫响应相关基因的表达量均显著高于野生型, 推测 *ZjWRKY63* 基因通过调节胁迫响应基因的表达来提高转基因拟南芥的耐盐性。以上研究结果初步揭示了结缕草 *ZjWRKY63* 基因的耐盐性功能, 为深入研究 *ZjWRKY63* 基因的耐盐分子机制奠定了理论基础。

关键词: 结缕草; *ZjWRKY63* 基因; 基因克隆; 耐盐性; 分子机制

Cloning of the gene *ZjWRKY63* from *Zoysia japonica* and its salt resistance analysis in transgenic *Arabidopsis*

LI Yong-long, ZHOU Sheng-hui, XUE Meng-yao, GAO Yuan, JU Le, CHEN Yi-bing, FU Song-lin, HAO Jian-hao, LI Heng, ZHANG Kun*, ZUO Zhi-fang*

College of Grassland Science, Qingdao Agricultural University, Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Grassland Resources and Ecology in the Yellow River Delta, Shandong Key Laboratory for Germplasm Innovation of Saline-alkaline Tolerant Grasses and Trees, Qingdao Key Laboratory of Specialty Plant Germplasm Innovation and Utilization in Saline Soils of Coastal Beach, Qingdao 266109, China

Abstract: WRKY transcription factors play crucial regulatory roles in plant growth and development, pathogen defense, and responses to abiotic stress. Based on the previous gene family identification of WRKY transcription factor genes in *Zoysia japonica*, as well as the transcriptome analysis of the salt-tolerant and salt-sensitive *Z.*

收稿日期: 2025-01-17; 改回日期: 2025-03-27

基金项目: 青岛农业大学高层次人才启动基金 (665/1121011) 资助。

作者简介: 李永龙 (1999—), 男, 山东淄博人, 在读硕士。E-mail: 1603542147@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zhifangzuo@qau.edu.cn, zk61603@163.com

japonica species under salt stress, a salt stress-responsive WRKY transcription factor gene named *ZjWRKY63* was screened out. To further investigate the salt-tolerance function of this gene, primers were designed for PCR amplification, and the coding sequence (CDS) with an open reading frame of 921 bp was cloned. The *ZjWRKY63* encodes a protein containing 306 amino acids, which possesses one WRKY functional conserved domain and one C₂H₂ zinc finger structural motif, and belongs to the WRKY IIa subfamily. Bioinformatics analysis revealed that the maximum score value of the average signal peptide for the amino acid residues of *ZjWRKY63* was 0.267, indicating that this protein does not possess a signal peptide. Hydrophobicity prediction analysis showed that the grand average of hydrophobicity (GRAVY) value was -0.395, indicating that this protein is a hydrophilic protein. Transmembrane region prediction found no transmembrane region in *ZjWRKY63*. Prediction of subcellular localization showed that *ZjWRKY63* would be localized in the nucleus. Phylogenetic analysis demonstrated that *ZjWRKY63* of *Z. japonica* has the closest genetic relationship with the *Persea americana*, PaWRKY65. Salt stress treatment was conducted using the seeds and plants of transgenic *Arabidopsis thaliana* with overexpressed *ZjWRKY63*. It was found that the seed germination rate, survival rate and number of lateral roots of the overexpressing plants were significantly higher than those of the wild type. Meanwhile, in the transgenic *A. thaliana* with *ZjWRKY63*, the expression of genes related to salt stress response was significantly higher than that in the wild type in all cases. We speculate that the *ZjWRKY63* gene enhances the salt tolerance of transgenic *A. thaliana* by regulating the expression of stress response genes. The above research results provide preliminary confirmation of the salt-tolerance function of the *ZjWRKY63* gene, and lay a scientific foundation for further investigation of the molecular mechanism of the salt-tolerance conferred by the *ZjWRKY63* gene.

Key words: *Zoysia japonica*; *ZjWRKY63* gene; gene cloning; salt tolerance; molecular mechanism

土壤盐渍化作为植物典型的非生物胁迫因素之一,破坏土壤生态环境,对植物的生长和发育造成了显著的负面影响,严重威胁到农业生产和粮食安全^[1]。草坪作为园林绿化中的重要组成部分,近年来发展迅速,在城乡美化、环境保护、河堤防护等方面,体现了巨大的生态效益和景观价值。盐胁迫能够对草坪草的生长发育、外观形态和生理生化等多方面产生诸多不良影响,导致其质量和生态功能下降,增大草坪养护成本和管理难度^[2-3]。草坪草中有多种盐生植物,能够通过调节离子转运蛋白的表达、合成渗透调节物质激活抗氧化系统以及其他生理生化途径降低盐胁迫对自身造成的损伤^[4]。另外,已证实多个转录因子家族如bHLHs、DREBs和WRKYs,也可以通过调控相关耐盐基因的表达参与植物对盐胁迫的响应^[5-7]。因此,研究草坪草的耐盐分子机制,对培育耐盐草坪草新品种,推进盐碱地修复治理具有重大意义。

WRKY转录因子作为植物特有的一类转录因子家族,广泛参与植物的生长发育及逆境胁迫应答过程^[8-9]。WRKY转录因子在蛋白结构上都具有一段约60个氨基酸组成的高度保守结构域,N端包含一个保守的WRKYGQK结构域核心序列,C端含有一个C₂H₂或C₂HC型(CX₄₋₇-CX₂₃₋₂₈-HX₁₋₂-H/C)的锌指结构^[10]。根据WRKY结构域数目和锌指结构特征将WRKY转录因子分为3个亚族Group I、Group II和Group III,其中II类只包含1个WRKY结构域和1个C₂H₂型锌指结构,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中进一步又被分为IIa、IIb、IIc、IId和IIe五个亚类^[11]。几乎所有的WRKY转录因子都能特异性结合靶基因启动子区域的W-box(T/TGACC/T)顺式作用元件来调节目标基因的表达,其中包括许多防御相关的基因^[9]。

目前在多个物种中发现了WRKY转录因子基因在盐处理下被强烈而快速地诱导表达,且能够通过调控渗透胁迫、活性氧系统等途径参与胁迫响应^[12-13]。在拟南芥中,被鉴定出74个WRKY基因家族成员,其中*AtWRKY25*、*AtWRKY33*和*AtWRKY45*正向调节植株对盐胁迫的耐受性^[14-15]。盐胁迫下,在水稻(*Oryza sativa*)中过表达小麦(*Triticum aestivum*)*TaWRKY13*基因能够增强转基因植株的渗透调节能力,进而表现出耐盐性^[16]。葡萄(*Vitis vinifera*)*VvWRKY30*基因在拟南芥中能够通过增强活性氧清除能力和渗透物质的积累来

提高植物对盐胁迫的耐受性^[17]。WRKY转录因子也可以通过调节下游与植物抗逆性相关的功能基因,从而正向参与植物的耐盐性过程,如在拟南芥中过表达玉米(*Zea mays*)*ZmWRKY33*基因,能够上调胁迫应激基因*RD29A*的表达,进而提高转基因植株的耐盐性^[18]。此外,WRKY也可以负调控植物的盐胁迫响应过程,如在拟南芥中过表达虎蓼(*Polygonum cuspidatum*)*PcWRKY33*基因,能够下调盐胁迫应激基因的表达,且细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累量增加,植物的耐盐能力减弱^[19]。玉米*ZmWRKY17*基因受干旱、高盐和脱落酸(abscisic acid, ABA)诱导上调表达,拟南芥中过表达该基因在种子萌发和幼苗期表现出对盐胁迫的敏感性降低,同时相应基因的表达也显著低于野生型,说明*ZmWRKY17*基因可通过调节盐胁迫响应基因的表达来增加对盐胁迫的敏感性^[20]。杨树(*Populus alba*×*P. glandulosa*)中,*PagWRKY75*基因在高盐胁迫早期下调表达,相较于野生型,过表达转基因杨树植株对盐胁迫更敏感,植物体内活性氧的清除能力以及脯氨酸的积累也降低,表明*PagWRKY75*基因通过调节各种生理过程来负向调节耐盐性^[21]。但在结缕草(*Zoysia japonica*)中,只有少数WRKY基因的功能被报道,如*ZjWRKY10*能够促进开花基因*FLOWERING LOCUS T*的表达,加快转基因拟南芥的开花和叶片衰老过程,且*ZjWRKY10*在高盐(150 mmol·L⁻¹ NaCl)、低温(4℃)和干旱(20% 聚乙二醇)胁迫后,表现出不同的表达模式,表明*ZjWRKY10*也可能在非生物胁迫中发挥重要调控作用^[22]。因此,发掘和研究结缕草中耐盐相关WRKY转录因子的功能,对通过现代生物学技术提高结缕草耐盐性具有重要意义。

