

doi:10.3969/j.issn.2095-1736.2015.06.001

毛果杨转录因子 PtrWRKY25 的克隆及功能验证

尹佳^{1,2}, 周党卫¹

(1. 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001;
2. 中国科学院大学, 北京 100039)

摘要 通过 RT-PCR 的方法获得毛果杨 (*Populus trichocarpa*) *PtrWRKY25* (Potri.007G078200.1)。经氨基酸比对分析毛果杨 *PtrWRKY25* 蛋白与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *AtWRKY12*、葡萄 (*Vitis vinifera*) *VvWRKY2* 以及苜蓿 (*Medicago truncatula*) *MtSTP* 的 WRKY 结构域有较高同源性。利用荧光定量及半定量检测 *PtrWRKY25* 组织表达量发现该基因在茎中表达量最高, 其次为韧皮部和木质部。植物组织切片间苯三酚染色发现 *PtrWRKY25* 转基因株系次生壁较野生型也有减少的趋势。检测农杆菌介导在毛白杨中超量表达的 *PtrWRKY25* 转基因株系木质素含量发现, 相较于野生型, 转基因植株中木质素含量减少约 1 倍, 表明 *PtrWRKY25* 可能主要在木质素合成途径中发挥作用。

关键词 毛果杨; *PtrWRKY25*; 木质素

中图分类号 Q943.2; S792.11

文献标识码 A

文章编号 2095-1736(2015)06-0001-05

Molecular cloning and characterization of transcription factor *PtrWRKY25* from *Populus trichocarpa*

YIN Jia^{1,2}, ZHOU Dang-wei¹

(1. Key Laboratory of Adaption and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract A complete fragment representing the *PtrWRKY25* (Potri.007G078200.1) isolated from *Populus trichocarpa* by reverse transcription PCR (RT-PCR) displayed significant similarity with other WRKY factors in *Arabidopsis*'s *AtWRKY12*, *Vitis vinifera*'s *VvWRKY2* and *Medicago truncatula*'s *MtSTP* gene. The expression profiles of *PtrWRKY25* showed the highest transcript level in stem and relatively low level in phloem and xylem. Plant tissue sections between phloroglucinol staining found *PtrWRKY25* transgenic lines compared with wild-type secondary wall also showed a decreasing trend. To investigate its *in vivo* function, *PtrWRKY25* was expressed under control of the CaMV35S promoter in *Populus trichocarpa* by Agrobacterium-mediated transformation. About 1 time lower accumulation of lignin was detected in transgenic plants harboring *PtrWRKY25*, which was in agreement with the toluidine blue staining of stem. Our findings suggested that *PtrWRKY25* might play more important roles in biosynthesis of lignin.

Keywords *Populus trichocarpa*; *PtrWRKY25*; lignin

木质素是存在于自然界中最丰富的生物质能源, 主要储存在植物纤维组织中, 其生产量仅次于纤维素, 是丰富的天然芳香族高分子化合物^[1-3]。木质素的合成以苯丙烷起始, 经过一系列反应最终生成香豆醇 (*coumaryl alcohol*)、松柏醇 (*coniferyl alcohol*) 和芥子醇 (*sinapyl alcohol*) 3 种甲基化程度不同的木质素单体。这些单体经氧化聚合生成相应的 3 种木质素: 对羟基苯基木质素 (*hydroxy phenyl*

lignin H-木质素)、愈创木基木质素 (*guaiacyl lignin* G-木质素) 和紫丁香基木质素 (*syringyl lignin* S-木质素)。最后这些木质素在植物体内通过多种键型连接在一起, 形成结构复杂的木质素聚集体^[4-6] (图 1)。由于木质素的合成途径是一个多基因多通路的调节过程, 其中木质素合成途径的调节有多少因子参与调控, 仍然有待进一步研究^[7-8]。

收稿日期: 2015-03-18; 修回日期: 2015-04-10

基金项目: 国家自然科学基金 (31070208)

作者简介: 尹佳, 硕士研究生, 主要从事植物遗传多样性研究;

