

AtWRKY63 基因过表达拟南芥 对核盘菌抗性的研究

陈晓婷^{1,2}, 刘 军¹, 林桂芳¹, 孙翠霞¹

(1 福建农林大学 生命科学学院, 福州 350002; 2 福建农林大学 生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福州 350002)

摘 要:为研究草酸在核盘菌致病过程中可能的作用,以模式植物拟南芥为材料,采用 30 mmol/L 草酸喷施 3 周龄拟南芥,发现草酸显著诱导拟南芥 *AtWRKY63* 的表达。通过构建 *AtWRKY63* 过表达载体转化拟南芥,获得过表达 *AtWRKY63* 的纯系转基因植株,再用核盘菌活体接种拟南芥,结果表明过表达 *AtWRKY63* 植株对核盘菌的抗性显著增强。组织化学染色结果表明,*AtWRKY63* 是通过诱导植物的氧爆发,抑制核盘菌菌丝的生长来抵御核盘菌的侵染;qRT-PCR 对拟南芥转录水平分析表明,*AtWRKY63* 可能激活了过表达植株的水杨酸与茉莉酸依赖的抗病信号途径,从而增强对核盘菌的抗性。

关键词:拟南芥;*AtWRKY63*;核盘菌;草酸

中图分类号:Q789 **文献标志码:**A

AtWRKY63-overexpression in *Arabidopsis* Confers Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*

CHEN Xiaoting^{1,2}, LIU Jun¹, LIN Guifang¹, SUN Cuixia¹

(1 College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2 Key Laboratory of Bio-pesticide and Chemistry Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: To explore the potential roles of oxalic acid (OA) in the pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*, we sprayed 30 mmol/L OA evenly onto 3-week-old *Arabidopsis* and found *AtWRKY63* was markedly induced by OA. To further elucidate the function of *AtWRKY63*, we obtained pure line of *AtWRKY63*-overexpression *Arabidopsis* by constructing *AtWRKY63*-overexpression vector and transforming *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* plants overexpressing *AtWRKY63* showed enhanced resistance to *S. sclerotiorum*. Histochemical staining revealed that overexpression of *AtWRKY63* induced oxidative burst in host plants, which suppressed the hyphal growth of *S. sclerotiorum*, and consequently inhibited fungal infection. qRT-PCR analysis indicated that *AtWRKY63* may involve in salicylic acid-dependent and jasmonic acid-dependent defense signaling pathway, thus, confers the resistance to *S. sclerotiorum*.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; *AtWRKY63*; *Sclerotinia sclerotiorum*; oxalic acid

植物 WRKY 转录因子家族是植物最大的转录因子家族之一,它参与调控植物的生长发育和应对各种生物及非生物胁迫^[1-2]。WRKY 转录因子的 N 末端有高度保守的 WRKYGQK 氨基酸序列,C 末端有特征的锌指结构元件。WRKY 结构域能够专

一地与靶基因启动子核心序列的 C/TTGACT/C (W 盒)相结合,激活或抑制目的基因的转录表达^[3]。WRKY 转录因子家族在拟南芥中有 74 个成员,水稻中有 109 个成员。关于 WRKY 转录因子在植物防御反应中的作用是研究的热点之一,

收稿日期:2014-04-20;修改稿收到日期:2014-07-10

基金项目:国家自然科学基金(30671347);福建省自然科学基金(2012J01079)

