

牡丹*PsWRKY*基因的克隆和表达特性分析

石红梅, 战新梅, 管世铭, 盖树鹏, 刘春英, 张玉喜*

青岛农业大学生命科学学院, 山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东青岛266109

摘要: 以课题组前期454高通量测序筛选到的类*WRKY*基因的部分cDNA序列为基础, 通过RACE扩增、测序和序列拼接获得了牡丹1 091 bp *PsWRKY*基因全长cDNA, 包括5' UTR区57 bp, 3' UTR区92 bp, 编码框942 bp, 推测编码313个氨基酸序列。生物信息学分析结果表明*PsWRKY*基因推测氨基酸序列中不具有信号肽序列, 暗示其不是分泌性蛋白; 在氨基酸序列中存在核定位信号, 与亚细胞定位预测结果相一致, 这与其作为转录因子行使功能相关。与其他已知植物的*WRKY*蛋白的同源性分析结果表明牡丹*PsWRKY*与葡萄*VvWRKY*的同源性最高, 为54%。实时定量PCR分析*PsWRKY*基因的表达特性结果显示*PsWRKY*基因在初花期牡丹的叶片和心皮中转录水平较高。在人工低温处理的牡丹花芽的休眠解除过程中, *PsWRKY*基因受低温诱导, 且转录水平在整个休眠进程中呈上调表达趋势。研究结果为进一步解析牡丹花芽的休眠解除的分子机制提供理论依据。

关键词: *PsWRKY*; RACE; 生物信息学分析; 表达特性

Cloning and Expression Pattern Analysis of *PsWRKY* in Tree Peony (*Paeonia suffruticosa*)

SHI Hong-Mei, ZHAN Xin-Mei, GUAN Shi-Ming, GAI Shu-Peng, LIU Chun-Ying, ZHANG Yu-Xi*

Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong Province, College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: In this study, based on the partial cDNA sequence in tree peony obtained by 454 high-throughput sequencing, 1 091 bp *PsWRKY* full-length cDNA sequence was obtained using RACE amplification, including 57 bp 5' UTR, 92 bp 3' UTR. The coding frame of 942 bp encoded 313 amino acids. The results of bioinformatics analysis indicated that *PsWRKY* has no signal peptide, which suggested that it was not a secreted protein. NLS was found existing in the *PsWRKY* protein sequence, which was consistent with that of the prediction of sub-cellular localization. The result of homology analysis indicated that the similarity between the *PsWRKY* and *VvWRKY* was highest with that of 54%. The expression patterns were analyzed by using real-time quantitative PCR, and the results showed that the transcript level of *PsWRKY* at the early stage of flowering in leaf and carpel were the highest. During the whole process of dormancy release after chilling treatments, *PsWRKY* was induced by low temperature, and its transcript was up-regulated. All results would provide theoretical basis for further analysis the molecular mechanism of dormancy release in tree peony.

Key words: *PsWRKY*; RACE; bioinformatics analysis; expression pattern

*WRKY*转录因子是近年来在植物中发现的新的转录调控因子, 因其N端都至少含有1个*WRKY*结构域而得名(Eulgem等2000)。*WRKY*基因参与植物生长发育、衰老和多种代谢途径, 并且在调控生物和非生物胁迫过程中起着重要作用(Lagacé和Matton 2004)。目前已经从棉花(Xu等2004)、拟南芥(Dong等2003)、油菜(Yang等2009)、橡胶树(Wang等2013)、杨树(He等2012)和葡萄(Guo等2014)等多种植物中克隆得到*WRKY*基因。到目前国内外尚没有关于牡丹*WRKY*转录因子的研究报道。

牡丹, 芍药科、芍药属的落叶小灌木, 因其丰富的花型、花色被誉为“花中之王”。本课题组Gai等(2012, 2013)通过454测序得到了15 284个uni-gene, 通过芯片分析筛选到差异表达的转录因子176个, 其中包括*WRKY*转录因子。宋燕春(2013)利用差减文库研究梨花芽休眠解除相关基因, 也筛选到了*WRKY*转录因子。本研究在此基础上,