通信作者: 周党卫, 博士, 副研究员, 主要从事高山植物适应于进化研究, E-mail: dangweizhou@sina.com。

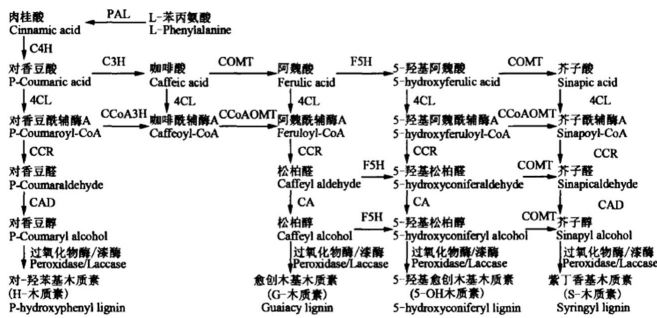


图 1 苯丙烷途径合成木质素单体的示意图^[8]

Fig 1 The shema diagram of lignin monomer synthesis pathway^[8]

植物木质素合成途径研究比较深入的有 NAC 转录因子家族和 R2R3-MYB 转录因子家族。作为植物特有的另一大家族 WRKY 转录因子的研究主要集中在生物及非生物胁迫方面,对木质素的调控研究较少。WRKY 转录因子因其 N-端含有 7 个 WRKYGQK 高度保守氨基酸序列而命名,它与 W-box: (T)(T)TGAC(C/T) 序列特异结合,可调节启动子中含有 W-box 元件的调节基因及功能基因的表达。根据 WRKY 结构域的个数和锌指结构的不同,一般可将 WRKY 转录因子分为 3 大类: I 类 WRKY 转录因子含有 2 个 WRKY 结构域,锌指结构为 C2H2(C-X4-5-C-X22-23-H-X1-H) 型;而 II 类和 III 类 WRKY 转录因子只含有一个 WRKY 结构域,锌指结构分别为 C2H2(C-X4-5-C-X22-23-H-X1-H) 及 C2-HC(C-X7-C-X23-H-X1-C) 型^[9-12]。

杨树是木本植物中的模式生物,具有生长繁殖快、适应性强的优点,是我国重要的经济树种^[13-14]。然而,在木质素的调控途径中 WRKY 转录因子家族对木质素合成途径调控网络的研究目前还不是很明了^[15]。近来,伴随着杨树全基因组测序工作的完成,利用分子手段对杨树进行生物学研究越来越方便^[16]。本实验以毛果杨和毛白杨为主要实验材料,通过基因克隆的手段获得毛果杨 *PtrWRKY25* 并利用根癌农杆菌介导转化使其在毛白杨超量转录表达,希望对基因功能进行初步研究,从而在分子水平上揭示 *PtrWRKY25* 在木质素合成途径中扮演的角色,为将来可以利用分子手段培育优良林木木种提供坚实的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料

毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 和毛白杨 (*P. tomentosa* Carr.) 植物材料来自于西南大学资源植物研究所温室,培养条件为:室温 25℃ 培养,光照 (4 500 lx) 14 h,黑暗 10 h,用于基因的克隆和组织特异表达分析。

1.1.2 菌株和质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105、植物表达载体 pCXS^N^[17] 均为西南大学植物资源实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取及 *PtrWRKY25* 克隆

