



西葫芦 *CpWRKY2* 基因的分离、鉴定及其对非生物胁迫分析

刘建汀, 曾美娟, 张前荣, 叶新如, 陈敏氢, 裘波音, 王彬, 李永平, 朱海生, 温庆放

引用本文:

刘建汀, 曾美娟, 张前荣, 叶新如, 陈敏氢, 裘波音, 王彬, 李永平, 朱海生, 温庆放. 西葫芦 *CpWRKY2* 基因的分离、鉴定及其对非生物胁迫分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2023, 31(6): 816–826.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4694>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

铁皮石斛 *DoSMT2* 基因的克隆与表达分析

Cloning and Expression Analysis of *DoSMT2* Gene in *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(6): 591–598 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4234>

毛竹 *APX* 家族基因鉴定和表达分析

Identification and Expression Analysis of the *APX* Gene Family in *Phyllostachys edulis*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 255–264 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4155>

青花菜 *BoSCL3* 基因的克隆和渍水胁迫下的表达特征分析

Cloning *BoSCL3* Gene from *Brassica oleracea* var. *italica* and Expression Analysis under Waterlogging Stress

热带亚热带植物学报. 2021, 29(2): 195–200 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4263>

橄榄 *CaICE1* 基因的克隆和表达分析

Cloning and Expression Analysis of the *CaICE1* Gene in *Canarium album*

热带亚热带植物学报. 2018, 26(6): 571–579 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3877>

马尾松 *PmPGK1* 和 *PmGPIC* 基因的克隆和表达分析

Cloning and Expression Analysis on *PmPGK1* and *PmGPIC* Genes in *Pinus massoniana*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(4): 339–348 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4315>

向下翻页, 浏览PDF全文

西葫芦 *CpWRKY2* 基因的分离、鉴定及其对非生物胁迫分析

刘建汀, 曾美娟, 张前荣, 叶新如, 陈敏氢, 裘波音, 王彬, 李永平, 朱海生*, 温庆放*

(福建省农业科学院作物研究所, 福建省蔬菜遗传育种重点实验室, 福建省蔬菜工程技术研究中心, 福州 350013)

摘要: 为了解西葫芦(*Cucurbita pepo*)的 *WRKY2* 的功能, 通过转录组测序技术从叶片中分离到 1 条长度为 1 071 bp 的 cDNA, 并对其进行序列分析。结果表明, 该序列包含 1 个 840 bp 的开放读码框, 预测编码 279 个氨基酸, 与中国南瓜(*Cucurbita moschata*, XM_023091218.1)的 *WRKY* 核苷酸序列相似性为 98.51%, 命名为 *CpWRKY2* (GenBank 登录号: XM_023676898.1)。*CpWRKY2* 定位于细胞核内, *CpWRKY2* 蛋白包含有 1 个保守的 *WRKY* 结构域(第 201~267 位), 206~266 位为 *WRKY* 蛋白 DNA 结合区域, 锌指结构域(第 232~264 位)为 C2H2 型, 且含有 1 个保守 RTGHARFRRAP (第 76~86 位)氨基酸序列, 属于典型的 IId 亚类 *WRKY* 家族蛋白。*CpWRKY2* 基因上游启动子区域(ATG 前的 1 513 bp 的序列)含有 ARE、ABRE、MBS、TC-rich repeat 和 W-box 等可能的胁迫响应顺式作用调控元件。*CpWRKY2* 具有组织表达特异性, 在花中表达量最高, 其次为根和茎, 在叶片和果实中的表达量较低。经 5 °C、10% PEG 6000 模拟干旱胁迫, 0.1 mmol/L ABA、50 mmol/L ETH、10 mmol/L SA 和 50 mmol/L MeJA 处理后叶片中 *CpWRKY2* 均出现上调表达, 因此, 推测 *CpWRKY2* 基因参与了西葫芦不同非生物胁迫的防御反应。

关键词: 西葫芦; *CpWRKY2*; 转录因子; 非生物胁迫; 基因表达

doi: 10.11926/jtsb.4694

Isolation, Identification and Response to Abiotic Stress of *CpWRKY2* Gene in *Cucurbita pepo*

LIU Jianting, ZENG Meijuan, ZHANG Qianrong, YE Xinru, CHEN Mindong, QIU Boyin, WANG Bin, LI Yongping, ZHU Haisheng*, WEN Qingfang*

(Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian Key Laboratory of Vegetable Genetics and Breeding, Fujian Engineering Research Center for Vegetables, Fuzhou 350013, China)

Abstract: In order to understand the function of *WRKY2* in zucchini (*Cucurbita pepo*), a length of 1 071 bp cDNA, named *CpWRKY2* (GenBank accession No. XM_023676898.1), was isolated from leaves by using transcriptome sequencing technology (i.e. RNA-seq). The cDNA contains an 840 bp open reading frame (ORF) encoding 279 amino acids. The nucleotide sequence of ORF was sharing over 98.51% with that from *Cucurbita moschata* (GenBank accession No.: XM_023091218.1), indicating a highly conservative evolution. *CpWRKY2*