收稿 2015-06-12 修定 2015-09-10

资助 国家自然科学基金面上项目(31471908和31372104)。

* 通讯作者(E-mail: zhang-yuxi@163.com; Tel: 13793284502)。

利用RACE扩增得到*WRKY*完整cDNA序列, 并进行了生物信息学分析, 利用实时定量分析了其在初花期不同组织和花芽内休眠进程中的表达模式。研究结果为进一步解析牡丹花芽内休眠解除的分子机制提供基因资源, 为利用基因工程手段培育早、晚花新品种奠定基础。

材料与方法

1 总RNA提取与cDNA合成

以生长健壮的4~5年生牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)品种‘鲁荷红’(‘Lu He Hong’, 由青岛农业大学植物生理研究室提供)为材料, 取初花期的牡丹各组织(根、茎、叶、花瓣、萼片、心皮和雄蕊), 液氮速冻, -80 °C冰箱保存备用。在2013年11月份, 待日最低温度达到10 °C时, 采用4 °C冷库处理牡丹花芽, 每隔7天移到温室(25 °C, 16 h/8 h)后取花芽, 立刻投入液氮速冻, -80 °C保存备用。共5个低温处理时间, 分别是0、7、14、21和28 d。采用原平皓(天津)生物技术有限公司的EASYspin植物RNA快速提取试剂盒提取总RNA, -80 °C保存。

RACE-ready cDNA第一链合成按照SMART RACE cDNA Amplification Kit试剂盒(Clontech)步骤进行。实时定量cDNA第一链的合成按照Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H)试剂盒(TaKaRa, 大连)说明书进行。反转录cDNA产物用EASY dilution (TaKaRa, 大连)10倍稀释作为实时定量PCR分析的模板, 分别设定3个生物学重复。

2 RACE扩增、实时定量PCR

根据454测序筛选得到的*WRKY*基因的部分EST序列设计基因特异性引物(*PsWRKY5'*和*PsWRKY3'*), 分别进行5' 和3' RACE扩增(表1)。

RACE扩增反应根据SMART RACE cDNA Amplification Kit试剂盒(Clontech)步骤进行。

qPCR反应体系根据SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa, 大连)试剂盒配制, 反应在实时荧光定量PCR仪(Agilent, Mx3000P)上运行。20 μL PCR反应体系为 2×SYBR Premix Dimer Eraser™ 10 μL, 上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各0.75 μL, 2 μL cDNA模板, 无菌水配齐, 每个样品3次技术重复。反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共45个循环。设置在延伸收集荧光信号。*Actin*为内参, 数据分析采用2^{-ΔΔC_t}法(Livak和Schmittgen 2001)。

3 生物信息学分析

测序结果用DNAMAN6.0软件进行序列分析和拼接。利用NCBI在线软件(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)进行Blast分析。用ProtParam程序(<http://expasy.org/cgi-bin/protparam>)进行蛋白质分子量和等电点等性质的预测。用TMPRED (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)进行蛋白质跨膜结构域的预测。用SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行蛋白质信号肽的分析。利用WOLFPsort在线软件(http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html)进行亚细胞定位预测。用Clustal W软件进行多序列比对。核定位信号(NLS)预测利用NLS Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)进行。利用MEGA 5.2软件中的邻接法(neighbor-joining)方法构建系统发生树, 通过自举分析(bootstrap)作置信度检验, 1 000次重复检验。