将采集的新鲜植物材料立即放于液氮中速冻,按照 Invitrogen 公司的 TRIzol[®] Reagent 试剂说明书步骤提取总 RNA。然后按照 TaKaRa 公司的反转录试剂盒 Prime-Script[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 说明书进行反转,获得相应 cDNA。依据杨树基因组测序的结果,为 *PtrWRKY25* 设计特异性引物进行扩增: *PtrWRKY25*-F: 5'-GAGAGAGAGATAAGAGATGGCAG-3'; *PtrWRKY25*-R: 5'-GCAGAGGCTAGATTAAGATGAC-3'。选用 PrimeSTART[™] HS (Premix) DNA Polymerase 高保真酶。设计 50 μ L PCR 反应体系: PrimeSTART[™] HS (Premix) 25 μ L, 无菌水 20 μ L, 目的片段 3 μ L, 正、反义引物各 1 μ L。选取毛果杨茎部的 cDNA 为模板,PCR 扩增的反应程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环;最后 72℃ 再延伸 10 min, 确保 PCR 产物的完整性。将 PCR 产物经电泳,利用 AXYGEn 公司 AxyPrep 胶回收试剂盒进行胶回收;胶回收产物加 A 后克隆至 pCXS^N 植物表达载体上;选取正义载体测序验证,经验证后为 100% 配对的正向载体进行植物遗传转化实验,选择标记基因为潮霉素 (*Hygromycin*, *Hyg*), 利用电转法转化农杆菌菌株 EHA105。

1.2.2 毛白杨遗传转化和分子鉴定

利用叶盘法转化野生型毛白杨^[18],野生型毛白杨组培苗为西南大学资源植物实验室无菌组培室培养。由于 pCXS^N 植物表达载体上含有 *Hyg* 抗性,因此利用 *Hyg* 作为转基因植株筛选压,转基因植物筛选抗生素 *Hyg* 浓度为 50 mg/mL。利用改良的 CTAB 法提取野生型及转基因毛白杨基因组 DNA,通过扩增 *Hyg* 进行验证。*Hyg* 扩增引为: *Hyg*-F: 5'-CTTCTACACAGCCATCGGTCAG-3'; *Hyg*-R: 5'-GATGTAGGAGGGCGTGGATATGTC-3'。设计 10 μ L PCR 反应体系: GoTaq[®] Green Master Mix 5 μ L, reaction buffer 4 μ L, 目的片段 DNA 0.5 μ L, 正反义引物各 0.25 μ L。分别以野生型和转基因毛白杨的基因组 DNA 为模板,扩增 *Hyg* 反应条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环;最后 72℃ 再延伸 10 min。扩增产物选用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 荧光定量 PCR 分析

利用半定量和荧光定量 PCR 对 *PtrWRKY25* 进行组织特异性表达分析。挑选高约为 1 m 左右的植株,将顶端起选定芽下第 1 叶子选为嫩叶,第 8 片叶子为老叶。跨内含子设计 *PtrWRKY25* 荧光定量引物: RT-*PtrWRKY25*-F: 5'-GAGTGTGATGGATGTGCTGGAT-3'; RT-*PtrWRKY25*-R: 5'-TGCTCTGCCTTCGTAGGTTGTG-3'。选择 18S 为内参基因,设计荧光定量引物为: RT-*Ptr18S*-F: 5'-CTTGGCAACAGATGGTCTAAG-3'; RT-*Ptr18S*-R: 5'-GCTAGACTGTCGTC-CAGCTTG-3'。qRT-PCR 采用 SYBR II Green Master Mix Reagent, 反应体系为 25 μ L: SYBR Green Master Mix 12.5 μ L, 正反义引物 (10 mol) 各 0.5 μ L, cDNA 1 μ L (约 30 ng), 灭菌水 10.5 μ L。反应程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 共 40 个循环。每个样品设

置3个重复。

1.2.4 序列对比与系统进化分析

通过查找美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 和美国能源部网站 (<http://www.phytozome.net/>) 获得不同物种 WRKY 蛋白序列, 利用 MEGA4.0^[19] 完成氨基酸序列同源性比对, 遗传进化树采用 MEGA4.0 邻近法 (Neighbor Joining, NJ) 来构建。