结缕草是我国优良的暖季型草坪草,具有良好的抗旱、耐盐和耐践踏等特性,是建植低养护和环境友好型的草种,在绿化草坪、运动场草坪和水土保持草坪等方面应用广泛^[23]。结缕草是典型的盐生植物,野生种质资源及品种的耐盐性评价研究一直备受关注,但由于结缕草遗传转化效率较低,分子育种研究进展缓慢,对结缕草中优质耐盐基因的挖掘以及分子机理的研究目前还较少。因此,本研究通过生物信息学和转录组分析,筛选到1个盐胁迫响应的WRKY转录因子基因*ZjWRKY63*,属于WRKY IIa亚族。在拟南芥中过表达*ZjWRKY63*基因能显著增强转基因植株种子的萌发率、存活率和侧根数。同时,下游盐胁迫响应相关基因的表达也显著高于野生型,因此,推测*ZjWRKY63*基因通过调节胁迫响应基因的表达来提高转基因拟南芥的耐盐性。以上研究结果为进一步深入探究*ZjWRKY63*基因的耐盐分子机制以及创制结缕草抗逆新种质奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料及培养条件

试验用植物材料为结缕草品种 Zenith(*Z. japonica* Zenith),于2023年种植于青岛农业大学东门温室,培养基质配比为营养土:珍珠岩=1:1,温度(23±5)℃,光照强度7000~8000 lx,光照16 h/黑暗8 h。试验用野生型拟南芥为Columbia-0型,培养条件如下:温度白天22℃/夜晚20℃,光照强度12000 lx,光照16 h/黑暗8 h,相对湿度50%~60%。

1.2 结缕草*ZjWRKY63*基因的克隆及表达载体的构建

利用植物总RNA提取试剂盒FastPure® Universal Plant Total RNA Isolation Kit(南京诺唯赞生物科技有限公司)提取结缕草叶片总RNA,并用Nanodrop 2000(IMPLEN,德国)检测RNA纯度和浓度,利用逆转录试剂盒(RR092A)(TaKaRa,中国大连)进行反转录反应合成cDNA,反转录体系包括2.0 μL 5×gDNA Eraser Buffer、1.0 μL gDNA Eraser、2 μg Total RNA、1.0 μL PrimeScript RT Enzyme Mix I、1.0 μL RT Primer Mix、4.0 μL 5×PrimeScript Buffer 2、RNase Free dH₂O补足20 μL;反应条件为37℃ 15 min、85℃ 5 s、4℃ 10 min。根据结缕草*ZjWRKY63*基因序列(*Zoysia* genome database ID: Zjn_sc00011.1.g02350.1.sm.mkhc),设计同源重组引物(表1),并进行PCR扩增。PCR反应体系包括20 ng cDNA、0.5 μL 10 μmol·L⁻¹ *ZjWRKY63*-F、0.5 μL 10 μmol·L⁻¹ *ZjWRKY63*-R、10 μL 2×Phanta Max Master Mix(Dye Plus)(P525)(南京诺唯赞生物科技有限公司),RNase Free dH₂O补足20 μL;PCR扩增的反应程序为95℃ 3 min、95℃ 15 s、(60℃ 15 s、72℃ 60 s)30个循环;72℃ 3 min,4℃终止反应。用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,之后用DNA回收试剂盒(天根生化科技北京有限公司)纯化回收PCR产物,然后用同源重组酶(C117)(南京诺唯赞生物科技有限公司)将回收片段连接到*Bam*HI和*Hind*III双酶切之后的过表达双元载体pCAMBIA3301-*Pubi*上,转化大肠杆菌DH5α感受态细胞

(DL1001S)(上海唯地生物技术有限公司),在含有 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Kana 的 LB(胰蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、酵母提取物 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NaCl $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)平板上, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 12 h 左右,挑选单克隆菌落,经 PCR 鉴定为阳性后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。经测序分析选择 *ZjWRKY63* 基因编码区(coding sequence, CDS)序列完全正确的单克隆菌株,提取质粒 DNA 转入农杆菌 GV3101,并转化拟南芥^[24]。

表 1 基因克隆和表达分析所用引物

Table 1 Primers used for gene cloning and expression analysis

名称 Name	寡核苷酸 Oligonucleotides (5'-3')	用途 Purpose
ZjWRKY63-F	GTGTTACTTCCCCGGGGATCCATGGACAGCGAGTGGAGCG	<i>ZjWRKY63</i> 基因克隆
ZjWRKY63-R	GTCATCCTTG TAGTCAAGCTTTGTCATGGCAGTGCCTCC	For the gene cloning of <i>ZjWRKY63</i>
AtABI5-F	AGAGGGATAGCGAACGAGTCTAGTC	用于下游基因的 qRT-PCR 表达分析
AtABI5-R	GTTCCGGTTTGGATTAGGTTTAGG	For the qRT-PCR of downstream gene ex-
AtCOR15A-F	CAGTTCGTCGTCGTTTCT	pression analysis
AtCOR15A-R	CCAATGTATCTGCGGTTT	
AtDREB1A-F	AGGAGACGTTGGTGGAGGCT	
AtDREB1A-R	ACGTCGTCATCATCGCCGTC	
AtMYC2-F	GCGTTGATGGATTTGGAGTT	
AtMYC2-R	TTGCTCTGAGCTGTTCTTGC	
AtSOS1-F	TCGTTTCAGCCAAATCAGAAAGT	
AtSOS1-R	TTTGCCTTGTGCTGCTTTCC	
AtSOS2-F	GGCTTGAAGAAAGTGAGTCTCG	
AtSOS2-R	GCTACATAGTTCGGAGTTCCACA	
AtACT-F	GGTAACATTTGCTCAGTGGTGG	拟南芥内参基因
AtACT-R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	Inner reference gene of <i>A. thaliana</i>

1.3 *ZjWRKY63* 基因的生物信息学分析

用 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) blastx 功能对 *ZjWRKY63* 基因序列进行 BLAST 分析,并对该基因所编码氨基酸序列的保守结构域进行分析。在 ProtParam (<https://web.expasy.org/protscale/>) 在线网站推测 *ZjWRKY63* 蛋白的分子量、等电点及氨基酸组成。用 SignalP 4.1 Server 在线网站 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 预测 *ZjWRKY63* 蛋白的信号肽。用 ProtScale 在线网站 (<https://web.expasy.org/protscale/>) 预测 *ZjWRKY63* 蛋白的亲疏水性。用 TMHMM v. Server 2.0 在线网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测 *ZjWRKY63* 蛋白的跨膜结构。用 SWISS-MODEL 在线网站 (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 预测 *ZjWRKY63* 蛋白的三级结构。用 WoLF PSORT 在线网站 (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 预测 *ZjWRKY63* 转录因子的亚细胞定位。*ZjWRKY63* 的蛋白序列以及其同源序列通过 MEGA 7.0 软件构建进化树,进行遗传进化分析。

