

# 三明野生蕉 *Whirly* 转录因子的克隆及其在低温胁迫下的定量表达分析

杨 洋, 赖恭梯, 赖钟雄\*

福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建福州 350002

**摘 要** 以三明野生蕉叶片为材料, 通过克隆获得 *Whirly* 基因的 ORF, 并研究 *Whirly* 基因在不同温度处理下的转录水平。结果表明: 采用 PT-PCR 结合 RACE 技术, 克隆得到三明野生蕉 *Whirly* 基因, 其在 GenBank 的登录号为 KC127691。 *Whirly* 的开放阅读框为 738 bp, 编码 245 个氨基酸。生物信息学分析显示, *Whirly* 蛋白属于亲水蛋白, 不具有信号肽, 二级结构由  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠和无规则卷曲组成, 保守结构域预测显示该基因属于植物 *Whirly* 转录因子基因家族。实时荧光定量 PCR 分析显示, *Whirly* 转录因子在不同低温胁迫下表达水平有较大差异, 随着温度的降低, 相对表达量呈“M”型变化模式, 在 20 °C 和 4 °C 时达到较高的转录水平, 结合前人研究结果可知, 三明野生蕉 *Whirly* 转录因子可能参与了包括抗寒等多个抗逆途径的调控。

**关键词** 三明野生蕉; *Whirly*; 基因克隆; 生物信息学; 荧光定量 PCR

中图分类号 Q943.2

文献标识码 A

## Cloning and Expression Under Low Temperature Conditions of *Whirly* Transcription Factor in a Wild Banana Accession (*Musa* spp.) from Sanming City

YANG Yang, LAI Gongti, LAI Zhongxiong\*

Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

**Abstract** In the paper, the open reading frame(ORF)of *Whirly* gene was cloned from a Sanming wild banana accession(*Musa* spp.). The expression level of *Whirly* was studied under different temperature conditions. *Whirly* of Sanming wild banana was cloned by RT-PCR and the accession number was KC127691 in GenBank. *Whirly* contains a 755-nucleotides-long open reading frame (ORF), encoding a polypeptide of 245 amino acids. Bioinformatics analysis showed that the protein was hydrophilic and without signal peptide. *Whirly* belongs to plant whirly transcription factors. The secondary structure was made of the alpha helix, beta sheet and coil. Real-time quantitative PCR results indicated that the expression level of *Whirly* transcription factor is quite different under different low temperature stress. With the temperature decreasing, the relative quantitative expression patten presented as “M”-type. The expression of *Whirly* peaked at the treatment of 20 °C, and maintained a high levels at 4 °C. Combining with previous studies, we predicted that whirly transcription factors may play an important role in many kinds of resistance response including cold-resistance.

**Key words** Sanming wild banana; *Whirly*; Gene cloning; Bioinformatics; QPCR

doi 10.3969/j.issn.1000-2561.2014.08.015

芭蕉科 (Musaceac) 芭蕉属 (*Musa*) 的香蕉 (*Musa* spp.) 是多年生大型草本单子叶植物, 其产量仅次于柑桔类水果, 在世界水果生产中占有十分重要的地位<sup>[1]</sup>。中国香蕉在华南地区种植广泛, 其生长对温度要求较高, 寒害严重影响香蕉的生长, 使其产量大大降低<sup>[2]</sup>。福建省野生香蕉种质资

源几乎覆盖所有地市, 对三明、福州<sup>[3-5]</sup>等地的野生蕉研究已有详细报道。其中三明野生蕉耐寒性比较强, 能够耐-5 °C 以下的低温<sup>[6]</sup>, 可从中分离抗性目的基因资源, 从而用于香蕉的抗性基因工程育种<sup>[7]</sup>。

*Whirly* (WHY) 属于转录因子, Desveaux 等<sup>[8]</sup>从

收稿日期 2014-01-23

修回日期 2014-04-01

基金项目 国家香蕉产业技术体系专项资金 (No. CARS-32-11); 福建省农业科技平台 (No.2008 N2001)。

作者简介 杨 洋 (1989—), 女, 硕士; 研究方向: 果树生物技术。\* 通讯作者 (Corresponding author): 赖钟雄 (LAI Zhongxiong), E-mail: Laizx01@163.com。