作者简介:陈晓婷(1968-),女,博士,副教授,主要从事植物逆境生理生化与分子生物学研究。E-mail:levtring@126.com

WRKY 因子能通过自调控、交叉调控及与靶基因 W 盒专一结合等方式,形成完整的信号网络,从而使植物更好地适应外界的各种胁迫^[1-2]。

转基因方法是用来研究 WRKY 基因可能的生物学功能的常规手段。在水稻中,过表达 *O_sWRKY13* 通过激活水杨酸 (salicylic acid, SA) 途径相关基因表达、抑制茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 信号途径来增强水稻对黄单胞杆菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 和稻瘟病菌 (*Magnaportha grisea*) 的抗性^[4-5]。过表达 *O_sWRKY53*、*O_sWRKY45* 的水稻能增强对稻瘟病菌的抗性^[6-7],过表达 *O_sWRKY3*、*O_sWRKY71* 的水稻对黄单胞杆菌的抗性增强^[8-9]。但 *O_sWRKY62* 却被鉴定为水稻防御反应的一个负调控因子,过表达 *O_sWRKY62* 的水稻会抑制防御基因的表达,丧失了由 Xa21 介导的对黄单胞杆菌的抗性^[10]; *O_sWRKY28* 也是一个基础防御反应的一个负调控因子,过表达 *O_sWRKY28* 的水稻对稻瘟菌 Ina86-137 更加敏感^[11]。拟南芥 *AtWRKY7*、*AtWRKY11*、*AtWRKY17*、*AtWRKY18*、*AtWRKY23*、*AtWRKY25*、*AtWRKY27*、*AtWRKY38*、*AtWRKY40*、*AtWRKY41*、*AtWRKY48*、*AtWRKY53*、*AtWRKY58*、*AtWRKY60*、*AtWRKY62* 被鉴定为植物免疫反应的负调控因子,而 *AtWRKY3*、*AtWRKY4*、*AtWRKY33*、*AtWRKY53*、*AtWRKY70* 为植物对死体营养型病菌,如灰霉 (*Botrytis cinerea*) 和链格孢 (*Alternaria brassiciola*) 抗病反应的正调控因子^[12-15]; *AtWRKY46*、*AtWRKY70*、*AtWRKY53* 对活体营养型病菌 (*Pseudomonas syringae*) 也有正调控功能,这几个 WRKY 基因在基础防御反应中有协同作用和功能冗余现象^[16]。最近的研究成果^[17]表明,在油菜 (*Brassica napus*) 中过表达 *BnWRKY33* 增强油菜对核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的抗性。

核盘菌是一类寄主范围广,能够侵染 400 多种植物的病原真菌,每年因此造成的生产损失十分严重。核盘菌的致病机理十分复杂,在致病过程中分泌草酸 (oxalic acid, OA) 及各种细胞壁降解酶类。OA 在核盘菌的致病过程中起着关键的作用,它能酸化寄主组织,促进真菌细胞壁降解酶更好的发挥作用,OA 还能螯合钙离子,破坏寄主细胞壁^[18-19]。相比野生型核盘菌,草酸分泌缺失突变体对植物菜豆和番茄侵染危害小,甚至不侵染^[20-21]。由于草酸在核盘菌侵染植物中所起的关键作用,我们利用拟南芥芯片,获得在草酸胁迫下拟南芥 WRKY 基因的差异表达谱^[22],本研究探讨了其中一个上调表达的 *AtWRKY63* 在核盘菌抗性中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

拟南芥野生型 (Col 0),常规消毒后播种于 MS 固体培养基上,4 °C 处理 2~3 d 后,置于温室 (22 ± 1) °C,12 h (9:00~21:00) 光照,12 h 黑暗培养 10 d 后,移栽到土壤中培养。

1.2 方法

1.2.1 草酸喷雾试验及核盘菌接种 均匀喷施 30 mmol/L 草酸 (pH 1.7) 于 3 周龄拟南芥叶片上,22 °C 高度保湿,于 0、1、2、12、24、48、72 h 取样,液氮速冻,提 RNA;挑野生型核盘菌菌种 1980 的菌丝块活化于 1/8 PDA 培养基中,22 °C 弱光培养 3~5 d,用打孔器取边缘生长均匀的核盘菌菌丝倒置放于 4 周龄拟南芥叶片上,接种环境为 22 °C 闭光保湿,接种 24 h 左右观察表型^[22]。