表1 引物、序列及退火温度

Table 1 Primers, sequences and their annealing temperatures

引物	序列(5'→3')	退火温度/°C	扩增目的
<i>PsWRKY5'</i>	CGATGGTCACGCATGGAGAAAATATGG	65	5' RACE扩增
<i>PsWRKY3'</i>	CCAATTTTCTCCATGCGTGACCATCG	65	3' RACE扩增
<i>PsWRKYF</i>	GCTTCAAACCCTCTCACCAAAC	55	<i>PsWRKY</i> 实时定量
<i>PsWRKYR</i>	CAGAAGCGTCGGTGGAGTTGAGT	55	<i>PsWRKY</i> 实时定量
<i>ActinF</i>	GAGAGATTCCGTTGCCCTGA	55	内参
<i>ActinR</i>	CTCAGGAGGAGCAACCACC	55	内参

实验结果

1 *PsWRKY*基因的全长cDNA及推测编码的氨基酸

根据454测序筛选得到的部分WRKY片段, 经RACE扩增, 5' RACE PCR产物为452 bp, 3' RACE PCR产物为666 bp (图1)。测序后经序列拼接, 得到1 091 bp *WRKY*基因全长cDNA, 包括5'非编码区(untranslated region, UTR) 57 bp, 3' UTR 92 bp, polyA 25 bp, 完整的开放阅读框(open reading frame, ORF) 942 bp, 利用DNAMAN软件推测编码313个氨基酸(图2)。利用NCBI在线Blast结果发现其氨基酸序列中123~182个氨基酸(E-value为1.15e-30)序列为WRKY保守结构域。根据Gray等(2009)对转录因子的命名方法, 该序列被命名为*PsWRKY* (Genbank accession number: KR559041)。

2 *PsWRKY*基因生物信息学分析

*PsWRKY*基因的完整编码区推测编码313个氨基酸。*PsWRKY*蛋白分子式为 $C_{1532}H_{2353}N_{433}O_{512}S_{13}$, 其分子量为35 439.7 Da, 理论等电点pI为6.24; 不

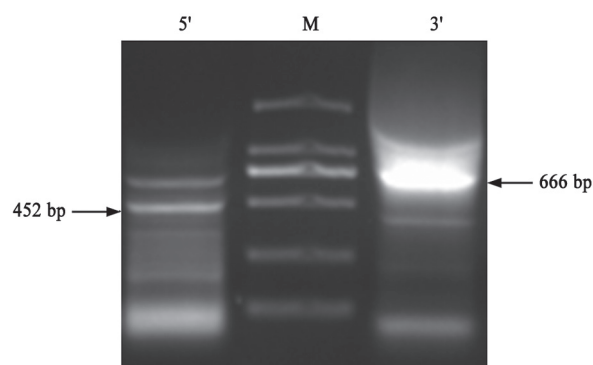


图1 *PsWRKY* 5'-RACE和3'-RACE扩增的电泳图

Fig.1 Electrophoresis result of *PsWRKY* RACE PCR
M: DL 2000 Maker; 5': 5' RACE扩增产物; 3': 3' RACE扩增产物。