土豆中分离出来的核转录因子 PBF-2 (PR-10a binding factor2), 是第一个 *Whirly* 家族成员。随后 Krause 等<sup>[9]</sup>、Marechal 等<sup>[10]</sup>又在拟南芥、土豆中发现其他成员, 但目前尚未有香蕉 *Whirly* 克隆的相关报道。有研究发现, *Whirly* 能与 DNA 以单链形式结合并调控抗性基因的表达, *Whirly* 蛋白可与 ERE 元件<sup>[8,11]</sup>、端粒重复序列结合<sup>[12]</sup>, Xiong 等<sup>[13]</sup>亦发现 *Whirly* 蛋白可与拟南芥 *AtKP1* 的上游元件结合。Despres 等<sup>[14]</sup>发现 *StWhy1* 能特异地与 ERE 元件结合并诱导 *PR-10a* 基因的表达, 而 *PR* (pathogenesis-related protein) 基因是可以被病原入侵激活表达的基因<sup>[15-16]</sup>, *Whirly* 的抗病响应亦可水杨酸-依赖的抗病反应<sup>[11]</sup>, RNA 干扰技术可使水稻 *OsWhirly* 基因沉默并导致超敏反应 (Hypersensitiveresponse, HR) 增强<sup>[17]</sup>。*Whirly* 转录因子参与多个抗逆途径, 在抗病、抗衰老等多种生物抗性反应中发挥着重要的作用。有研究发现 *Whirly* 蛋白不仅在防御进程中发挥作用, 在叶绿体和细胞核中也能起到一定的作用<sup>[18]</sup>。所以, 研究 *Whirly* 转录因子具有重要的意义。三明野生蕉抗性较强, 从三明野生蕉中分离 *Whirly* 基因对香蕉的抗性育种意义重大。本研究是在香蕉基因组的基础上, 进一步克隆获得三明野生香蕉 (*Musa spp.*) *Whirly* 基因, 采用生物信息学和荧光定量 PCR 方法对其进行初步的功能分析, 深入研究 *Whirly* 转录因子在香蕉对低温胁迫的应答机制中的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

三明野生蕉试管苗由本研究所提供, 常温下培养三明野生蕉试管苗, 将从中所提取的 RNA 经相应的反转录后用于 *Whirly* 基因克隆; 试管苗分别经 28、20、13、4、0 °C 处理 36 h 后, 提取总 RNA 进行 cDNA 合成, 用于荧光定量 PCR (qPCR) 分析, 其中 28 °C 处理为对照。

### 1.2 方 法

1.2.1 三明野生蕉试管苗总 RNA 提取和 cDNA 合成 三明野生蕉叶片总 RNA 的提取按照北京天恩泽基因有限公司的柱式植物 RNA out 2.0 (Column Plant RNAout 2.0) 试剂盒说明书进行。采用琼脂糖凝胶电泳和核酸定量仪对所提取的总 RNA 进行质量和浓度检测。以提取的 RNA 为模板, 使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fementas) 试剂盒, 按照操作说明进

行 cDNA 合成。

1.2.2 三明野生蕉 *Whirly* 基因 ORF 的克隆 参照小果野生蕉基因组 (<http://banana-genome.cirad.fr/>) 已知 *Whirly* 序列, 以三明野生香蕉叶片第一链 cDNA 为模板, 利用 DNAMAN 6.0 软件设计的上下游引物分别为 *Whirly*-F1 (CCTGCAACGATGAGAAG AACCT) 和 *Whirly*-R1 (GCTCTGATTTACCTTCCCCA CT), 用于克隆三明野生蕉 *Whirly* 基因的开放阅读框 (ORF)。PCR 反应结束后, 将获得的 PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 割取目的片段进行回收, 连接于 pMD 18-T 载体上, 最后委托铂尚生物技术有限公司进行测序。

### 1.2.3 三明野生蕉 *Whirly* 基因生物信息学分析

采用 NCBI 在线 BLAST 比对基因 cDNA 序列及其推导的蛋白序列同源性。应用在线蛋白分析软件 ExPASy ProtParam、ProtScale、ScanProsite、SWISS-MODEL、InterProScan、NCBI-ProteinTools 的 CDD 及在线 PSIPRED 对所获基因推导的氨基酸序列进行分析, 并利用 MEGA5.0 软件构建系统进化树。