1.2.2 DNA、RNA 提取,半定量 RT-PCR 及 qRT-PCR 植物叶片 DNA、RNA 提取及反转录参考 TaKaRa 试剂盒说明书。半定量 RT-PCR 的内参基因为 *Actin2*。荧光定量 PCR 参考 TaKaRa 试剂盒 (DRR041A) 说明书,内参基因为 *Actin8*。20 μL 扩增体系包含 2 × PCR buffer 10 μL,上下游引物各 0.4 μL,cDNA 模板 1 μL,ddH₂O 8.2 μL。扩增引物见表 1。

1.2.3 *AtWRKY63* 启动子顺式作用元件分析 从 TAIR 网站获得 *AtWRKY63* 起始密码子前的 1 000 bp 序列,利用 The PlantCARE Database (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线网站对 *AtWRKY63* 启动子的顺式作用元件进行分析^[23]。

1.2.4 *AtWRKY63* 过表达载体的构建及拟南芥的转化 利用 Primer 5.0 软件设计带有 *Xba* I 与 *Bam* H I 双酶切位点的特异引物 OEWRKY63F (5'-GCTCTAGAGCATGTTTTCAACATCGATCAC-3') 和 OEWRKY63R (5'-CGGGATCCCGTCAAACAACATCAGGTCTTC-3'),以野生型拟南芥 cDNA 为模板,Ex Taq 酶进行 PCR 扩增,扩增条件为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,53 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环,72 °C 延伸 10 min,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,切胶回收,连入 pMD18-T 进行测序。用 *Xba* I 与 *Bam* H I 双酶切 pCambia1300-221 和含有目的片段的克隆载体,回收目的片段与表达载体片段,T₄ DNA 连接酶 16 °C 连接过夜,转化大肠杆菌 DH5α,酶切鉴定正确

表 1 本研究所用引物序列
Table 1 Primer sequences in this test

基因 Gene	基因座 Locus	引物名称 Primer name	引物序列 Primer Sequence(5'-3')
<i>ACTIN8</i>	<i>At1g49240</i>	<i>qActin8F</i> <i>qActin8R</i>	AGTGGTCGTACAACCGGTATTGT GAGGATAGCATGTGGAAGTGAGAA
<i>ACTIN2</i>	<i>At3g18780</i>	<i>Actin2F</i> <i>Actin2R</i>	CACTGTGCCAATCTACGAGGGT CACAAACGAGGGCTGGAACAAG
<i>PR1</i>	<i>At2g14610</i>	<i>qPR1F</i> <i>qPR1R</i>	CCCACAAGATTATCTAAGGGTTCAC CCCTCTCGTCCCCTGCAT
<i>PAL1</i>	<i>At2g37040</i>	<i>qPAL1F</i> <i>qPAL1R</i>	TTCAAGGGAGCTGAGATTGC GCTCTGCTGATTGAACATGG
<i>LOX2</i>	<i>At3g45140</i>	<i>qLOX2F</i> <i>qLOX2R</i>	CAATCGTAGTTACCACACCAATC AGTGAAGTGC GGAACATAGG
<i>VSP1</i>	<i>At5g24780</i>	<i>qVSP1F</i> <i>qVSP1R</i>	GTTACACCAACAGCCTTGAG TATGGATATGGGACCGAGA

的载体转入农杆菌 GV3101,通过农杆菌浸花法转化野生型拟南芥^[24],利用潮霉素对转基因植株 T₂代进行筛选,鉴定出纯系用于核盘菌接种及组织化学染色实验。

1.2.5 叶片组织染色 核盘菌接种 8 h 后的叶片用二氨基联苯胺 DAB(0.1 mg/mL)染色过夜,随后用 95%乙醇脱色 3 h 以上置于 Olympus SZX16 或 BX51 显微镜上观察^[25]。台盼蓝染色也取接种 8 h 的叶片,染色脱色后置于显微镜上观察^[26]。

1.2.6 数据处理与分析 实验中的数据处理与分析采用 PASW statistics 18 分析软件,差异显著分析采用单因素方差分析,图形制作与处理应用 Origin 8.5 软件。