稳定指数为58.32 (40以下为稳定蛋白), 推测该蛋白为不稳定蛋白; 丝氨酸的含量最高为15.34%, 其次是苏氨酸占7.99%, 天冬氨酸占7%, 亮氨酸占6.7%; 总平均疏水指数为-0.854, 表明其为亲水性蛋白。信号肽预测结果表明其不具有信号肽序列, 表明其不是分泌性蛋白。在推测蛋白的第101~114

```

1 ACATGGGGATAGTAAGCCACAACCACACACCAACCAACAAACAAAACCAACATCAATGAAAGCCCTTGGCCG
1 M E S P W P
76 GAAAACCTGTCCAGCTATCGGAGAACGGCGATCCAAGAGCTTGCTCAAGGCCGTGACTTCACAAACCAGCTTCAA
7 E N L S S Y R R T A I Q E L A Q G R D F T N Q L Q
151 ACCCTCCTCACAAACCCATGATACCAATGATCTGGAATCCGCTGAGGATCTTCTCATGAAAAATCTTGAGATCA
32 T L L T K P M I P N D L E S A E D L L M K I L R S
226 TTTACTGAACTATTTCCATACTCAACTCCACCGACGCTTCTGACTTCCGGCCAAGAGATCAGCTTGTGGGAC
57 F T E T I S I L N S T D A S D F P A K R S A C W D
301 TGCCAGAAGTCTGAAGATTCGGCGGGGAAAGCAGTAAGAGTTCAACCGTCAAAGATCGGAGAGGATCTTACAAG
82 C Q K S E D S G G E S S K S S T V K D R R G S Y K
376 AGAAGAAAAAATTCAGACTCATTACAAAACTAATTCTACTTTGATTGACGATGGTCACGCATGGAGAAAATAT
107 R R K N S D S F T K L T S T L I D D G H A W R K Y
NLS
451 GGGCAGAAAAAATCCTCAATACCGTACACCCAAGGAATTACTTTAGGTGTACTCACAGCCTGATCAAGGCTGC
132 G Q K T I L N T V H P R N Y F R C T H K P D Q G C
WRKY
526 CAAGCAACAAGCAAGTGCAAAAAACAGAAGGTGAACCAAGCATGTACAAGATCACATAACAAGGCGATCACACA
157 Q A T K Q V Q K T E G E P S M Y K I T Y N G H H T
601 TGCCAGAGTAAATTAAGGCTCCTCAATCATTTCAGATTCTGGGTTTCTCCCAACGACTTCTGTACTATTCT
182 C Q S K L K A P Q I I S D S G F S P N D S S V L F
676 AGCTTTCAGTCAACAGATAATCACAGGCATGAAAACCCATTCTGTTATCTTTCCGACATCGATTAAGGAAGAG
207 S F Q S T D N H R H E N P F L L S F P T S I K E E
751 AGTACTCCTAGTGATGATCATACGGCTGCCCAATAACCAATCTTCACTCTCATCGGATTATTTCCGGCCAC
232 S T P S D D H T A A H N N Q S S L S S D Y F P A H
826 AACCACAATAACCAATCTTCACTCTCATCGGATTATTTCTGTGCGATGAACTCTCGACATTTAATTCGTACAGT
257 N H N N Q S S L S S D Y I L S H E L S T F N S Y S
901 GATGTGATATCGGGGATGAACAATTATACGGCCAGTAAGACTGAAAGTTTCGACATGGAAATTATGAGCTTTGAG
282 D V I S G M N N Y T A S K T E S F D M E I M S F E
976 GATGTGTGTAATTTGAATTTTGAATTTGATATGGGTGCTATTTTATATCAACTTTTATGTAGTGGAAAAAGAATTA
307 D V C N F E F *
1051 TGTTTCTAGTTTATCAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA

```

图2 *PsWRKY*的全长cDNA序列与推测的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence and putative amino acid sequence of *PsWRKY*

起始密码子ATG和终止密码子TGA斜体加粗表示; 双下划线标示出polyA尾; 单下划线标示核定位信号NLS; 波浪线标示*PsWRKY*保守区即功能结构域。

位存在核定位信号(RRGSYKRRKNSDSF)。亚细胞定位预测结果表明其定位在细胞核,这与其作为转录因子执行功能相关。

3 *PsWRKY*蛋白序列的同源性分析与构建进化树

利用Clustal W软件将*PsWRKY*的推测的氨基酸序列与其他已知植物的WRKY蛋白进行同源比对,结果表明,*PsWRKY*与其他已知植物的WRKY

相似性在34.06%~54.0%,其中与葡萄的相似性最高,为54.0%,与拟南芥同源性最低,为34.06%。利用MEGA5.2软件构建系统进化树,结果如图3,*PsWRKY*与葡萄VvWRKY70聚为一支,然后与其他木本植物的WRKY70蛋白形成分支,最后与拟南芥AtWRKY70蛋白聚在一起,结果符合进化关系,与同源性比对结果一致。