### 1.2.4 低温胁迫下三明野生蕉 *Whirly* 定量表达分析

三明野生蕉在低温胁迫下的定量表达分析按照 TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time, TaKaRa) 试剂盒的步骤, 先进行反转录合成定量所需的 cDNA。分别以 28、20、13、4、0 °C 处理过的三明野生蕉试管苗 cDNA 为模板, 采用荧光定量 PCR 技术对其进行定量表达分析。用于 *Whirly* 定量表达分析的上下游引物分别为 *Whirly*-F2 (5'-GCTTCCTCTCATGCAGCTCT-3') 和 *Whirly*-R2 (5'-TGGTGACTGACAAGGCAG-3')。PCR 反应体系按照操作说明进行。每个反应设置 3 个重复。采用相对定量法<sup>[19]</sup>, 以 18S rRNA 为内参基因, 扩增引物为 18S rRNA-F (CCTGAGAAACGGCTACCACAT) 和 18S rRNA-R (CACCAGACTTGCCCTCCA), 对目的基因的转录水平进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 三明野生蕉 *Whirly* 基因 ORF 的克隆

以三明野生香蕉 cDNA 为模板, 经 PCR 扩增获得 700 bp 左右的亮带, 与设计的目的片段大小一致。经胶回收、纯化, 以 pMD 18-T 为载体对回收片段进行 TA 克隆。取阳性克隆测序, 测序获得 755 bp 片段, 包含上下游引物序列。经序列比对分析可知, 该片段与香蕉基因组 *Whirly* 及已登录 GenBank 的其他植物 *Whirly* 基因同源性较高, 可

认为是野生香蕉 *Whirly* 基因。克隆获得三明野生蕉 *Whirly* 基因 ORF 为 738 bp，编码 245 个氨基酸 (图 1)，其在 GenBank 中的登录号为 KC127691。

### 2.2 三明野生蕉 *Whirly* 蛋白质基本理化性质及保守结构域分析

在线软件分析结果如下，*Whirly* 蛋白分子量为 27 012.7 u，理论等电点为 9.68，属于碱性蛋白，预测结果还显示该蛋白是一个不稳定蛋白，不稳定系数为 58.85，脂肪系数为 74.37，总平均疏水指数 (GRAVY) 为 -0.347，表明它是一个亲水蛋白，经 ProtScale 预测的结果与上述结果一致。利用 NCBI-Protein Tools 的 CDD 在线软件分析三明野生蕉

*Whirly* 的保守结构域 (图 2)，由预测结果可知 *Whirly* 基因属于植物 *Whirly* 转录因子。

### 2.3 三明野生蕉 *Whirly* 蛋白质信号肽和亚细胞定位预测分析

用 SignalP4.1 Server 对三明野生蕉 *Whirly* 进行信号肽的预测和分析，结果表明，其 C、Y、S 值均小于 0.5，由此预测三明野生蕉不具有信号肽，不属于分泌蛋白。亚细胞定位预测结果表明，三明野生蕉 *Whirly* 蛋白位于线粒体基质的可能性最大，还有部分位于线粒体内膜、线粒体膜间隙及线粒体外膜。这与 SignalP 4.0 程序对其进行信号肽的预测结果一致。因此可以推测该蛋白是在细胞膜或细

```

1 CGTGCAACG[ATG]AGAAGAACCTCCCGCTTCCTCTCATGCAGCTCTATACTGGAGAGAGCC
      M R R T S R F L S C S S I L E R A
61 ACTAATGTAAAGGATTTCTTGGTTGAGTAGTCAACGTAATTTCAACTTCTGGACCA
      T N V K D S F W L S S Q R S I S T S G P
121 GGTCTTGTGAATGATGGAAGCTCCTCAGTTAGACCACCAATTTTCCTACAGGAAGCTCC
      G L V N D G S S S V R P P F S P T G S S
181 TCAGTTAGACGGTATGTGGAATACACTGTTTTTAAGGGAAAAGCTGCCTTGTCAGTGTCA
      S V R R Y V E Y T V F K G K A A L S V S
241 CCAATTCCTCCAACCTTTCCGTGAAGTGGATTCGGGGTTTCTAGAGTTCATAAAAAGGC
      P I L P T F R E V D S G V S R V H K K G
301 TGTGTTATCTTGACATTTTGGCCTGCCATTGGTCAAAGAAAGTATGATTGGCAAAGAAG
      C V I L T F W P A I G Q R K Y D W Q K K
361 CAGGCCTTTGCTCTGTCACCTACTGAAGTTGGAAGCTTGATTGGCCTGGGACCTGTGAA
      Q A F A L S P T E V G S L I G L G P A E
421 TCTTGTGAATTTTCCATGATCCCTCAATGAAATCAAGCCTTGAAGCCAGGTGAAGAAA
      S C E F F H D P S M K S S L E G Q V K K
481 TCACTATCAATTTCCCATGGAATGATAAAGCTGGATATCTTCTAACTTATCTGTTGTA
      S L S I S P L N D K A G Y L L N L S V V
541 AATAACATCCAGAAGACAAATGAGCGGTTCTCTTCCAGTTTCAAAGGCTGAGTTTACA
      N N I Q K T N E R F S L P V S K A E F T
601 GCAATTCGTACAGTGTTTAGTTATGTATTGCCGCATATCATGGGTTGGTCCAGGCTGCA
      A I R T V F S Y V L P H I M G W S Q A A
661 AGCCCACAACCGCCAAGCACATGCAACACATACTCCAAAAGAGCAGATTGAGGAGCGGCCA
      S P Q P P S T A T H T P K E Q I E E R P
721 GATCCATCTCTCGAGTGGGGAAGG[TAA]ATCAGAGC
      D P S L E W G R * I R
    
```