收稿日期: 2022-07-04 接受日期: 2022-10-25

基金项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项(2022R1031007, 2021R1031001, 2020R1031002); 福建省自然科学基金项目(2021J01492); 福建省农业科学院科技创新团队项目(CXTD2021003-1); 国家大宗蔬菜产业体系福州综合试验站项目(CARS-23-G51); “5511”协同创新工程(XTCXGC2021003)资助

This work was supported by the Project for Basic Research of Public Research Institute in Fujian (Grant No. 2022R1031007, 2021R1031001, 2020R1031002), the Project for Natural Science in Fujian (Grant No. 2021J01492), the project for Science and Technology Innovation Team of Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No. CXTD2021003-1), the Project for Fuzhou Experimental Station of China Commodity Vegetable Industry System (Grant No. CARS-23-G51), and the Project for ‘5511’ Collaborative Innovation (Grant No. XTCXGC2021003).

作者简介: 刘建汀(1988年生), 男, 博士研究生, 研究方向为蔬菜遗传育种与生物技术。E-mail: 1037850256@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhs0246@163.com, fjvrc@163.com

protein was located in the nucleus, containing a conserved WRKY domain (position 201–267), a WRKY DNA binding domain (position 206–266), a zinc finger domain (position 232–264) of the C₂H₂ type, and a conserved RTGHARFRRAP (positions 76–86) amino acid sequence, which belonged to the typical IId subclass WRKY family proteins. The upstream promoter region of *CpWRKY2* gene (1 513 bp before ATG) contained possible stress response *cis*-acting elements, such as ARE, ABRE, MBS, TC-rich repeat, and W-box. *CpWRKY2* expression had tissue specificity, which was the highest in flowers, followed by roots and stems, and the lowest in leaves and fruits. Moreover, the expression of *CpWRKY2* was overall up-regulated under stresses, such as 5 °C, 10% PEG 6000, 0.1 mmol/L ABA, 50 mmol/L ETH, 10 mmol/L SA, and 50 mmol/L MeJA, suggesting *CpWRKY2* gene might be involved in defense response to different abiotic stresses of *C. pepo*.

Key words: *Cucurbita pepo*; *CpWRKY2*; Transcription factor; Abiotic stress; Gene expression

植物生长发育过程中往往面临各种生物和非生物胁迫,并在长期进化过程中形成了复杂的自我防御反应调控网络。WRKY 是一类植物特异的转录因子,广泛参与植物生长发育代谢、生物和非生物胁迫(温度、干旱等)调控^[1–4]。研究表明,WRKY 家族成员的典型特征是含有 1 或 2 个由约 60 个氨基酸构成的高度保守 WRKY 结构域,其 5'端包含保守的 WRKYGQK 基序(极少数突变为 WRKYGKK、WRKYGMK、WRKYGEK 等),3'端则含有 1 个保守的锌指结构基序,可以特异结合下游靶基因启动子核心序列中的 W-box 顺式元件,激活或抑制下游基因的表达,并对生物和非生物胁迫反应,改变植株的耐逆性^[5–6]。根据 WRKY 的结构数目和特点,WRKY 转录因子可分为 3 类,第一类(I)含有 2 个 WRKY 保守结构域,锌指结构为 C₂H₂ 型;第二类(II)含有 1 个 WRKY 结构域,锌指结构均为 C₂H₂ 型,又可细分为 5 个亚类(IIa~IIe);第三类(III)含有 1 个 WRKY 结构域,锌指结构为 C₂HC 型^[7–8]。目前,从植物中分离到的 WRKY 类转录因子大多都定位于细胞核中,且大部分 WRKY 含有核定位信号保守基序^[9]。

近年来,西葫芦(*Cucurbita pepo*)的栽培面积仅次于黄瓜(*Cucumis sativus*),已经成为农民增收、农业产业结构调整的重要栽培作物。西葫芦易受低温、干旱等非生物胁迫影响,造成落花落果、果实畸形以及多种病害等生理障碍,导致产量与品质严重下降^[10–11]。据 PlantTFDB v5.0 统计,目前已分离出约 94 个拟南芥、125 个马铃薯(*Solanum tuberosum*)、109 个水稻(*Oryza sativa* subsp. *indica*)、69 个辣椒(*Capsicum annuum*)和 88 个黄瓜 WRKY 转录因子。植物通过信号传导并产生一系列应答基因表达产物,以减少胁迫产生的伤害和增加耐受性,WRKY