1.2.5 木质素含量测定

1) 利用 Klason 方法^[20-21] 测定野生型和转基因株系中酸不溶木质素的含量。

①取5g新鲜植物材料于1L的蓝盖瓶中, 加入750mL甲醇, 震荡均匀, 放置过夜; 倒出上清, 再加入750mL甲醇, 抽提2h, 期间震荡4次; 重复甲醇抽提2h一次, 滤纸过滤; 于烘箱中105℃烘干6h, 包于锡箔纸中备用。②玻璃筛于105℃的烘箱中烘干至恒重, 冷却后称重, 记录玻璃筛重量(W₂)。③准确称取1.00g甲醇抽提样品(W₁), 倒入50mL小烧杯中, 加入20mL 72% H₂SO₄, 玻璃棒搅动后, 30℃水浴1h, 每10min搅动1次。④将样品移入1L的蓝盖瓶中, 加入560mL灭菌水, 于灭菌锅中加热1h, 同时预备热的无菌水, 每样品需要100mL。⑤处理后的样品全部倒入玻璃筛中, 利用真空抽滤装置过滤, 过滤后用100mL热水冲洗, 滤液用于酸溶木质素含量的测定。⑥过滤后, 将带样品的玻璃筛放入烘箱中, 105℃烘干至恒重, 待冷却后, 准确称重(W₃)。⑦计算酸不溶木质素含量(%) = (W₃ - W₂) / W₁ × 100%。

2) 酸可溶木质素测定

将第5步中的酸不溶木质素测定的澄清滤液定容至500mL作为试样溶液; 取约4mL试样溶液放入石英比色杯中, 以4%的硫酸溶液作对照, 用紫外分光光度计于205nm波长处测定吸光度值; 若试样溶液的吸光度值大于0.7, 则另取4%硫酸溶液在容量瓶稀释滤液进行测定, 以便得到的吸光度值在0.2~0.7; 计算滤液中酸溶木质素的含量(B), 以克每升(g/L)表示: $B = (A \cdot D) / 110$, 式中A为吸光度值; D为滤液的稀释倍数, 未稀释后滤液的体积(mL)与原滤液的体积(mL)的比值; 110为稀释系数[L/(g·cm)], 该系数是由不同造纸原料和纸浆的平均值求得的。按上式计算酸溶木质素含量(%) = $(100 \cdot B \cdot V) / (1000W_1) \times 100\%$, 式中B为滤液中酸溶木质素含量(g/L); V为滤液的总体积(mL); W₁为经甲醇抽提样品的干重(g)。

2 结果与分析

2.1 PtrWRKY25 的分离及序列分析

以毛果杨叶片的cDNA为模板进行RT-PCR扩增获得大小为754bp的特异性片段。将该序列与其他物种已知功能的氨基酸序列进行比对(图2), 结果发现, 毛果杨

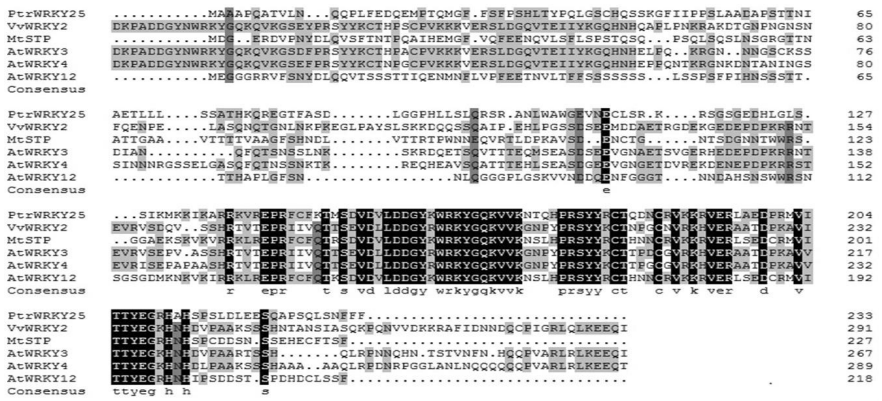


图2 杨树PtrWRKY25与不同物种木质素相关WRKY转录因子氨基酸序列对比

Fig 2 Amino acid sequence alignment of PtrWRKY25 with lignin-related

WRKY transcription factors in different species

PtrWRKY25与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的AtWRKY12, 葡萄(*Vitis vinifera*)的VvWRKY2以及苜蓿(*Medicago truncatula*)的MtSTP氨基酸序列同源性最近, 在以上的模式植物中, 拟南芥的AtWRKY12, 葡萄的VvWRKY2以及苜蓿的MtSTP均参与木质素的调控^[22-23]。据此我们推测PtrWRKY25在木质素合成途径中可能也具有重要功能。