1.4 *ZjWRKY63* 转基因拟南芥种子萌发率及幼苗耐盐性分析

用 10% 的次氯酸钠对 T₀ 代转基因拟南芥种子消毒 5 min, 然后用蒸馏水洗涤 3~5 次。用移液枪将消毒后的种子点种在含有 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 草铵膦(北京索莱宝科技有限公司)的 1/2 MS 培养基(phytotechnology, M519。成分如下:硝酸铵 $1650 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 硼酸 $6.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 无水氯化钙 $332.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 六水氯化钴 $0.025 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 五水硫酸铜 $0.025 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 乙二胺四乙酸二钠二水合物 $37.26 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 七水硫酸亚铁 $27.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 硫酸镁 $180.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 硫酸锰 $16.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 钼酸钠二水合物 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 碘化钾 $0.83 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 硝酸钾 $1900 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 磷酸二氢钾 $170 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 七水硫酸锌 $8.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 甘氨酸 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 肌醇 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 烟酸 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 盐酸吡哆醇 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 盐酸硫胺素 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 上, 对转基因种子进行抗性筛选。将阳性的绿色转基因幼苗移栽到灭菌的营养土中培养, 单株收获阳性植株的 T₁ 代种子。自

交扩繁,筛选 T₂代单株收获种子中没有发生分离的植株,即为纯合植株 T₃。将纯合的 *ZjWRKY63* 基因表达量高的代表性转基因拟南芥种子(OE-#2, OE-#7和OE-#14)和野生型(wild type, WT)拟南芥种子消毒后分别播种于含有 150 和 175 mmol·L⁻¹ NaCl 的 1/2 MS 培养基上,每个浓度设置 3 次重复,并在播种的第 0、2、3、4 和 5 天统计种子的萌发率,每个处理组 3 次重复。

将上述纯合转基因和野生型种子消毒后点种于 1/2 MS 培养基上,生长 7 d 后将长势一致的转基因和野生型拟南芥幼苗移至含 150 和 175 mmol·L⁻¹ NaCl 的 1/2 MS 培养基方皿中竖直培养。7 d 后统计各拟南芥株系的侧根数^[25]。

将纯合转基因和野生型种子点种在灭菌的营养土中,光照培养室中培养 21 d,将长势一致的转基因和野生型拟南芥幼苗设置对照组和盐胁迫处理组,每个株系、每个处理至少 3 盆。对盆栽植株进行浇水,处理组植株先用 200 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液浇 3 d,之后用 250 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液浇 3 d,再用 300 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液浇 3 d,最后用 350 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液浇 3 d,并复水 14 d。对照组植株分别浇以等量水,胁迫处理结束后统计存活率并拍照^[26]。

1.5 *ZjWRKY63* 转基因拟南芥盐胁迫处理下胁迫响应基因的表达模式分析

将 21 d 的盆栽纯合转基因和野生型拟南芥幼苗分别转移到含有 50 mmol·L⁻¹ NaCl 的 1/2 MS 液体培养基中处理 6 h,分别在处理前和处理后收集各株系的叶片组织,并用液氮充分研磨。提取总 RNA,取 2 μg 进行反转录合成 cDNA。下游胁迫响应基因 *AtABI5* (Accession: NM_001336591)、*AtCOR15A* (Accession: NM_129815)、*AtDREB1A* (Accession: AB007787)、*AtMYC2* (Accession: NM_102998)、*AtSOS1* (Accession: NM_126259) 和 *AtSOS2* (Accession: NM_001344103) 根据 Yu 等^[27] 的方法设计荧光定量 qRT-PCR 引物(表 1)。反应总体积 10 μL 如下: 5 μL 2×ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司)、0.5 μL 10 μmol·L⁻¹ 的正、反向引物(表 1)、2 μL 50 ng·μL⁻¹ cDNA 模板、2 μL RNase-free ddH₂O。qRT-PCR 仪型号为 CFX96 real-time PCR system(Bio-Rad,北京),反应程序如下:95℃ 30 s,(95℃ 5 s,60℃ 30 s)40 个循环。基因的相对表达量使用 2^{-ΔΔCT} 公式^[15] 计算,*AtACT* (Accession: NM_001336665) 为内参基因,每个样品进行 3 次重复。

1.6 数据处理与统计分析

使用 GraphPad Prism 9 对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA),其中,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 结缕草 *ZjWRKY63* 基因的表达与克隆

参考 Wang 等^[28] 对结缕草耐盐材料 Z011 和敏盐材料 Z004 在高盐胁迫下的转录组分析结果,共鉴定到 22 个 *ZjWRKY* 差异表达基因(图 1A),其中,*ZjWRKY63* 基因(*Zjn_sc00011.1.g02350.1.sm.mkhc*) 在结缕草 *ZjWRKY* 差异表达基因中表达量较高,且盐胁迫处理后在敏盐型结缕草材料 Z004 中表达量表现出下降趋势,而在耐盐型结缕草材料 Z011 中表达量呈先升高后降低趋势(图 1B),表明该基因在结缕草盐胁迫响应过程中可能发挥重要调控作用。为进一步验证初步的假设,以结缕草品种“Zenith”为材料,提取叶片 RNA,反转录合成 cDNA。以该 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增,获得 921 bp 的 *ZjWRKY63* 基因全长 CDS 序列,扩增产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 1C 所示。对该 PCR 产物进行胶回收,并连接到改造后的由泛素启动子启动的过表达载体 pCAMBIA3301 上,构成终载体 pCAMBIA3301-*Pubi::ZjWRKY63*。经测序,将构建成功的表达载体转入农杆菌 GV3101 菌株中,菌落 PCR 鉴定为阳性菌株(图 1C),利用农杆菌介导的拟南芥转化法浸染拟南芥^[24],并筛选阳性转基因植株。

2.2 结缕草 *ZjWRKY63* 基因的生物信息学分析

将克隆得到的 921 bp 的 *ZjWRKY63* 全长 CDS 序列在 NCBI 中进行 BLAST 分析,发现该蛋白含有 1 个 WRKY 功能结构域(图 2A)。经 NCBI ORF Finder 在线预测,该基因编码一个由 306 个氨基酸组成的蛋白,其中 WRKY 功能域中含有一个高度保守的 WRKY 结构域(WRKYGQK)和一个 C₂H₂ 型(C-X₅-C-X₂₃-H-X-H) 锌指结构域(图 2B),表明 *ZjWRKY63* 转录因子属于 WRKY IIa 亚族。

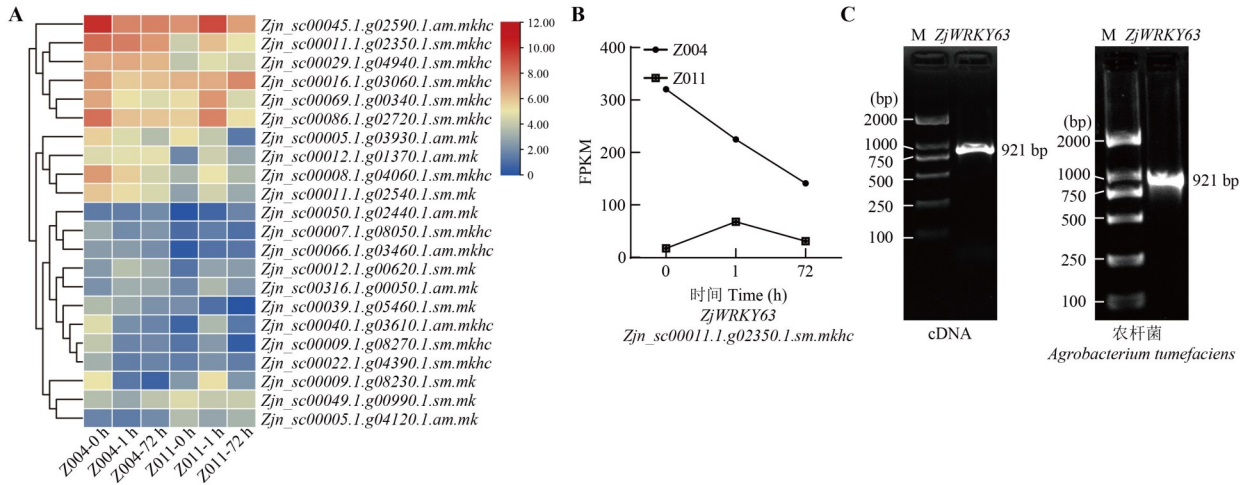


图1 结缕草 *ZjWRKY63* 基因的转录组及克隆分析

Fig. 1 Transcriptome and cloning analysis of *Z. japonica ZjWRKY63*

A: 盐胁迫下 *ZjWRKY* 差异表达基因在结缕草耐盐材料 Z011 和敏盐材料 Z004 中的转录组分析 Transcriptome analysis of differentially expressed genes of *ZjWRKY* in the salt-tolerant material Z011 and the salt-sensitive material Z004 of *Z. japonica* under salt stress; B: *ZjWRKY63* 基因在 Z011 和 Z004 中的转录组分析 Transcriptome analysis of *ZjWRKY63* in Z011 and Z004; C: *ZjWRKY63* 基因的克隆 Cloning of *ZjWRKY63*. FPKM: 每百万个读数来估算的基因表达量 Fragments per kilobase million; M: Marker.