2 结果与分析

2.1 草酸诱导拟南芥 *AtWRKY63* 的表达

基于草酸胁迫下拟南芥 *WRKY* 基因的差异表达谱,*AtWRKY63* 受草酸胁迫诱导表达^[22]。采用半定量 RT-PCR 来验证芯片结果的可靠性,对 3 周龄拟南芥幼苗用草酸胁迫 0、1、2、4、12、24、48、72 h 不同时间段,半定量 RT-PCR 分析 *AtWRKY63* 在转录水平上的变化情况表明:草酸胁迫 1 h 后,*AtWRKY63* 的表达量迅速上调,胁迫 12 h 达到最高值;随着胁迫时间的延长,*AtWRKY63* 基因转录水平有所下调(图 1,A)。

2.2 过表达突变体的构建及验证

将 *AtWRKY63* 在拟南芥中稳定表达,激活植物的相关信号途径,可能是拟南芥应对草酸胁迫或核盘菌浸染的途径之一。因此,将 *AtWRKY63* 的 CDS 序列参照 1.2.4 方案导入到双元表达载体 pCAMBIA1300-221 中,图 1,B 是载体构建策略示意图。由于在 PCR 引物中引入了 *Xba* I 与 *Bam* H

I 酶切位点,筛选出阳性克隆子后,双酶切检测目的片段是否连入载体。酶切产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳分析,结果出现 2 条带,较小的条带大约为 750 bp,与目的片段大小一致(图 1,C),表明 *AtWRKY63* 成功克隆至 pCAMBIA1300-221 载体中。将过表达载体用农杆菌浸花法^[18]转化拟南芥,利用 25 mg/L 潮霉素对转基因拟南芥 T₂ 代种子进行筛选,鉴定出纯合的过表达转基因株系用于后续实验。

2.3 过表达 *AtWRKY63* 增强拟南芥对核盘菌的抗性

采用半定量 RT-PCR 比较了野生型及转基因植株 *AtWRKY63* 的表达情况,发现 *AtWRKY63* 确实在拟南芥中超表达(图 1,D)。为验证 *AtWRKY63* 过表达植株是否增强拟南芥对核盘菌的抗性,对 4 周龄的拟南芥进行了活体接种及离体叶片接种。从接种 24 h(图 2,A1)、48 h(图 2,A2)的病斑扩展情况来看可以看出,核盘菌菌丝对野生型危害严重,侵染整个拟南芥莲座,而突变体中莲座处未受到核盘菌的侵染;从接种 24 h 病斑面积(图 2,B)可见,*AtWRKY63* 过表达植株对核盘菌具有显著的抗性($P < 0.05$);对接种 8 h 的侵染叶片中核盘菌菌丝生长前端台盼蓝染色(图 2,C1、C2)显示核盘菌在野生型中生长舒展;C2 显示转基因植株中核盘菌菌丝生长紧密、弯曲,这意味着转基因植株核盘菌的生长受到阻碍;对接种 8 h 的侵染叶片的 DAB 染色结果显示在转基因植株中,棕褐色的氧化斑点较多,面积也较大,而野生型却几乎见不到棕褐色氧化斑点。说明转基因植株的氧爆发情况比野生型显著许多,转基因植株很可能通过活性氧的大量产生来抵抗核盘菌的侵染(图 2,C3、C4)。

2.4 *AtWRKY63* 启动子顺式作用元件分析

通过 PlantCARE 网站对 *AtWRKY63* 的启动

子顺式作用元件进行预测。结果表明 *AtWRKY63* 启动子内除了 CAAT-box 和 TATA-box 等真核生物必需的启动子结构元件外,还包含一些与胁迫响应相关的元件。其中与非生物胁迫相关的顺式作用元件包括与低温胁迫相关的 LTR, 厌氧胁迫有关的元件 ARE。与生物胁迫相关的顺式作用元件包含 1 个参与水杨酸反应的 TCA 元件、5 个茉莉酸响应元件。此外,还预测到 1 个与生长发育相关的生长素响应元件 TGA-box, 许多参与光响应的元件, 包括 ACA-motif、ACE 元件、AE-box、ATCT-motif、BOX4、BOX I、GATA 元件、TCCC-motif(表 2)。