2.2 PtrWRKY25 转录因子系统进化分析

将毛果杨PtrWRKY25的蛋白质序列与其他物种WRKY蛋白进行同源性比对, 利用MEGA4.0采用邻近法(NJ)构建进化树(图3)。结果表明, 在进化上, WRKY蛋白质主要分为四簇。之前有报道发现在拟南芥wrky12突变体中木质素会发生异位沉积, 且向髓部延伸; 在苜蓿mt-stp突变体中有类似的表型; 另有研究发现将葡萄中的VvWRKY2转入烟草中, 烟草的叶片发生不同程度地卷曲, 这些研究都证实AtWRKY12、MtSTP及VvWRKY2与木质素合成途径相关。PtrWRKY25在亲缘关系上与拟南芥AtWRKY12, 苜蓿MtSTP及葡萄VvWRKY2最接近, 由此推测PtrWRKY25与AtWRKY12, MtSTP及VvWRKY2在功能上有相似之处。

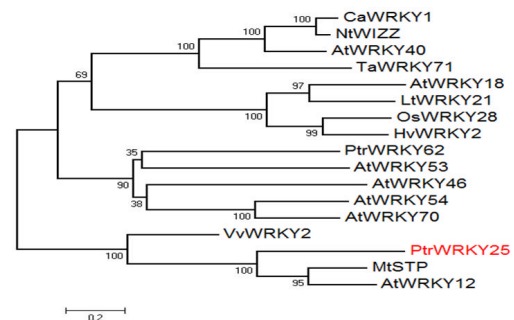


图3 与杨树木质素合成相关的WRKY转录因子的进化树

Fig 3 The phylogenetic tree of *Populus* lignin-related

WRKY transcription factors

2.3 PtrWRKY25 组织表达特异性分析

为了研究杨树PtrWRKY25的组织表达特异性, 分别

提取野生型毛白杨 8 个不同组织的总 RNA: 芽、幼叶、老叶、根、叶柄、茎、韧皮部以及木质部, 然后将提取的 RNA 经反转录试剂盒反转成 cDNA 保存用于半定量和荧光定量 PCR。通过半定量及实时荧光定量 PCR 检测 *PtrWRKY25* 在不同组织中的表达情况。结果如图 4 所示, 定量和半定量的结果显示 *PtrWRKY25* 在所有组织中均有表达, 其中在茎中表达量最高, 木质部和韧皮部次之, 而在芽、幼叶、老叶、根和叶柄中表达量最少。

2.4 转基因植株的获得

利用花椰菜花叶病毒(cauliflower mosaic virus, CaMV) 35S rRNA 启动子驱使 *PtrWRKY25* 的表达, 即 35S:: *PtrWRKY25*, 使 *PtrWRKY25* 构建至含有标记基因 *Hyg* 的 pCX-SN 植物表达载体上, 利用农杆菌介导和叶盘法转化毛白杨, 经过 50 mg/mL *Hyg* 筛选, 获得大量再生幼苗, 待幼苗生长至高 2~3 cm 时, 将其剪下移入生根培养基中诱导生根。待根系长至发达时, 打开组培瓶盖进行 1~2 d 炼苗, 然后移入土壤中。总计获得 10 株毛白杨转基因植株, 采用 CTAB 法从叶片中提取转基因植株及野生型植株毛白杨基因组 DNA 作为模板, 利用 *Hyg* 进行 PCR 扩增, 电泳结果如图 5 所示, 当以转基因植株的基因组 DNA 和 35S:: *PtrWRKY25* 重组质粒为模板时, *Hyg* 抗性基因特异扩增, 获得与理论值 853 bp 大小一致的片段, 而野生型植株中 *Hyg* 无法扩增。