图2 结缕草 *ZjWRKY63* 保守结构域分析

Fig. 2 The conserved domain analysis of *Z. japonica ZjWRKY63*

A: *ZjWRKY63* 保守结构域预测 Prediction of *ZjWRKY63* conserved domains; B: *ZjWRKY63* 基因的核酸序列及其编码的氨基酸序列 Nucleotide sequence and encoded amino acid sequence of *ZjWRKY63*. 虚线为 WRKYGQK 保守基序 The dotted line indicates the conserved motif of WRKYGQK; 实线为 C₂H₂基序(C-X₅-C-X₂₃-H-X-H) The solid line represents the C₂H₂ motif of C-X₅-C-X₂₃-H-X-H.

ProtParam 分析表明, *ZjWRKY63* 基因编码的蛋白分子式为 $C_{1351}H_{2095}N_{393}O_{446}S_{15}$, 分子量为 31.46 kDa, 理论等电点为 5.56。利用 SignalP 4.1 Server 在线分析软件预测 *ZjWRKY63* 蛋白的信号肽, 该蛋白的氨基酸残基平均信号肽最大得分为 0.267 (图 3A), 表明 *ZjWRKY63* 不存在信号肽。利用 ProtScale Sever 在线分析软件中的 Hydropath. /Kyte & Doolittle 法预测该蛋白的亲、疏水性, 预测结果如图 3B 所示, 该蛋白疏水性预测分析编码蛋白总平均疏水指数 (GRAVY) 值为 -0.395 , 表明该蛋白是亲水性蛋白。利用 TMHMM v. Server 2.0 在线网站分析表明, *ZjWRKY63* 蛋白不存在跨膜区 (图 3C)。通过 SWISS-MODEL 网站同源建模发现, 模板蛋白的可信度及其与目标蛋白的匹配程度均较高 (图 3D)。此外, 本研究还预测了 *ZjWRKY63* 蛋白的亚细胞定位, 显示其定位在细胞核中。

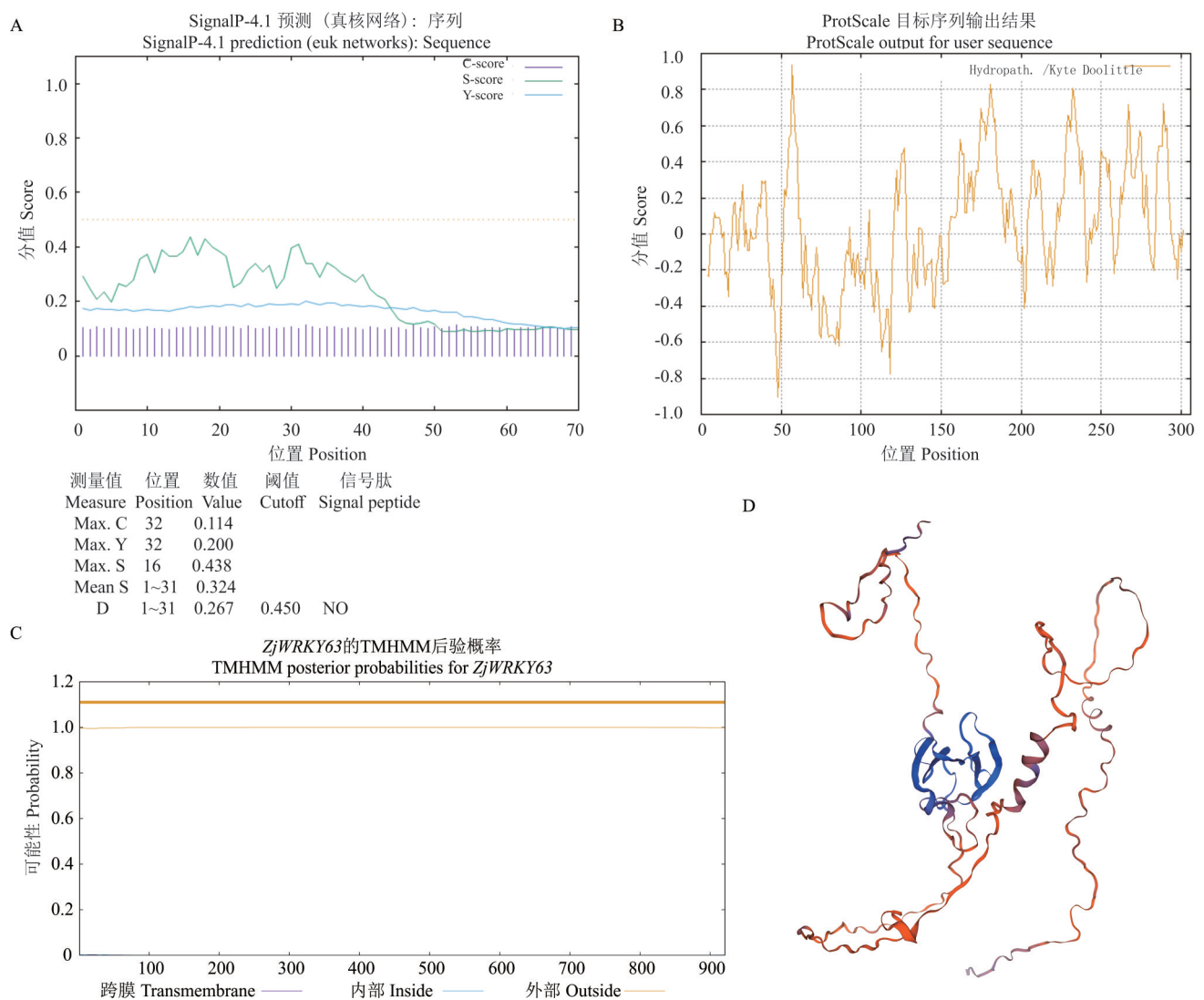


图 3 结缕草 *ZjWRKY63* 基因生物信息学分析

Fig. 3 Bioinformatic analysis of *Z. japonica ZjWRKY63*

A: *ZjWRKY63* 蛋白信号肽预测 Prediction of *ZjWRKY63* signal peptide; B: *ZjWRKY63* 蛋白疏水性预测 Prediction of *ZjWRKY63* hydrophobic property; C: *ZjWRKY63* 蛋白跨膜结构预测 Prediction of *ZjWRKY63* transmembrane structure; D: *ZjWRKY63* 蛋白三级结构预测 Prediction of *ZjWRKY63* protein tertiary structure.