[ATG]: 起始密码子; [TAA]: 终止密码子。

[ATG]: Initiation codon; [TAA]: Termination codon.

图 1 *Whirly* 基因 ORF 核苷酸序列和推测氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of *Whirly* ORF and deduced amino acid sequence

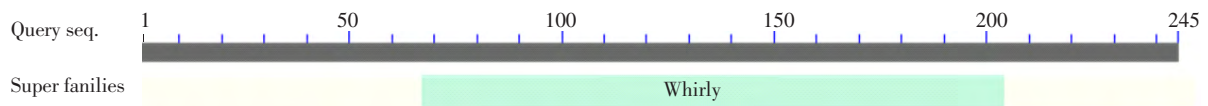


图 2 三明野生蕉 Whirly 保守结构域预测分析  
 Fig. 2 Prediction for the conserved domains of Whirly in Sanming wild banana

胞内行使其功能。

2.4 三明野生蕉 Whirly 蛋白二级结构和三维结构预测分析

对三明野生蕉 Whirly 蛋白二级结构的预测表明, Whirly 蛋白的结构由  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠和无规则卷曲组成。无规则卷曲所占比例最大,  $\alpha$  螺旋所占比例最小。用 SWISS-MODEL 在线工具对野生蕉试管苗 Whirly 氨基酸序列进行蛋白质三维结构预测, 图 3 显示了三明野生蕉 Whirly 蛋白是由  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠片、 $\beta$  转角等成分组成的三维结构。

2.5 三明野生蕉 Whirly 与其他植物 Whirly 蛋白的同源性和分子系统进化分析

将 Whirly 氨基酸序列进行 NCBI-BLAST 比对分析, 结果发现该序列与短柄草 Why2、玉米 Why2、水稻 Why2、高粱 Why2、拟南芥 Why2、苹果 Why、马铃薯 Why2、葡萄 Why2、可可 Why2 等的相似性较高, 分别为 56%、54%、53%、52%、46%、45%、45%、43%、42%。采用 MEGA5.0

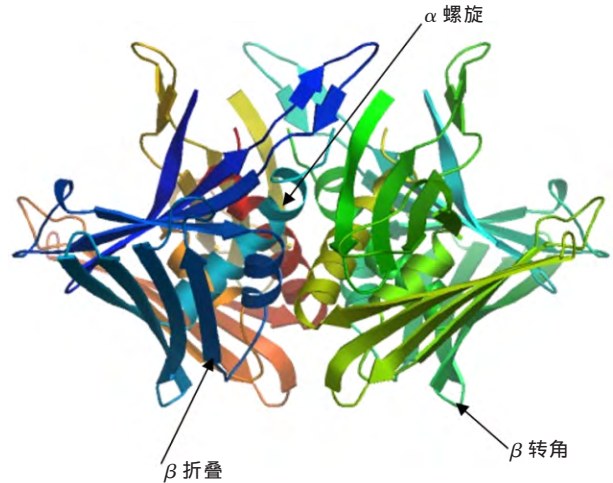


图 3 三明野生蕉 Whirly 蛋白三维结构预测  
 Fig. 3 Three-dimensional structure of Whirly from wild banana in Sanming City