2.5 *AtWRKY63* 参与的抗病信号途径分析

为研究 *AtWRKY63* 转基因植株是否引起下游抗病信号途径的改变,采用 qRT-PCR 比较了野生型及转 *AtWRKY63* 基因植株的 *AtWRKY63* 及 4 个抗病信号途径标志基因的转录水平。其中编码苯丙氨酸解氨酶的 *PAL1* 及编码病程相关蛋白的 *PR1* 基因是水杨酸抗病信号途径的标志基因, 编码营养贮藏蛋白 *VSP1* 和编码脂氧合酶 *LOX2* 是乙烯/茉莉酸信号途径的标志基因, 它们受茉莉酸或创伤诱导。由图 3 可知, 与野生型对照相比, *AtWRKY63* 转基因植株的 *AtWRKY63* 的表达量显著

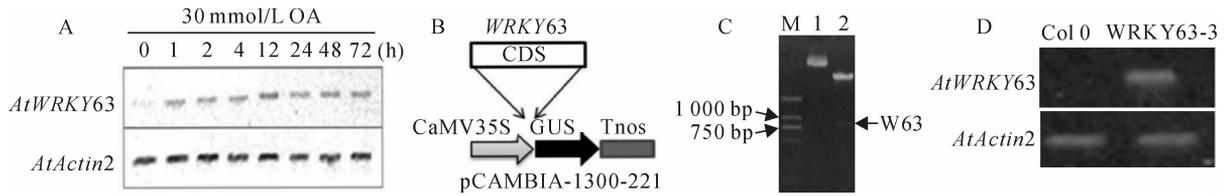


图 1 草酸诱导拟南芥 *AtWRKY63* 的表达及 *AtWRKY63* 过表达载体的构建与验证

A. 草酸处理拟南芥后 72 h 内 *AtWRKY63* 的转录水平; B. *AtWRKY63* 过表达载体的构建示意图; C. *AtWRKY63* 重组质粒双酶切鉴定: M. DL2000; 1. 质粒 pCambia1300-221(对照); 2. 重组质粒; D. *AtWRKY63* 过表达植株与野生型的 *AtWRKY63* 表达水平

Fig. 1 The induction of *AtWRKY63* by OA and construction and validation of the overexpression vector of *AtWRKY63*

A. The time course of transcription levels of *AtWRKY63* analyzed by semi-quantitative RT-PCR in 3-week-old seedlings challenged with 30 mmol/L OA; B. Construction strategy of *AtWRKY63* overexpression vector; C. Identification of recombinant plasmid containing *AtWRKY63* by double enzyme digestion. M. DL2000 DNA marker; Lane 1. Plasmid pCambia1300-221(control); Lane 2. Recombinant plasmid; D. Validation of *AtWRKY63* overexpression lines by RT-PCR