2.3 结缕草 *ZjWRKY63* 基因的遗传进化分析

通过 NCBI 蛋白数据库搜索到与结缕草 *ZjWRKY63* 蛋白序列相似的同源序列, 分别为芦苇 *PaWRKY65* (*Phragmites australis*, XP_062206754)、黍 *PmWRKY65* (*Panicum miliaceum*, RLN25407)、五节芒 *MfWRKY65*

(*Miscanthus floridulus*, XP_066309589)、狗尾草 PhWRKY65 (*Panicum hallii*, XP_025814691)、柳枝稷 PvWRKY65 (*Panicum virgatum*, XP_039813594)、谷子 SiWRKY65 (*Setaria italica*, XP_004969837)、高粱 SbWRKY65 (*Sorghum bicolor*, XP_002458443)、玉米 ZmWRKY14 (*Zea mays*, ACG45823)、光稈稻 OgWRKY65 (*Oryza glaberrima*, XP_052136223)、节节麦 AtWRKY65 (*Aegilops tauschii*, XP_020149507)、水稻 OsWRKY65 (XP_015624912)、大麦 HvWRKY65 (*Hordeum vulgare*, XP_044972707)、二粒小麦 TdWRKY65 (*Triticum dicoccoides*, XP_037406553)、二穗短柄草 BdWRKY65 (*Brachypodium distachyon*, XP_010232262)、小麦 TaWRKY65 (XP_044344816)、多年生黑麦草 LpWRKY65 (*Lolium perenne*, XP_051226874)、拟南芥 AtWRKY69 (NP_567073)。多序列比对结果显示结缕草 ZjWRKY63 与芦苇 PaWRKY65 的亲缘关系最近(图4)。

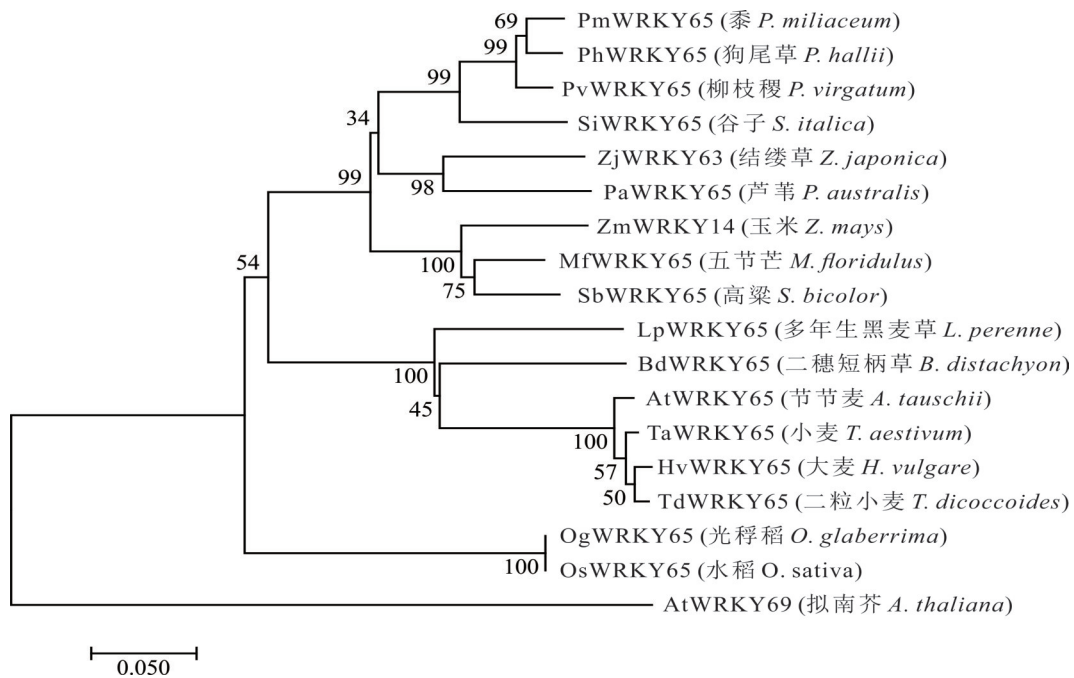


图4 结缕草 ZjWRKY63 进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of *Z. japonica* ZjWRKY63

2.4 结缕草 ZjWRKY63 转基因拟南芥的耐盐性分析

将具有代表性的 T₃ 代过表达株系 OE-#2、OE-#7、OE-#14 和野生型种子分别点种于含有 0、150 和 175 mmol·L⁻¹ NaCl 的 1/2 MS 培养基上,统计不同浓度 NaCl 处理培养基中拟南芥种子发芽情况。结果显示,在含有 0 mmol·L⁻¹ NaCl 的培养基中,各过表达株系和野生型拟南芥种子发芽率没有显著性差异(图 5A)。在第 2 天时,WT 的萌发率为 91.8%,OE-#2 为 95.2%,OE-#7 为 95.9%,OE-#14 为 95.2%,在第 5 天时,各株系种子萌发率均接近 100%,其中 WT 为 98.0%,OE-#2 的萌发率为 99.3%,OE-#7 为 97.3%,OE-#14 为 98.0%(图 5A, B)。在含有 150 mmol·L⁻¹ NaCl 的培养基中,处理第 2 天时,WT 的萌发率为 49.0%,过表达株系 OE-#2 为 77.6%,OE-#7 为 74.8%,OE-#14 的萌发率为 78.9%,过表达株系种子萌发率均显著高于野生型 ($P < 0.001$) (图 5C, D)。在处理第 5 天时,各株系种子萌发率均有所增加,但过表达株系种子萌发率仍显著高于野生型,其中 WT 为 81.0%,OE-#2 为 97.3% ($P < 0.001$),OE-#7 为 92.5% ($P < 0.05$),OE-#14 为 93.9% ($P < 0.001$) (图 5D)。在含有 175 mmol·L⁻¹ NaCl 的培养基中,各株系种子萌发速率迟缓于 0 和 150 mmol·L⁻¹ NaCl 处理(图 5E, F)。在处理第 2 到 5 天时,过表达株系种子萌发率均显著高于野生型,其中第 2 天 WT 的萌发率为 14.3%,过表达株系 OE-#2 为 21.1% ($P < 0.05$),OE-#7 为 23.1% ($P < 0.01$),OE-#14 为 25.1% ($P < 0.001$);第 5 天 WT 萌发率为 78.9%,OE-#2 为 89.1% ($P < 0.01$),OE-#7 为 87.7% ($P < 0.01$),OE-#14 为 86.4% ($P < 0.05$) (图 5F)。

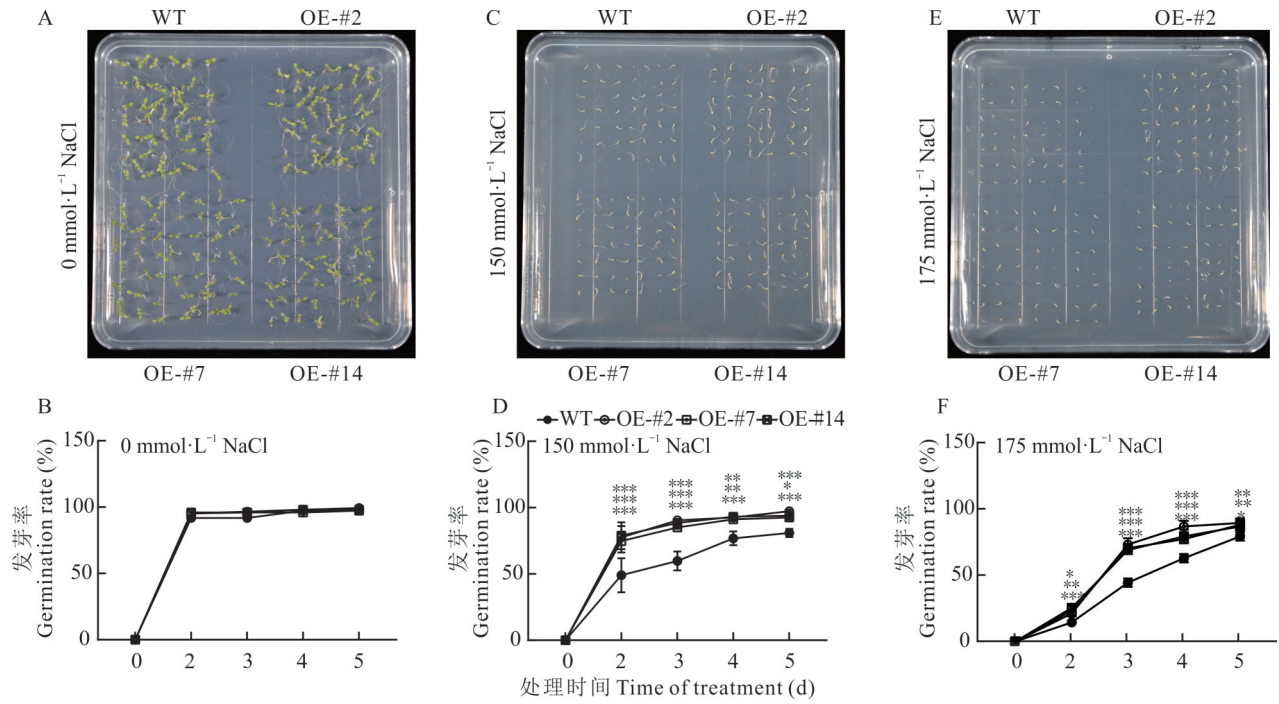


图 5 过表达 *ZjWRKY63* 转基因拟南芥种子萌发率分析

Fig. 5 Germination rate analysis of transgenic *A. thaliana* with overexpression of *ZjWRKY63*