软件构建三明野生蕉 Whirly 的系统进化树(图 4), 发现三明野生蕉 Whirly 与单子叶禾本科植物的高粱、玉米、水稻和短柄草 Whirly2 的亲缘关系比较

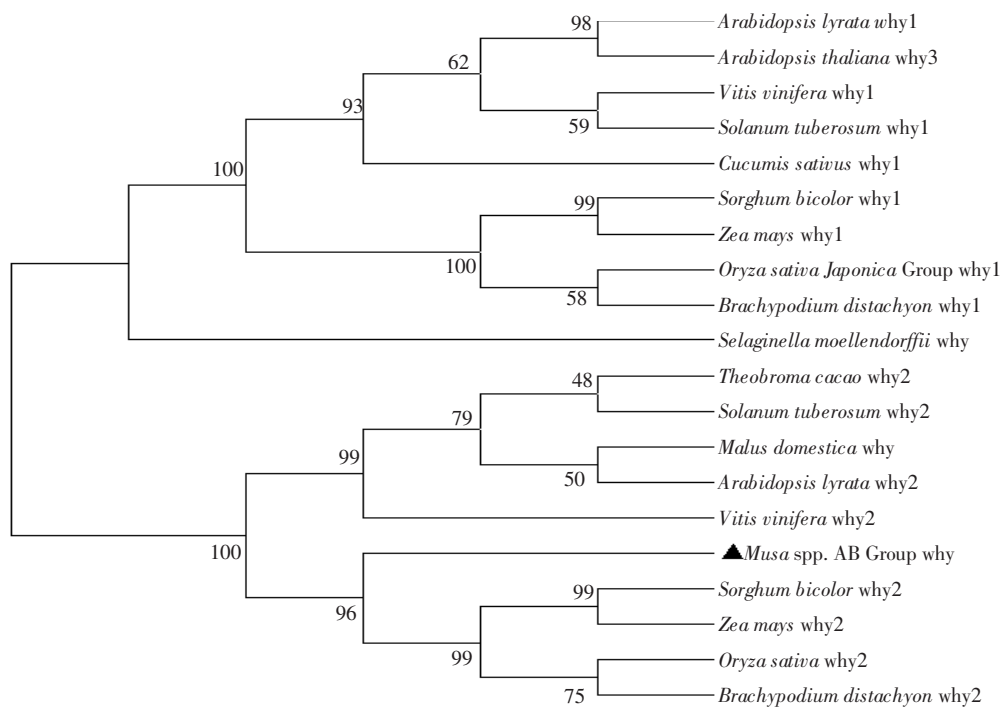


图 4 三明野生蕉 Whirly 基因编码氨基酸序列分子系统进化树  
 Fig. 4 Phylogenetic tree of protein encoded by Whirly

近, 而与双子叶十字花科的拟南芥等植物的 *Whirly1* 亲缘关系较远。

## 2.6 *Whirly* 基因在低温胁迫下的定量表达分析

待三明野生蕉 *Whirly* 和内参基因 qPCR 反应结束后进行扩增曲线和溶解曲线分析。结果表明, *Whirly* 引物和 *18SrRNA* 引物特异性好, 标准曲线符合试验要求。*Whirly* 基因在不同温度下的转录水平见图 5, 三明野生香蕉相对表达量呈“M”型变化模式, 以 28 °C 处理为对照, 当温度下降到 20 °C 处理 36 h 时, *Whirly* 基因表达量上调至对照组的 8.16 倍, 达到峰值; 当处理温度为 13 °C 时, *Whirly* 基因表达量为对照的 3.13 倍; 当处理温度为 4 °C 时, *Whirly* 基因的表达量再次上升, 维持在较高的水平, 为对照的 5.62 倍; 当温度为 0 °C 时, *Whirly* 基因的表达量下降至对照的 4.52 倍。综上可知, 当温度为 20 °C 和 4 °C 时, *Whirly* 具有 2 次转录高峰, 因此 *Whirly* 转录因子在这 2 次高峰中可能参与了不同的转录调控途径。