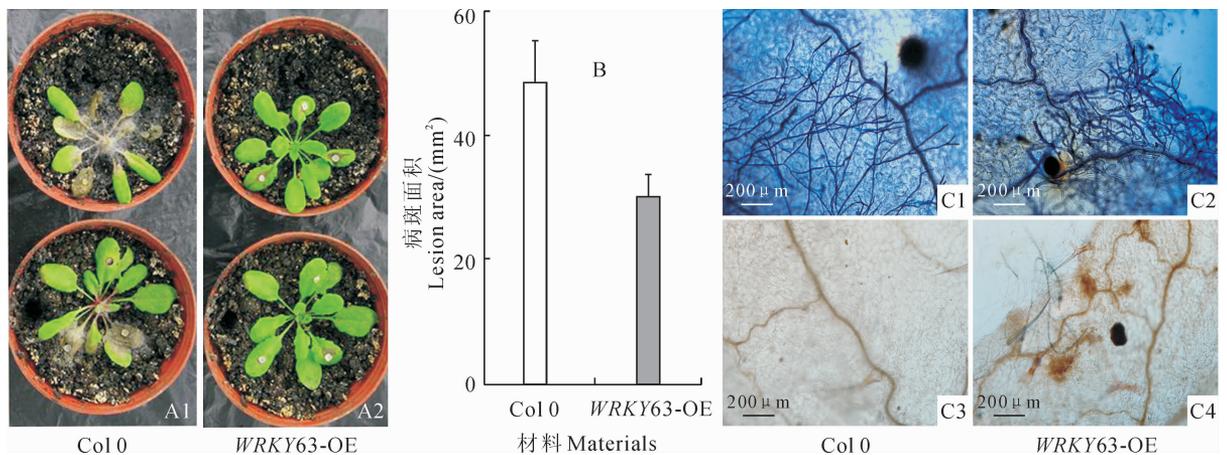


图 2 过表达 *AtWRKY63* 增强拟南芥对核盘菌的抗性

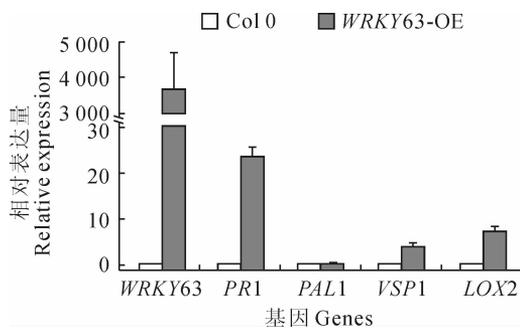
A. 野生型与 *AtWRKY63* 过表达植株活体接种核盘菌 24 h(A1), 48 h(A2) 病斑扩展情况; B. *AtWRKY63* 过表达植株与野生型核盘菌接种 24 h 后的病斑面积; C1、C2. 核盘菌接种 8 h 后, 侵染植株叶片的核盘菌菌丝台盼蓝染色结果; C3、C4. 侵染叶片的 DAB 染色结果

Fig. 2 *AtWRKY63* overexpression lines conferred enhanced resistance to *S. sclerotiorum*

A. Representatives of disease symptom in wild type and *AtWRKY63* over-expression line for 24(A1) and 48(A2) hours post inoculation(hpi); B. Lesion area of inoculated leaves of wild type and *AtWRKY63* overexpression line(24 hpi); C1, C2. Trypan staining of hypha of inoculated leaves(8 hpi); C3, C4. ROS accumulation in inoculated *Arabidopsis* leaves stained with DAB

表 2 *AtWRKY63* 启动子区包含的顺式作用元件Table 2 Cis-acting elements in the promoter of *AtWRKY63*

元件 Element	碱基位置 Base site	功能 Function	数量 Number
ARE	-725	厌氧诱导元件 Anaerobic-responsive element	1
LTR	-222	低温响应元件 Low-temperature responsiveness	1
TCA	-441	水杨酸响应元件 SA responsiveness	1
CGTCA-motif	-719, -304	茉莉酸响应元件 JA responsiveness	2
TGACG	-510, -633, -649	茉莉酸响应元件 JA responsiveness	3
TGA-box	-633	生长素响应元件 Auxin responsive element	1
Skn-1 motif	-303, -718	胚乳调控响应元件 Endosperm expression regulatory element	2
ACA-motif	-989	光响应元件 Light responsiveness	1
ACE	-822	光响应元件 Light responsiveness	1
AE-box	-291	光响应元件 Light responsiveness	1
ATCT-motif	-15	光响应元件 Light responsiveness	1
Box 4	-843	光响应元件 Light responsiveness	1
Box I	-113	光响应元件 Light responsiveness	1
GATA	-678	光响应元件 Light responsiveness	1
TCCC-motif	-441	光响应元件 Light responsiveness	1

图 3 野生型拟南芥与 *AtWRKY63* 过表达植株的防卫基因表达情况Fig. 3 Transcriptional expression profiling of defense-related genes in *AtWRKY63* overexpression lines and wild type