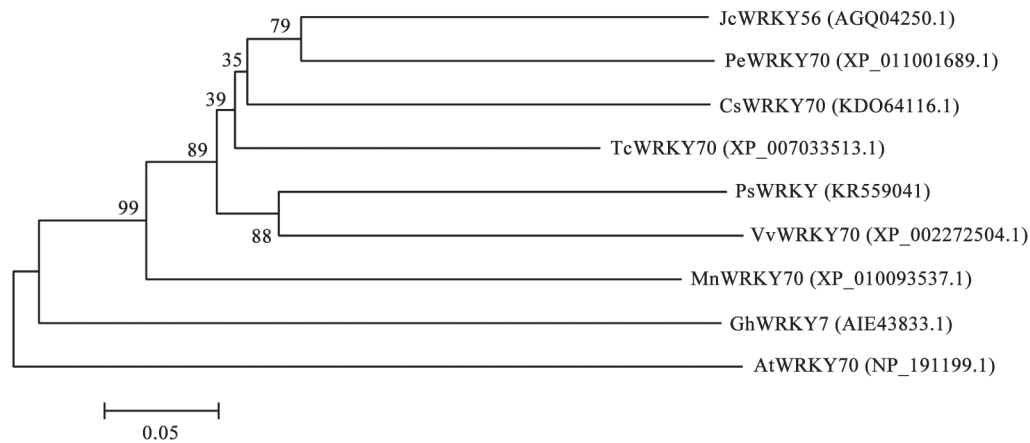


图3 *PsWRKY*与其他物种WRKY蛋白的系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic tree of *Paeonia suffruticosa* *PsWRKY* and the known proteins in other plants species

麻风树: JcWRKY56; 胡杨: PeWRKY70; 甜橙: CsWRKY70; 可可树: TcWRKY70; 牡丹: *PsWRKY*; 葡萄: VvWRKY70; 桑树: MnWRKY70; 陆地棉: GhWRKY7; 拟南芥: AtWRKY70。

4 *PsWRKY*基因的表达模式

荧光定量PCR分析*PsWRKY*基因在初花期牡丹的根、茎、叶、花瓣、萼片、雄蕊和心皮中的表达特性(图4),结果表明*PsWRKY*基因在牡丹七种不同组织中表达量不同。其中在叶中转录水平最高,其次为心皮,在根、萼片、茎和花瓣中表达量相对较低,在雄蕊中转录水平最低,其中在叶中*PsWRKY*的表达量约是雄蕊中的306倍。

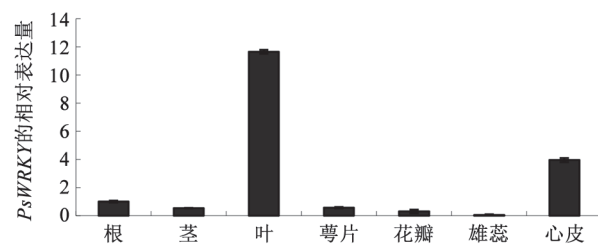


图4 *PsWRKY*在初花期牡丹的不同组织中的表达模式
Fig.4 The relative expression level of *PsWRKY* in different tissues at the early stage of flowering

利用荧光定量PCR分析*PsWRKY*基因在利用人工低温处理解除牡丹花芽内休眠过程中的表达水平(图5),结果显示*PsWRKY*基因的转录水平受低温诱导,且随着低温处理天数的增长,*PsWRKY*基因的转录本呈上调趋势。