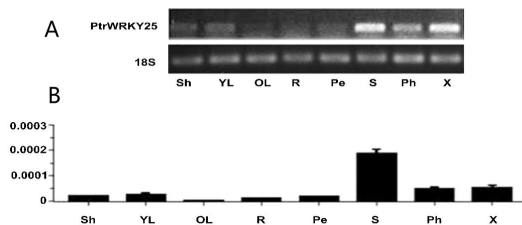


图 4 *PtrWRKY25* 在野生型杨树不同组织的特异性表达

Fig 4 Tissue specific expression of *PtrWRKY25*

Sh: 芽; YL: 幼叶; OL: 老叶; R: 根; Pe: 叶柄; S: 茎; Ph: 韧皮部; X: 木质部。Sh: Shoot; YL: Young leaves; OL: Old leaves; R: Roots; Pe: Petiole; S: Stem; Ph: Phloem; X: Xylem.

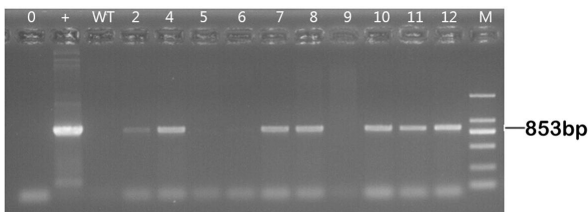


图 5 *PtrWRKY25* 转基因杨树的鉴定与识别

Fig 5 The *PtrWRKY25* transgenic plants were detected by PCR

随后通过半定量 PCR 筛选转基因毛白杨中 *PtrWRKY25* 的高表达量株系。如图 6 所示, 可以看出在所有的转基因植物中, *PtrWRKY25* 的表达量均明显高于野生型。且在 *PtrWRKY25* 的转基因植株中, 大部分植株表达量为野生型的 1~1.5 倍, 少数达到 4~5 倍(图 6)。我们从中选取了 *PtrWRKY25* 表达量最高的株系(株系 7、10 和 12) 进行后期实验。

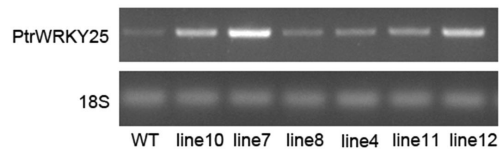


图 6 *PtrWRKY25* 转基因杨树中的相对表达量

Fig 6 The *PtrWRKY25* relative expression levels

2.5 转基因毛白杨中木质素含量测定

为了观察木质部是否有变化, 首先制作了徒手切片。挑选适龄杨树, 将其茎段第 5 节间(自顶端起) 横切制作徒手切片及石蜡切片, 选取薄而均匀的切片, 进行间苯三酚染色。徒手切片的精细程度较低, 但在一定程度上可以反映次生壁是否加厚或减少。徒手切片中发现 *PtrWRKY25* 转基因植株次生壁相较于野生型有减少的现象(图 7A)。而石蜡切片可以明显地反映次生壁减少或增厚的程度。从切片的结果可以看出野生型毛白杨茎部第五节间有 10~15 层细胞, 而 *PtrWRKY25* 转基因株系中只有 6~9 层细胞(图 7B)。

这一系列结果说明, 相比于野生型, 转基因植株 *PtrWRKY25* 中次生壁有明显减少的现象。

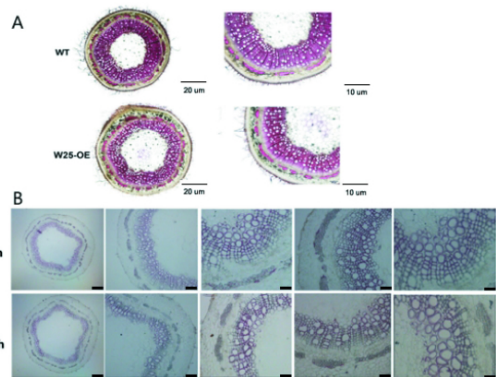


图 7 *PtrWRKY25* 转基因杨树茎部间苯三酚染色

Fig 7 The toluidine blue staining of stem in *PtrWRKY25* transgenic plants

为了明确 *PtrWRKY25* 在木质素合成途径中的功能, 对转基因植株中的木质素含量进行检测。结果显示, 与野生型相比, 所有转 35S:: *PtrWRKY25* 超表达株系(株系 7, 10 和 12) 植株中木质素的含量减少。其中株系 10 酸不溶木质素减少的最多, 接近野生型的 1 倍, 株系 7 中酸可溶木质素减少最多(表 1)。