A, B: 0 mmol·L⁻¹ NaCl 处理后的种子萌发率 The germination rate under 0 mmol·L⁻¹ NaCl treatment; C, D: 150 mmol·L⁻¹ NaCl 处理后的种子萌发率 The germination rate under 150 mmol·L⁻¹ NaCl treatment; E, F: 175 mmol·L⁻¹ NaCl 处理后的种子萌发率 The germination rate under 175 mmol·L⁻¹ NaCl treatment; *表示 $P < 0.05$ * represents $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$ ** represents $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$ *** represents $P < 0.001$; 下同 The same below.

将上述点种于 1/2 MS 培养基上 7 d 的幼苗分别移至含 0、150 和 175 mmol·L⁻¹ NaCl 的 1/2 MS 培养基方皿中竖直培养, 7 d 后统计各株系的侧根数发现, 在 0 mmol·L⁻¹ 的培养基中, 各株系侧根数没有显著性差异, 而在不同浓度的 NaCl 培养基中, 过表达株系的侧根数显著高于野生型(图 6A, B)。其中含有 150 mmol·L⁻¹ NaCl 的培养

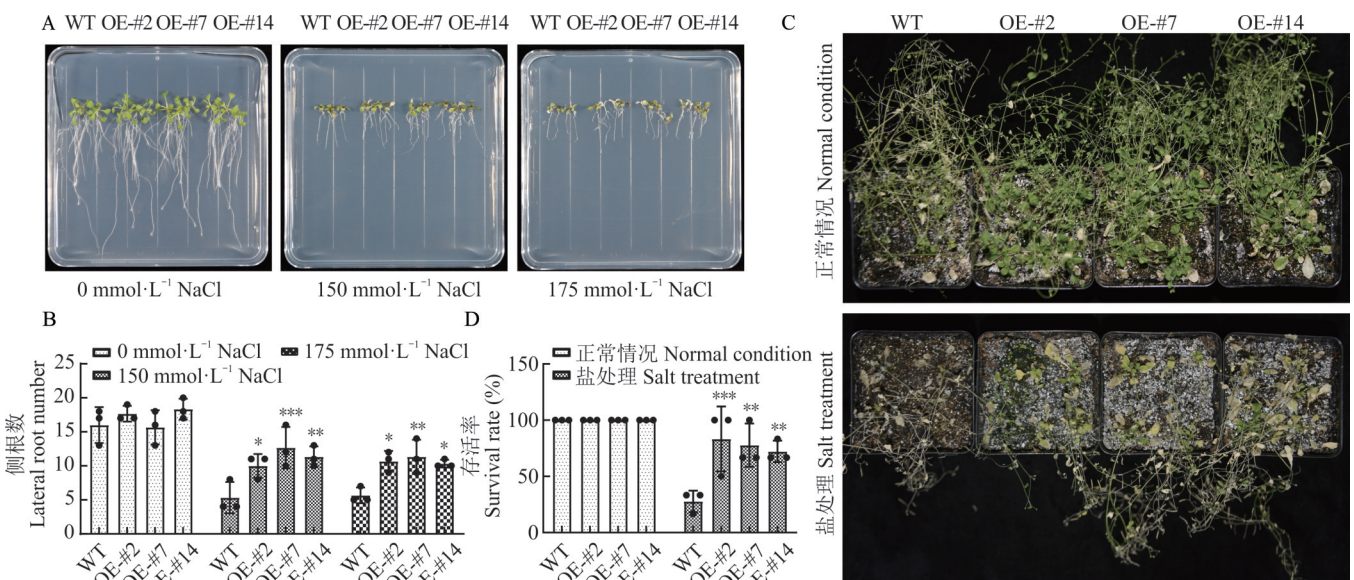


图 6 过表达 *ZjWRKY63* 转基因拟南芥耐盐性分析

Fig. 6 The salt tolerant analysis of transgenic *A. thaliana* with overexpression of *ZjWRKY63*

A, B: 不同浓度 NaCl 处理下转基因各株系和野生型的侧根数 The lateral root number of transgenic plants and wild type under different NaCl treatments; C, D: 盐胁迫处理后转基因各株系和野生型的存活率 The survival rate of transgenic plants and wild type after salt stress treatment.

基中, WT 侧根数的平均值为 5.3, OE-#2、OE-#7 和 OE-#14 侧根数的平均值分别为 10.0 ($P < 0.05$)、12.6 ($P < 0.001$) 和 11.3 ($P < 0.01$), 均显著高于野生型; 含有 $175 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的培养基中, 过表达株系 OE-#2 (10.6)、OE-#7 (11.3) 和 OE-#14 (10.3) 的平均侧根数均显著高于 WT (5.6) (图 6B)。将 WT、OE-#2、OE-#7 和 OE-#14 种子点种在灭菌的营养土中, 光照培养 21 d 后, 依次进行盐胁迫处理并统计各株系植株的存活率。结果显示, 正常培养状态下各株系的存活率均为 100%, 而盐胁迫处理后 WT 的存活率为 27.8%, 过表达各株系存活率分别为 83.3% ($P < 0.001$), 77.8% ($P < 0.01$) 和 72.2% ($P < 0.01$), 均显著高于野生型 (图 6C, D)。

2.5 盐胁迫下过表达拟南芥中胁迫响应基因的表达模式分析

为了研究 *ZjWRKY63* 基因影响转基因拟南芥耐盐性的潜在分子机制, 对拟南芥中 6 个下游胁迫响应基因 *AtSOS1*、*AtSOS2*、*AtABI5*、*AtMYC2*、*AtDREB1A* 和 *AtCOR15A* 的表达模式进行分析 (图 7)。结果显示, 正常培养状态下 *ZjWRKY63* 转基因各株系和野生型拟南芥中盐胁迫响应基因的表达量差异不显著, 而盐胁迫处理后所有株系中胁迫响应基因的表达均表现出上调趋势, 且过表达株系 OE-#2、OE-#7 和 OE-#14 中 *AtSOS1*、*AtSOS2*、*AtABI5*、*AtMYC2*、*AtDREB1A* 和 *AtCOR15A* 基因的表达量均显著高于 WT。其中, *AtDREB1A* 和 *AtCOR15A* 上调幅度较大, 分别为 31.5、64.9、47.7 和 19.3、13.7、21.5 倍, 表明过表达 *ZjWRKY63* 基因可能通过调控胁迫响应基因的表达来提高转基因拟南芥对盐胁迫的耐受性 (图 7)。