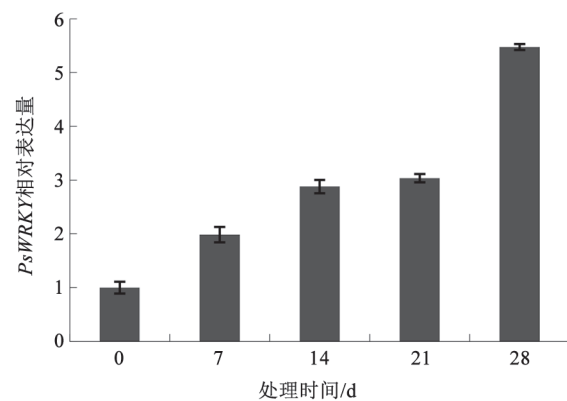


图5 *PsWRKY*在低温处理不同时间的牡丹花芽中的表达模式
Fig.5 The relative expression level of *PsWRKY* in flower buds after different chilling times

讨 论

WRKY蛋白是植物中一类的转录因子, 含有高度保守WRKY域和锌指结构蛋白。课题组前期工作利用454高通量测序筛选到*WRKY*基因的部分cDNA (Gai等2012), 本研究利用RACE扩增得到了*WRKY*基因的全长cDNA, 推测的氨基酸如其他WRKY蛋白一样, 其保守域由约60个氨基酸残基组成, 靠近保守域N末端的7个保守的氨基酸残基WRKYGQK, 为WRKY结构域的核心序列。在推测蛋白序列的第101~114位存在核定位信号(RRGSYKRRKNSDSF), 亚细胞定位预测结果其可能定位在细胞核, 这与其作为转录因子执行功能相一致。同源性比对与进化树结果相一致, 结果基本符合进化关系。

WRKY转录因子参与植物多种重要生理生化过程, 从而调控植物生长发育、胁迫应答等各种重要生理过程。Eulgem等(2000)研究发现在与种子萌发、叶片和根系生长、开花等发育相关的基因中存在WRKY结构域。Rushton等(2010)最早发现的野生燕麦中的WRKY家族成员ABF1和ABF2参与了种子的萌发; 茄科中的转录因子ScWRKY1被证明在植物胚形成过程中发挥重要作用(Lagacé和Matton 2004); Luo等(2005)发现拟南芥中WRKY转录因子参与了种子大小的形成, 特别是对拟南芥中WRKY2的功能进行研究后, 发现其可以调控种子萌发过程, 其缺失突变体对ABA存在着超敏感, 并且发现WRKY2可以调节由ABA诱导的幼苗生长停滞(Jiang和Yu 2009); 最近Kang等(2013)发现拟南芥转录因子WRKY家族成员MINISEED可以调控SYG1类蛋白SHB1的活性, 从而参与到种子发育过程。本研究*PsWRKY*基因的组织表达分析表明其在初花期牡丹品种‘鲁荷红’中主要在牡丹的叶片和心皮中表达, 在其他器官中表达量非常低, 推测牡丹*PsWRKY*基因在种子发育和叶片生长过程中起至关重要的作用。

近年来大量的实验结果证明WRKY与植物的抵御逆境胁迫相关, 对其是否参与花芽休眠过程知之甚少。如大麦WRKY38在冷害和干旱胁迫中表达, 表明其在冷害和干旱胁迫的信号转导中起调控功能(Maré等2004); Skinner (2009)发现小麦经过低温驯化, 抗冷性增强, 在这个过程中有423个

基因表达发生变化, 17个基因上调至少5倍, 其中包括转录因子CBF、WRKY以及锌指相关蛋白基因。牡丹花芽休眠属于典型内休眠, 花芽的分化基本在夏末结束, 但是芽体需要经历秋冬季才能膨大萌动, 进而开花展叶。王宗正等(1996)研究发现在解除牡丹花芽内休眠进程中低温起着关键作用。Huang等(2008)发现牡丹品种‘鲁荷红’在人工低温(4 °C)处理18 d即可休眠解除。本研究发现在人工低温处理的过程中, 牡丹*PsWRKY*基因呈上调表达趋势, 该结果表明*PsWRKY*基因受低温诱导, 而且暗示了*PsWRKY*基因参与了牡丹花芽的休眠解除。