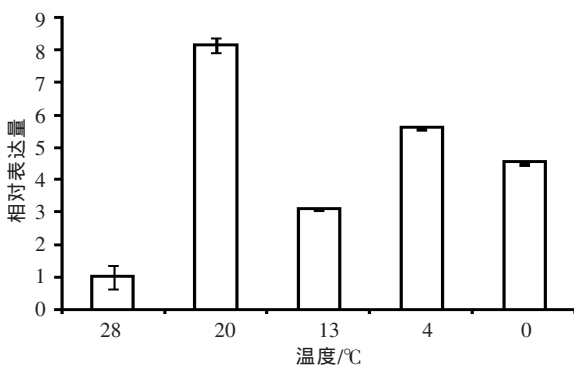


图 5 不同低温处理下三明野生蕉 *Whirly* 基因的相对表达量

Fig. 5 Expression levels of *Whirly* under different temperature treatments

## 3 讨论与结论

### 3.1 三明野生蕉 *Whirly* 蛋白结构的特异性

*Whirly* 蛋白是植物特有的高度保守的家族蛋白。本研究对三明野生蕉 *Whirly* 蛋白进行生物信息学分析发现, *Whirly* 蛋白不具有信号肽, 不属于分泌蛋白, 而有研究发现拟南芥的 3 个 *Whirly* 蛋白都有叶绿体或线粒体信号肽<sup>[20]</sup>, 因此, 三明野生蕉 *Whirly* 蛋白具有独特结构。亚细胞定位预测结果表明, 三明野生蕉 *Whirly* 蛋白位于线粒体基质的可能性最大, 还有部分位于线粒体内膜、线粒体膜间隙及线粒体外膜, 这与孔凡英等<sup>[21]</sup>预测的结果基本一致, 在质体内含量较丰富的 *Whirly* 蛋白属于碱性蛋白, 其中 Ser、Leu、Pro 所占比重较大。

二级结构中无规则卷曲所占比例最大,  $\alpha$  螺旋所占比例最小。三维结构预测显示, *Whirly* 蛋白表面有一个中心空穴并形成带电的内腔, 与已有研究相符。进化树分析发现, *Whirly* 蛋白与单子叶禾本科植物的亲缘关系比较近, 因此三明野生蕉 *Whirly* 蛋白具有与其他单子叶禾本科植物相似的生物学功能。

### 3.2 三明野生蕉 *Whirly* 可能参与多个抗逆途径

研究表明, *Whirly* 参与多个抗逆途径, 在多种生物抗性反应中发挥重要的作用。Despres 等<sup>[14]</sup>发现 *StWhy1* 具有诱导 *PR-10a* 基因表达的作用, 而 *PR* 基因是可以被病原入侵激活表达的基因<sup>[15-16]</sup>。Desveaux 等<sup>[11]</sup>发现 *AtWhy1* 在与水杨酸反应时会被激活并参与水杨酸-依赖的抗病反应, *AtWhy1* 单链结合蛋白表达受水杨酸分子影响<sup>[22-23]</sup>。目前发现的抗病相关的 *Whirly* 基因家族成员有 *ssi1*、*ssi2*、*cpr5*、*cpr6* 和 *hrl1*<sup>[24-27]</sup>。由此可见, *Whirly* 参与了植物抗病响应途径。Krause<sup>[9]</sup>等发现在大麦嫩叶中, *Whirly1* 蛋白定位在质体, 但在衰老叶片中则定位在核内, 而 Wingler<sup>[28]</sup> 研究发现, *AtWhy2* 基因的敲除突变体能够延迟衰老, 表明 *Whirly* 转录因子在衰老调控中也起重要作用。本试验通过生物信息学预测和定量表达分析, 发现 *Whirly* 在不同温度处理下出现 2 次表达高峰, 分别是 20 °C 和 4 °C, 可见 *Whirly* 基因参与了三明野生蕉的低温响应, 在抗寒相关基因的转录过程中发挥着重要的作用。结合前人的研究结果推测, *Whirly* 可能参与了包括抗寒在内的多种抗逆途径的转录调控过程, 因此研究 *Whirly* 转录因子有着广泛而深远的意义。