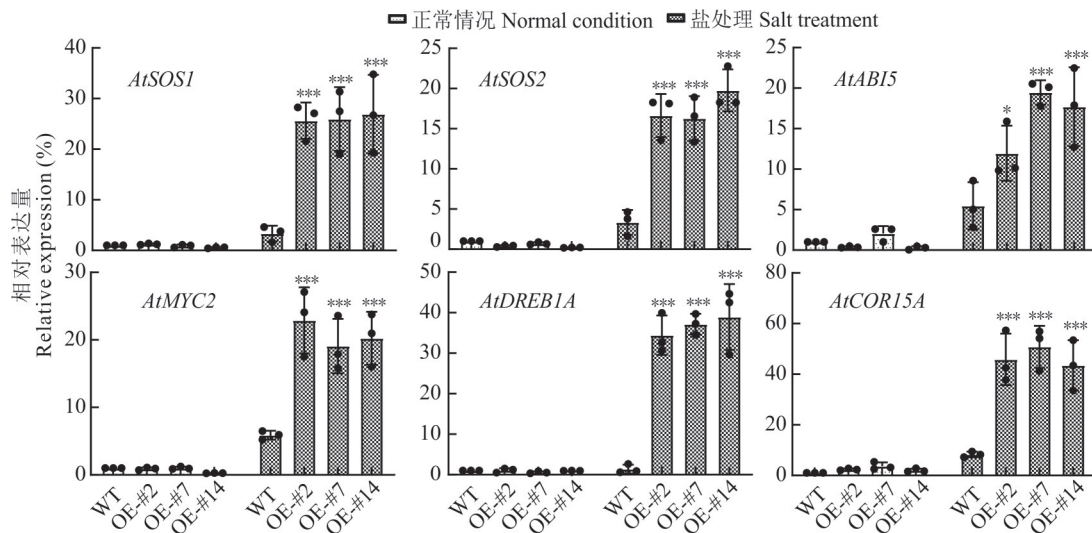


图 7 盐胁迫处理下 *ZjWRKY63* 转基因拟南芥中胁迫响应基因的表达分析

Fig. 7 The expression analysis of stress-responsive genes in transgenic *A. thaliana* with overexpression of *ZjWRKY63* under salt stress treatment

3 讨论

植物转录因子通过调控下游基因的表达参与各种环境胁迫应答过程, 其中 WRKY 转录因子是植物体内最大的转录因子家族之一, 且在多个物种中被发现并鉴定^[29]。WRKY 转录因子根据 WRKY 结构域数目和锌指结构特征可分为 Group I、Group II 和 Group III 三个亚族^[10]。本研究中 *ZjWRKY63* 基因编码的蛋白质包含 1 个 WRKY 结构域和 1 个 C₂H₂ 型 (C-X₅-C-X₂₃-H-X-H) 锌指结构域, 归属于 Group IIa 亚族。有研究表明, 小麦 TaWRKY33 转录因子同属于 Group IIa 亚族, 且盐处理下过表达拟南芥的根长和鲜重均显著高于野生型, 表现出更好的耐盐性^[30]。生物信息学分析显示, 结缕草 *ZjWRKY63* 转录因子为一个不含有信号肽的亲水性蛋白, 且遗传进化分析表明, *ZjWRKY63* 与禾本科芦苇 PaWRKY65 的同源性最高, 亲缘关系最近。

为了初步确定 *ZjWRKY63* 基因在盐胁迫下的功能, 在拟南芥中对 *ZjWRKY63* 基因进行过表达。盐胁迫处理后, 发现过表达株系相较于野生型种子的萌发率、侧根数和存活率相对更高, 表现出更强的耐盐能力, 说明

ZjWRKY63 基因在拟南芥中可能正向调控耐盐性。相似的研究结论在小麦中也有被报道,小麦 WRKY 转录因子基因 *TaWRKY93* 受盐、干旱、低温和渗透胁迫诱导上调表达,过表达该基因的转基因拟南芥植株在含有 NaCl 和甘露醇的 MS 平板上能够显著提高主根长和侧根数^[31],本研究中过表达 *ZjWRKY63* 基因在拟南芥中同样增加了转基因植株的侧根数,但不同的是并未提高主根长(结果未展示)。同样,小麦 *TaWRKY17* 在拟南芥中过表达能显著提高盐胁迫后转基因拟南芥的存活率,表现出高耐盐性^[27]。此外,在苦荞(*Fagopyrum tataricum*)中,过表达转录因子基因 *FtWRKY46* 能显著增加转基因拟南芥种子的萌发率、根长等,表现出耐盐功能^[32]。而在拟南芥中过表达玉米 *ZmWRKY17* 基因则表现出相反的趋势,转基因拟南芥种子的萌发率和根长明显下降,说明 *ZmWRKY17* 基因使拟南芥对盐胁迫更加敏感^[20]。在拟南芥中,菊花(*Chrysanthemum morifolium*)WRKY 转录因子基因 *CmWRKY17* 过表达能够显著降低转基因植株的存活率,同样表现出盐敏感性^[33]。综上所述,WRKY 转录因子家族基因在植物胁迫耐受性方面既能正向发挥调节功能,又可以负调控增加盐敏感性,而结缕草 *ZjWRKY63* 基因可能通过某些分子机制在拟南芥中正向调控耐盐性。

为进一步探究结缕草 *ZjWRKY63* 基因参与的耐盐性分子调控机制,本研究进行了 qRT-PCR 以评估与离子稳态(*AtSOS1* 和 *AtSOS2*)、脱落酸生物合成(*AtABI5*)、信号传导(*AtMYC2*)和应激反应(*AtDREB1A* 和 *AtCOR15A*)相关的各种因素^[34]。研究表明,*AtSOS1*、*AtSOS2* 和 *AtNHX1* 是调节植物耐盐性的关键 Na^+ 转运蛋白,其中 *AtSOS1* 基因编码一种质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,能够调节盐胁迫下细胞内的离子稳态^[11,35-36]。本研究中,在盐胁迫处理前,各转基因株系中 *AtSOS1* 和 *AtSOS2* 基因的表达与野生型无显著性差异,而盐胁迫处理后,过表达株系中 *AtSOS1* 和 *AtSOS2* 基因的表达量显著高于野生型,说明在拟南芥中过表达结缕草 *ZjWRKY63* 基因促进了离子稳态基因的表达,进而部分程度上维持了盐胁迫下细胞内的稳态环境。植物激素在植物生长发育中起着至关重要的作用。为了应对植物不同发育阶段的盐胁迫,植物激素如脱落酸(ABA)、赤霉素、茉莉酸、水杨酸等会被诱导生成^[37]。脱落酸在盐胁迫条件下起着重要作用,ABA 能够通过植物叶片上的保卫细胞来调节体内的水分状况,有助于缓解盐胁迫对植物生长、光合和细胞内代谢的不利影响^[38]。本研究中,在盐胁迫处理前,各转基因株系中与脱落酸合成相关的基因 *AtABI5* 以及与脱落酸信号传导相关的转录因子基因 *AtMYC2* 的表达量与野生型相比无显著差异,而盐胁迫处理后,过表达株系中 *AtABI5* 和 *AtMYC2* 基因的表达量显著高于野生型,说明结缕草 *ZjWRKY63* 基因可能通过脱落酸途径发挥耐盐性功能。另外,对胁迫应激相关基因 *AtDREB1A* 和 *AtCOR15A* 的定量分析发现,与野生型相比转基因植物中 *AtDREB1A* 和 *AtCOR15A* 的表达量在盐胁迫后同样显著增加,表明过表达结缕草 *ZjWRKY63* 基因同样能够促进胁迫应激相关基因的表达,进而提高了转基因植物的抗盐胁迫能力。

4 结论

本研究成功克隆了结缕草 WRKY 转录因子基因 *ZjWRKY63*,该基因的开放阅读框为 921 bp,编码 306 个氨基酸。生物信息学分析发现该基因具有 1 个 WRKY 功能保守结构域和 1 个 C_2H_2 锌指结构基序,属于 WRKY IIa 转录因子亚族。遗传进化分析表明结缕草 *ZjWRKY63* 与芦苇 *PaWRKY65* 亲缘关系最近。*ZjWRKY63* 基因的耐盐性分析发现,过表达植株的种子萌发率、存活率和侧根数均显著高于野生型,初步表明该基因具有耐盐性功能。另外,对盐胁迫响应基因的表达分析发现,过表达植株中与离子稳态有关的基因、脱落酸生物合成与信号传导和应激反应等相关基因的表达在盐胁迫后显著增加,表明 *ZjWRKY63* 基因可能通过调节细胞内的离子稳态以及脱落酸途径来影响拟南芥对盐胁迫的耐受性。

参考文献 References:

- [1] Liu Y, Jiang W, Zhao W, et al. Effects of biochar application on soil properties and the growth of *Melissa officinalis* L. under salt stress. *Scientia Horticulturae*, 2024, 338(1): 113704.
- [2] Li J X, Bai X M, Zhang C, et al. Effects of different salt types on seed germination and seedling growth of *Poa annua*. *Arid Zone Research*, 2023, 40(7): 1131-1140.