参考文献

- 宋燕春(2013). 梨资源ISSR分析与花芽休眠解除研究[学位论文]. 福州: 福建农林大学
- 王宗正, 韩莉, 孔兰静(1996). 低温处理对牡丹开花和展叶的影响. 园艺学报, 23 (3): 307~308
- Dong J, Chen C, Chen Z (2003). Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. Plant Mol Biol, 51 (1): 21~37
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends Plant Sci, 5 (5): 199~206
- Gai SP, Zhang YX, Liu CY, Zhang Y, Zheng GS (2013). Transcript profiling of *Paeonia ostii* during artificial chilling induced dormancy release identifies activation of GA pathway and carbohydrate metabolism. PLoS ONE, 8 (2): e55297
- Gai SP, Zhang YX, Mu P, Liu CY, Liu S, Dong L, Zheng GS (2012). Transcriptome analysis of tree peony during chilling requirement fulfillment: Assembling, annotation and markers discovering. Gene, 497 (2): 256~262
- Gray J, Bevan M, Brutnell T, Buell CR, Cone K, Hake S, Jackson D, Kellogg E, Lawrence C, McCouch S et al (2009). A recommendation for naming transcription factor proteins in the grasses. Plant Physiol, 149: 4~6
- Guo C, Guo R, Xu X, Gao M, Li X, Song J, Zheng Y, Wang X (2014). Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family. J Exp Bot, 65 (6): 1513~1528
- He H, Dong Q, Shao Y, Jiang HY, Zhu SW, Cheng BJ, Xiang Y (2012). Genome-wide survey and characterization of the WRKY gene family in *Populus trichocarpa*. Plant Cell Rep, 31 (7): 1199~1217
- Huang X, Zhu W, Dai SL, Zheng GS, Zheng CC (2008). The involvement of mitochondrial phosphate transporter in accelerating bud dormancy release during chilling treatment of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). Planta, 228 (4): 545~552
- Jiang W, Yu D (2009). *Arabidopsis* WRKY2 transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid. BMC Plant Biol, 9: 96
- Kang X, Li W, Zhou Y, Ni M (2013). A WRKY transcription factor

- recruits the SYG1-like protein SHB1 to activate gene expression and seed cavity enlargement. *PLoS Genetics*, 9 (3): e1003347
- Lagacé M, Matton DP (2004). Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoensis*. *Planta*, 219 (1): 185~189
- Livak J, Schmittgen D (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4):402~408
- Luo M, Dennis ES, Berger F, Peacock WJ, Chaudhury A (2005). *MINISEED3 (MINI3)*, a *WRKY* family gene, and *HAIKU2 (IKU2)*, a leucine-rich repeat (*LRR*) *KINASE* gene, are regulators of seed size in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (48): 17531~17536
- Maré C, Mazzucotelli E, Crosatti C, Francia E, Stanca AM, Cattivelli L (2004). Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley. *Plant Mol Biol*, 55 (3): 399~416
- Rushton PJ, Somssich I E, Ringler P, Shen QJ (2010). WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci*, 15 (5): 247~258
- Skinner DZ (2009). Post-acclimation transcriptome adjustment is a major factor in freezing tolerance of winter wheat. *Funct Integr Genomics*, 9: 513~523
- Wang Y, Guo D, Li H L, Peng SQ (2013). Characterization of *Hb-WRKY1*, a WRKY transcription factor from *Hevea brasiliensis* that negatively regulates *HbSRPP*. *Plant Physiol Biochem*, 71: 283~289
- Xu YH, Wang JW, Wang S, Wang JY, Chen XY (2004). Characterization of *GaWRKY1*, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)- δ -cadinene synthase-A. *Plant Physiol*, 135 (1): 507~515
- Yang B, JiangYQ, Rahman MH, Deyholos MK, Kav NNV (2009). Identification and expression analysis of *WRKY* transcription factor genes in canola (*Brassica napus* L.) in response to fungal pathogens and hormone treatments. *BMC Plant Biol*, 9: 68