### 参考文献

- [1] Bakry F, Carreel F, Jenny C, et al. Genetic improvement of banana [J]. *Breeding plantation tree crops: Tropical Species*, 2009: 3-50.
- [2] 刘长全. 香蕉寒害研究进展 [J]. *果树学报*, 2006, 2(3): 448-453.
- [3] 赖钟雄, 陈源, 林玉玲, 等. 三明野生蕉基本生物学特性调查 [J]. *亚热带农业研究*, 2006, 2(4): 241-244.
- [4] 赖钟雄, 陈源, 林玉玲, 等. 福州野生蕉 (*Musa* spp., AA Group) 的发现及其分类学地位的初步确定 [J]. *亚热带农业研究*, 2007, 3(1): 1-5.
- [5] 陈源, 赖钟雄, 赵巧阳, 等. 福州、三明野生蕉种群遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *福建农林大学学报 (自然科学版)*, 2008, 37(4): 379-384.
- [6] 吕柳新, 陈景录, 陈晓静, 等. 福建若干品种类型香蕉的细胞学观察 [J]. *园艺学报*, 1986, 13(3): 169-174.
- [7] 赖钟雄, 陈源, 林玉玲, 等. 三明野生蕉基本生物学特性调查 [J]. *亚热带农业研究*, 2006, 2(4): 241-244.

- [8] Desveaux D, Despres C, Joyeux A, *et al.* PBF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in PR-10 a gene activation in potato[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(8): 1477-1489.
- [9] Krause K, Kilbiński I, Mulisch M, *et al.* DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(17): 3707-3712.
- [10] Marechal A, Parent J, Sabar M, *et al.* Overexpression of mtDNA-associated At-Why2 compromises mitochondrial function[J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 42.
- [11] Desveaux D, Subramaniam R, Despres C, *et al.* A "Whirly" transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in *Arabidopsis* [J]. *Dev Cell*, 2004, 6(2): 229-240.
- [12] Yoo H H, Kwon C, Lee M M, *et al.* Single-stranded DNA binding factor AtWHY1 modulates telomere length homeostasis in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2007, 49(3): 442-451.
- [13] Xiong J Y, Lai C X, Qu Z, *et al.* Recruitment of AtWHY1 and AtWHY3 by a distal element upstream of the kinesin gene *AtKPI* to mediate transcriptional repression[J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 71(4-5): 437-449.
- [14] Despres C, Subramaniam R, Matton D, *et al.* The activation of the potato *PR-10a* gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(5): 589-598.
- [15] Ryals J A, Neuenschwander U H, Willits M G, *et al.* Systemic acquired resistance[J]. *Plant Cell*, 1996, 8(10): 1809-1819.
- [16] Dangl J L, Jones J D G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection[J]. *Nature*, 2001, 411: 826-832.
- [17] 姚沁涛, 张文蔚, 刘莉, 等. Whirly转录因子对非寄主菌诱导水稻HR反应的负调控作用[J]. *中国农业科技导报*, 10(5): 53-58.
- [18] Desveaux D, Maréchal A, Brisson N. Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond[J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(2): 95-102.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] Krause K, Kilbiński I, Mulisch M, *et al.* DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(17): 3707-3712.
- [21] 孔凡英, 邓永胜, 周斌, 等. Whirly转录因子研究进展[J]. *植物生理学报*, 2012, 48(7): 643-653.
- [22] Cao H, Bowling S A, Gordon A S, *et al.* Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance[J]. *Plant Cell*, 1994, 6(1), 1583-1592.
- [23] Delaney T P, Friedrich L, Ryals J A. *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(14), 6602-6606.
- [24] Shah J, Kachroo P, Klessig D F. The *Arabidopsis ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders Defensin gene expression salicylic acid dependent[J]. *Plant Cell*, 1999, 11(2), 191-206.
- [25] Shah J, Kachroo P, Nandi A, *et al.* A recessive mutation in the *Arabidopsis SS12* gene confers SA- and *NPR1*-independent expression of *PR* genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens[J]. *Plant*, 2001, 25(5), 563-574.
- [26] Clarke J D, Volko S M, Ledford H, *et al.* Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in *cpr*-induced resistance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(11), 2175-2190.
- [27] Devadas S K, Enyedi A, Raina R. The *Arabidopsis hrl1* mutation reveals novel overlapping roles of salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signaling in cell death and defense against pathogens[J]. *Plant J*, 2002, 30(4), 467-480.
- [28] Wingler A. Transcriptional or post-transcriptional regulation - how does a plant know when to senesce? [J]. *New Phytol*, 2007, 175(1): 7-9.

责任编辑: 林海妹