- 李娟霞, 白小明, 张翠, 等. 不同盐分类型对一年生早熟禾种子萌发和幼苗生长的影响. 干旱区研究, 2023, 40(7): 1131—1140.
- [3] Wang R, Yu M Y, Cao Z J, *et al.* Effects of salt stress on seed germination characteristics of *Poa pratensis* L. Seed, 2024, 43(9): 86—93, 100.
王蓉, 于铭玥, 曹志坚, 等. 盐处理对草地早熟禾种子萌发特性的影响. 种子, 2024, 43(9): 86—93, 100.
- [4] Song X. Research progress on stress resistance of seashore paspalum. Modern Agricultural Science and Technology, 2024(11): 126—132.
宋鑫. 海滨雀稗抗逆性研究进展. 现代农业科技, 2024(11): 126—132.
- [5] Zuo Z F, Lee H Y, Kang H G. Basic helix-loop-helix transcription factors: regulators for plant growth development and abiotic stress responses. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(2): 1419.
- [6] Lata C, Prasad M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(14): 4731—4748.
- [7] Rai G K, Mishra S, Chouhan R, *et al.* Plant salinity stress, sensing, and its mitigation through WRKY. Frontiers in Plant Science, 2023, 14(4): 1238507.
- [8] Johnson C S, Kolevski B, Smyth D R. TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. The Plant Cell, 2002, 14(6): 1359—1375.
- [9] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, *et al.* WRKY transcription factors. Trends in Plant Science, 2010, 15(5): 247—258.
- [10] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, *et al.* The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends in Plant Science, 2000, 5(5): 199—206.
- [11] Dong J X, Chen C H, Chen Z X, *et al.* Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. Plant Molecular Biology, 2003, 51(1): 21—37.
- [12] Wu K L, Guo Z J, Wang H H, *et al.* The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins. DNA Research, 2005, 12(1): 9—26.
- [13] Eulgem T, Somssich I E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10(4): 366—371.
- [14] Jiang J J, Ma S H, Ye N H, *et al.* WRKY transcription factors in plant responses to stresses. Journal of Integrative Plant Biology, 2017, 59(2): 86—101.
- [15] Liang C P, Chen L G. Preliminary exploration of the mechanism by which *AtWRKY45* regulates salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Seed Science and Technology, 2024, 42(17): 13—17.
梁承萍, 陈利钢. *AtWRKY45*调控拟南芥耐盐性的机制初探. 种子科技, 2024, 42(17): 13—17.
- [16] Zhou S, Zheng W J, Liu B H, *et al.* Characterizing the role of *TaWRKY13* in salt tolerance. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(22): 5712.
- [17] Zhu D, Hou L X, Xiao P L, *et al.* *VvWRKY30*, a grape WRKY transcription factor, plays a positive regulatory role under salinity stress. Plant Science, 2018, 280: 132—142.
- [18] Li X, Ye G, Shen Z, *et al.* Na⁺ and K⁺ homeostasis in different organs of contrasting *Zoysia japonica* accessions under salt stress. Environmental and Experimental Botany, 2023, 214: 105455.
- [19] Bao W, Wang X, Chen M, *et al.* A WRKY transcription factor, PcWRKY33, from *Polygonum cuspidatum* reduces salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports, 2018, 37(7): 1033—1048.
- [20] Cai R, Dai W, Zhang C, *et al.* The maize WRKY transcription factor ZmWRKY17 negatively regulates salt stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. Planta, 2017, 246: 1215—1231.
- [21] Zhao K, Zhang D, Lv K, *et al.* Functional characterization of poplar WRKY75 in salt and osmotic tolerance. Plant Science, 2019, 289: 110259.
- [22] Yuan Y, Son J H, Park M Y, *et al.* Overexpression of *ZjWRKY10*, a *Zoysia japonica* WRKY transcription factor gene, accelerates leaf senescence and flowering in transgenic *Arabidopsis*. Journal of Plant Biotechnology, 2024, 51(1): 1—10.
- [23] He X, Duan H L, Luo L J, *et al.* Morphological characteristics variations of germplasm resources in *Zoysia* Willd. Molecular Plant Breeding, 2024, 22(13): 4364—4376.
何潇, 段宏利, 罗丽娟, 等. 结缕草属种质资源形态特征变异. 分子植物育种, 2024, 22(13): 4364—4376.
- [24] Li H, Li D F, Deng Y, *et al.* Expression analysis of abiotic stress response gene *HcWRKY71* in kenaf and transformation of *Arabidopsis*. Acta Agronomica Sinica, 2021, 47(6): 1090—1099.

- 李辉, 李德芳, 邓勇, 等. 红麻非生物逆境胁迫响应基因 *HCWRKY71* 表达分析及转化拟南芥. 作物学报, 2021, 47(6): 1090–1099.
- [25] Li Y, Mi X F, Yan L, *et al.* Cloning and salt tolerance analysis of UDP-glycosyltransferases *UGT72B3* gene in *Carex rigescens*. Chinese Journal of Grassland, 2023, 45(8): 10–22.
李岩, 米鑫丰, 闫丽, 等. 白颖苔草 UDP-糖基转移酶 *UGT72B3* 基因的克隆与耐盐性分析. 中国草地学报, 2023, 45(8): 10–22.
- [26] Li Y, Yang Q, Huang H, *et al.* Overexpression of *PvWAK3* from seashore paspalum increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* via maintenance of ion and ROS homeostasis. Plant Physiology and Biochemistry, 2024, 207: 108337.
- [27] Yu Y G, Wu Y X, He L. A wheat WRKY transcription factor *TaWRKY17* enhances tolerance to salt stress in transgenic *Arabidopsis* and wheat plant. Plant Molecular Biology, 2023, 113(4): 171–191.
- [28] Wang J J, An C, Guo H L, *et al.* Physiological and transcriptomic analyses reveal the mechanisms underlying the salt tolerance of *Zoysia japonica* Steud. BMC Plant Biology, 2020, 20: 1–16.
- [29] Yamasaki K, Kigawa T, Seki M, *et al.* DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution. Trends in Plant Science, 2013, 18(5): 267–276.
- [30] Zhang H Y, Liu Y W, Yang J F, *et al.* Identification and analysis of salt tolerance of wheat transcription factor *TaWRKY33* protein. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(24): 4591–4602.
张惠媛, 刘永伟, 杨军峰, 等. 小麦转录因子基因 *TaWRKY33* 的耐盐性分析. 中国农业科学, 2018, 51(24): 4591–4602.
- [31] Qin Y, Tian Y, Liu X. A wheat salinity-induced WRKY transcription factor *TaWRKY93* confers multiple abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 464(2): 428–433.
- [32] Lv B B, Wu Q, Wang A H, *et al.* A WRKY transcription factor, *FtWRKY46*, from Tartary buckwheat improves salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 147: 43–53.
- [33] Li P L, Song A P, Gao C Y, *et al.* Chrysanthemum WRKY gene *CmWRKY17* negatively regulates salt stress tolerance in transgenic chrysanthemum and *Arabidopsis* plants. Plant Cell Reports, 2015, 34(8): 1365–1378.
- [34] Muchate N S, Nikalje G C, Rajurkar N S, *et al.* Plant salt stress: adaptive responses, tolerance mechanism and bioengineering for salt tolerance. The Botanical Review, 2016, 82(4): 371–406.
- [35] Wang Q, Guan C, Wang P, *et al.* The effect of *AtHKT1; 1* or *AtSOS1* mutation on the expressions of Na^+ or K^+ transporter genes and ion homeostasis in *Arabidopsis thaliana* under salt stress. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(5): 1085.
- [36] Shi H Z, Zhu J K. Regulation of expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid. Plant Molecular Biology, 2002, 50(3): 543–550.
- [37] Ryu H, Cho Y G. Plant hormones in salt stress tolerance. Journal of Plant Biology, 2015, 58(3): 147–155.
- [38] Mahajan S, Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 444(2): 139–158.