提高,说明转基因植株确实超表达 *AtWRKY63*,在转基因植株中,虽然 *PAL1* 的相对表达量仅为 1.1,但 *PR1* 的相对表达量为 23.7,而 *LOX2*、*VSP1* 的相对表达量分别为 7.9 和 4.3,说明 *AtWRKY63* 的超表达激活了依赖于 SA 及 JA 的抗病信号途径,从而增强转基因植株对核盘菌的抗性,此外,对 *AtWRKY63* 启动子前 1 000 bp 的序列分析也表明其启动子含 JA、SA 响应元件。

3 讨论

草酸作为死体营养型的植物病原真菌的重要致病因子,其作用机制一直是研究的热点。基于表达谱芯片的高通量及高效率,获得草酸胁迫下拟南芥 *WRKY* 基因的差异表达谱,对受草酸胁迫诱导表达

的 *AtWRKY28*、*AtWRKY75* 进一步研究表明,过表达 *AtWRKY28*、*AtWRKY75* 的转基因拟南芥能显著增强对草酸及核盘菌的抗性^[22]。有趣的是,甘蓝型油菜的 *BnWRKY28* 与 *BnWRKY75* 在受核盘菌侵染后也是显著上调表达的^[27]。研究表明植物对核盘菌的抗性与其对草酸的抗性有一定的相关性。

本研究选取受草酸诱导表达的 *AtWRKY63* (芯片中上调倍数为 8.55) 进行进一步的研究。*AtWRKY63* 属于 *WRKY* 家族 III 类转录因子^[28],目前关于 *AtWRKY63* 功能的研究还十分有限,Ren 等^[29] 发现 *ABO3/AtWRKY63* 定位于细胞核内,且体外实验证实 *AtWRKY63* 能够特异结合到 *ABF2* (Abscisic acid responsive elements-binding factor 2) 启动子的 W 盒上,*ABO3/AtWRKY63* 的 T-DNA 插入失活突变体 *abo3* 在种子萌发及幼苗生长阶段对 ABA 十分敏感,*abo3* 削弱了 ABA 诱导的气孔关闭并对干旱胁迫更敏感,*abo3* 在 ABA 处理的早期,会降低 *ABF2* 及下游胁迫诱导的基因 *RD29A* 及 *COR47* 的表达。Van Aken 等^[30] 研究表明 *AtWRKY63* 在拟南芥应对高光照胁迫中起重要作用,它能诱导许多编码线粒体蛋白的基因的表达。本研究将受核盘菌致病因子草酸诱导表达的 *AtWRKY63* 在拟南芥中进行超表达,发现 *AtWRKY63* 能通过诱导植物的氧爆发,抑制核盘菌菌丝的生长来抵御核盘菌的侵染,qRT-PCR 分析还表明 *AtWRKY63* 的超表达激活了依赖于 SA 及 JA 的抗病信号途径。本研究结果丰富了对拟南芥-核盘菌互作的认识。

参考文献:

- [1] EULGEM T, SOMSSICH I E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling[J]. *Current Opinion of Plant Biology*, 2007, **10**(4): 366—371.
- [2] RUSHTON P J, SOMSSICH I E, RINGLER P, et al. WRKY transcription factors[J]. *Trends in Plant Sciences*, 2010, **15**(5): 247—258.
- [3] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEKS, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. *Trends in Plant Science*, 2000, **5**(5): 199—205.
- [4] QIU D, XIAO J, DING X, et al. OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, **20**(5): 492—499.
- [5] QIU D, XIAO J, XIE W, et al. Rice gene network inferred from expression profiling of plant overexpressing OsWRKY13, a positive regulator of disease resistance[J]. *Molecular Plant*, 2008, **1**(3): 538—551.
- [6] CHUJO T, TAKAI R, AKIMOTO-TOMIYAMA C, et al. Involvement of the elicitor-induced gene OsWRKY53 in the expression of defense-related genes in rice[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, **1769**(7): 497—505.
- [7] SHIMONO M, SUGANO S, NAKAYAMA A, et al. Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance[J]. *The Plant Cell*, 2007, **19**(6): 2064—2076.
- [8] CHUJO T, KATO T, YAMADA K T, et al. Characterization of an elicitor-induced rice WRKY gene, OsWRKY71[J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2008, **72**(1): 240—245.
- [9] LIU X Q, BAI X Q, QIAN Q, et al. OsWRKY03, a rice transcriptional activator that functions in defense signaling pathway upstream of OsNPR1[J]. *Cell Research*, 2005, **15**(8): 593—603.
- [10] PENG Y, BARTLEY L E, CHEN X, et al. OsWRKY62 is a negative regulator of basal Xa21-mediated defense against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice[J]. *Molecular Plant*, 2008, **1**(3): 446—458.
- [11] CHUJO T, MIYAMOTO K, SHIMOYAMA T, et al. OsWRKY28, a PAMP-responsive transrepressor, negatively regulates innate immune responses in rice against rice blast fungus[J]. *Plant Molecular Biology*, 2013, **82**(1-2): 23—37.
- [12] PANDEY S P, SOMSSICH I E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity[J]. *Plant Physiology*, 2009, **150**(4): 1648—1655.
- [13] LAI Z, VINOD K, ZHENG Z, et al. Roles of *Arabidopsis* WRKY3 and WRKY4 transcription factors in plant responses to pathogens[J]. *BMC Plant Biology*, 2008, **8**(1): 68.
- [14] ZHENG Z, QAMAR S A, CHEN Z, et al. *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens[J]. *The Plant Journal*, 2006, **48**(4): 592—605.
- [15] WANG D, AMORNIRIPANITICH N, DONG X. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants[J]. *PLoS Pathogen*, 2006, **2**(11): e123.
- [16] HU Y, DONG Q, YU D. *Arabidopsis* WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*[J]. *Plant Science*, 2012, **185**: 288—297.
- [17] WANG Z, FANG H, CHEN Y, et al. Overexpression of *BnWRKY33* in oilseed rape enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2014, **15**(7): 677—689.
- [18] DICKMAN M B, MITRA A. *Arabidopsis thaliana* as a model for studying *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1992, **41**(4): 255—263.
- [19] BOLTON M D, THOMAS B P H J, NELSON B D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2005, **6**(3): 1—16.
- [20] GODOY G, STEADMAN JR, DICKMAN M B, et al. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1990, **37**(3): 179—191.
- [21] WILLIAMS B, KABBAGE M, KIM H J, et al. Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment[J]. *PLoS Pathogen*, 2011, **7**(6): e1002107.
- [22] CHEN X, LIU J, LIN G, et al. Overexpression of *AtWRKY28* and *AtWRKY75* in *Arabidopsis* enhances resistance to oxalic acid and *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, **32**(10): 1589—1599.
- [23] LESCOT M, DEHAIS P, THIJS G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, **30**(1): 325—327.
- [24] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 1998, **16**(6): 735—743.
- [25] WEIGEL D, GLAZEBROOK J. *Arabidopsis*: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor of Laboratory Press, 2002.
- [26] KOCH E, SLUSARENKO A. *Arabidopsis* susceptible to infection by a downy mildew fungus[J]. *The Plant Cell*, 1990, **2**(5): 437—445.
- [27] YANG B, JIANG Y, RAHMAN M H, et al. Identification and expression analysis of WRKY transcription factor genes in *Brassica napus* L. in response to fungal pathogens and hormone treatments[J]. *BMC Plant Biology*, 2009, **9**(1): 68.
- [28] WUKL, GUO Z J, WANG H H, et al. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins[J]. *DNA Research*, 2005, **12**(1): 9—26.
- [29] REN X, CHEN Z, LIU Y, et al. ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2010, **63**(3): 417—429.
- [30] VAN AKEN O, ZHANG B, LAW S, et al. *AtWRKY40* and *AtWRKY63* modulate the expression of stress-responsive nuclear genes encoding mitochondrial and chloroplast proteins[J]. *Plant Physiology*, 2013, **162**(1): 254—271.