表 1 *PtrWRKY25* 转基因杨树的次生壁组分含量测定

Table 1 The composition of WT and *PtrWRKY25* transgenic plants in the secondary cells of poplar

| | WT | WRKY25 | | |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | Line7 | Line10 | Line12 |
| Lignin | | | | |
| Klason | 25.86 ± 1.62 | 23.03 ± 0.26 | 19.65 ± 0.43 | 20.09 ± 0.62 |
| Acid-soluble | 2.89 ± 0.16 | 2.30 ± 0.02 | 2.56 ± 0.42 | 2.12 ± 0.07 |
| Total lignin | 28.78 ± 1.78 | 25.33 ± 0.28 | 22.21 ± 0.85 | 22.21 ± 0.69 |

3 讨论

导管植物中含量最丰富的成分就是我们常见的木材,

它也是日常生活中重要的生物质能源来源^[24]。而次生壁是木材重要的组成成分,不论是在农业生产和还是工业发展,以及环境保护等方面均发挥着重要作用。生物质能源,次生壁是可再生物质生物量主要原动力,被广泛应用于造纸、生物柴油转化等方面^[25]。近来,随着分子生物学和基因组学方面的研究越来越深入,次生壁形成成为了人们的关注焦点,尤其是其主要的组成成分——木质素的合成^[26]。次生壁的形成过程中,有许多调控的因子参与。大多数的研究都集中在 MYB 家族和 NAC 家族,而鲜有对 WRKY 转录因子家族的研究。

在本研究中,从杨树中识别并分离出来 *PtrWRKY25*, 通过生物信息学分析——氨基酸序列比对和构建进化树,我们推测 *PtrWRKY25* 可能与木质素合成相关。组织特异性表达的结果显示, *PtrWRKY25* 转录因子更倾向于在富含次生木质部的部位表达,例如,茎、韧皮部和木质部。

前人的研究中,拟南芥中的 *AtWRKY12*, 葡萄中 *VvWRKY2* 以及苜蓿中的 *MtSTP* 已经被研究,并且被证实参与了木质素合成的调控。在进行生物信息学分析的时候,我们发现 *PtrWRKY25* 与这些基因高度同源。因此,本课题把主要工作集中在研究 *PtrWRKY25* 转录因子在木质素代谢调控中的功能。在获得 *PtrWRKY25* 转基因植株之后,对其进行形态解剖学观察,结果显示,无论是徒手切片染色结果,还是石蜡切片染色结果,均可以观测到明显的次生壁减少的现象。为了定量说明这一实验结果,我们还测定了野生型与转基因杨树中木质素含量,转基因植株中木质素含量减少。这一系列结果说明 *PtrWRKY25* 确实是木质素合成的转录调节子。

与此同时, *PtrWRKY25* 在木质素调控网络中如何调节木质素减少等问题值得我们继续探究。另外,由于实验的最终目的是获得优良转基因杨树品种,我们仍需要将 *PtrWRKY25* 转基因植株移出温室,进行大田试验,测定其材质、拉力系数、抗逆性、纤维长度、材质结构等一系列指标,从而选育出适合农业生产及社会实际的杨树品种。

参考文献:

[1] 李宗正. 可再生生物资源—木质素的研究[J]. 南京林业大学学报, 2012, 36(1): 1-7.
[2] 张丽, 胡尚连, 曹颖, 等. 植物木质素生物合成转录因子及调控遗传网络分析[J]. 福建林业科技, 2013, 40(1): 1-6.
[3] Whetten R, Sederoff R. Lignin biosynthesis[J]. The Plant Cell, 1995, 7(7): 1001-1013.
[4] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis[J]. Annu Rev Plant Biol, 2003, 54(1): 519-546.
[5] Shi R, Sun Y, Li Q, et al. Towards a systems approach for lignin biosynthesis in *Populus trichocarpa*: transcript abundance and specificity of the monolignol biosynthetic genes[J]. Plant Cell Physiology, 2009, 51(1): 144-163.
[6] Sewalt V, Weiting N, Blount J, et al. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-

phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase[J]. Plant Physiology, 1997, 115(1): 41-50.
[7] 魏建华, 宋艳茹. 木质素生物合成途径及调控的研究进展[J]. 植物学报, 2001, 43(8): 771-779.
[8] 李璐滨, 刘蕾, 何聪芬, 等. 木质素生物合成关键酶基因的研究进展[J]. 分子植物育种, 2007, 5(6): 45-51.
[9] 苏琦, 尚宇航, 杜密英, 等. 植物 WRKY 转录因子研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(5): 94-98.
[10] 田云, 卢向阳, 彭丽莎, 等. 植物 WRKY 转录因子结构特点及其生物学功能[J]. 遗传, 2006, 28(12): 1607-1612.
[11] 高国庆, 储成才, 刘小强, 等. 植物 WRKY 转录因子家族研究进展[J]. 植物学通报, 2005, 22(1): 11-18.
[12] 余迪求, 陈利钢, 张利平. 转录调控因子 WRKY 超级家族: 起源、结构和功能[J]. 云南植物研究, 2006, 28(1): 69-77.
[13] 张勇, 张守攻, 齐力旺, 等. 杨树——林木基因组学研究的模式物种[J]. 植物学通报, 2006, 23(3): 286-293.
[14] Tuskan G, Difazio S, Jansson S, et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) [J]. Science, 2006, 313(5793): 1596-1604.
[15] Farivre-Rampant P, Bodergat R, Berville A. A molecular method to classify poplar (*Populus*) clones into sections *Tacamahaca*, *Aigeiros*, *Leuce* and *Leucoides* using ribosomal DNA variable restriction fragments [J]. C R Acad Sci Paris, 1992, 315(4): 133-138.
[16] 何红升. 杨树全基因组 WRKY 基因的鉴定及表达分析[D]. 安徽: 安徽农业大学, 2012: 26-60.
[17] Chen S, Songkumam P, Liu J, et al. A versatile zero background T-vector system for gene cloning and functional genomics [J]. Breakthrough Technologies, 2009, 15(150): 1111-1121.
[18] 赵海燕, 卢善发, 晁瑞堂. 杨树的组织培养及其基因工程研究[J]. 植物学通报, 2001, 18(2): 169-176.
[19] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599.
[20] Jung H, Varel V, Weimer P, et al. Accuracy of Klason lignin and acid detergent lignin methods as assessed by bomb calorimetry [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(5): 2005-2008.
[21] 薛英喜. 杨树木质素合成基因功能分析及其对生物质能源转化的影响[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012: 21-23.
[22] Wang H, Avei U, Nakashima J, et al. Mutation of WRKY transcription factors initiates pith secondary wall formation and increases stem biomass in dicotyledonous plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(51): 22338-22343.
[23] Guillaumie S, Mzid R, Mechin V, et al. The grapevine transcription factor WRKY2 influences the lignin pathway and xylem development in tobacco [J]. Plant Mol Biol, 2010, 72: 215-234.
[24] 章霄云, 郭安平, 贺立卡, 等. 木质素生物合成及其基因调控的研究进展[J]. 分子植物育种, 2006, 4(3): 431-437.
[25] Zhong R, Ye Z. Regulation of cell wall biosynthesis [J]. Plant Biology, 2007, 10: 564-572.
[26] Song Y, Gao J. Genome-wide analysis of WRKY gene family in *Arabidopsis lyrata* and comparison with *Arabidopsis thaliana* and *Populus trichocarpa* [J]. Chinese Science Bulletin, 2014, 59(8): 754-765.