蛋白起着重要的调控作用。WRKY 对逆境胁迫反应主要依赖于脱落酸(ABA)^[12]、水杨酸(SA)^[13–14]、茉莉酸(MeJA)^[15]和乙烯利(ETH)^[16]等激素信号转导途径,WRKY 能够直接与自身或下游基因启动子中的 W-box 结合,正向或负向调控下游靶基因的表达,形成复杂的信号调控网络,从而增强或降低植物对环境的耐受能力^[17–18]。玉米(*Zea mays*)的 *ZmWRKY79* 通过激活下游靶基因 *ZmAAO3* 的表达并增加 ABA 激素合成来提高耐旱能力^[19];在黄瓜的 *CsWRKY46* 通过介导 ABA 激素响应积极参与低温胁迫反应防御^[20];番茄(*Lycopersicon esculentum*)中 20 个 *SlWRKYs* 基因通过结合下游基因或与其他转录因子形成的复合体参与 ICE-CBF-COR 低温调控途径^[21];密罗木(*Myrothamnus flabellifolia*)中 *MfWRKY17* 的过量表达可以调控 ABA 响应基因(靶基因 *MfNECD3* 和 *MfRAB18*),以提高转基因拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)植株的耐盐和抗旱性^[22];狗牙根(*Cynodon dactylon*)的 *CdWRKY2* 基因受低温诱导显著上调表达,并提高转基因植株的抗寒性,*CdWRKY2* 能特异地结合到 *CdSPS1* 和 *CBF2* 启动子的 W-box 元件并激活其表达,协调介导蔗糖的合成和 CBF 信号通路,调控植物的抗寒性^[23]。目前,除本研究团队 2020 年报道了 2 个 WRKY 基因外,还鲜见西葫芦其他 WRKY 基因的克隆和功能分析研究。

前期田间育种过程中发现西葫芦‘福美 6 号’容易受低温、干旱等逆境胁迫影响,引起产量和品质的下降。本研究以‘福美 6 号’为材料,采用转录组测序技术从叶片中克隆获得 *CpWRKY2* 基因,对基因结构、编码蛋白的生物信息学及其表达模式进行了分析,探讨 *CpWRKY2* 在西葫芦非生物胁迫响应过程中的调控作用,为开展西葫芦优良品种的选育以及非生物胁迫防御反应的分子机理研究提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料西葫芦‘福美 6 号’ (*Cucurbita pepo* ‘Fumei 6’)由福建省蔬菜遗传育种重点实验室福清东张基地(119.18° E, 25.69° N)保存^[10]。植物 DNA 提取试剂盒 FastPure[®] Plant DNA Isolation Mini Kit、DNA Marker (DL 2000)、植物 RNA 提取试剂盒 FastPure[®] Plant total RNA Isolation Kit、RNA 逆转录试剂盒 PrimeScript[™] 1st Strand cDNA、限制性内切酶 *Sac* I 和 *Bam*H I 购于 TaKaRa 公司, 基因扩增试剂盒 Phanta Max Master Mix、荧光定量试剂盒 ChangesQ[™] Universal SYBR qPCR Master Mix、DL2000 plus DNA Marker、质粒抽提试剂盒 FastPure[®] Plasmid Mini Kit、DNA 产物纯化试剂盒 FastPure[®] Gel DNA Extraction Mini Kit、同源重组试剂盒 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit、DNA 快速克隆试剂盒 TA/Blunt-Zero Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司, 瞬时表达载体 PC1300S-*GFP* 由本实验室保存, 大肠杆菌 DH5 α 和农杆菌 GV3101 菌株均购自上海唯地生物技术有限公司, 其他生化试剂均为国产分析纯级。

1.2 WRKY 基因及其上游启动子扩增

参考植物 DNA 试剂盒说明书提取西葫芦样品的 DNA, 根据西葫芦全基因组数据库和前期转录组测序库中搜索到的 *CpWRKY2* 基因信息, 设计基因启动子和全长克隆引物(表 1), PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖电泳、纯化、回收后, 与 *PCE2 TA/Blunt-Zero* 载体进行连接、转化大肠杆菌 DH5 α , PCR 检测后的阳性单克隆菌液送至福州尚亚生物科技有限公司进行测序验证。

1.3 蛋白生物信息学分析

采用在线工具包(SMS)(<http://www.bio-soft.net/>

[sms/index.html](http://www.bio-soft.net/sms/index.html))进行基因和蛋白序列分析; DNA-MAN 软件和 EditSeq 5.01 软件分析蛋白的理化性质; 进化树的最大似然法构建采用 MEGA 7.0 软件; 保守结构域分析采用 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>); 蛋白的一级结构分析采用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)和 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)软件; 蛋白翻译后修饰采用 MotifScan 软件(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan); 蛋白信号肽分析采用 SignalP 6.1 Server 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); 蛋白跨膜分析采用 TMHMM Server v6.0 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); 蛋白二级结构分析采用在线软件 CFSSP (<http://www.biogem.org/tool/choufasm-an/>); 蛋白三级结构分析采用在线软件 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)进行蛋白模板比对, 采用 SPDBV 软件构建蛋白三级结构模型, 采用 VMD 软件进行蛋白模型呈现; 亚细胞定位分析采用 Wolf Psort Prediction 软件(http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html)。

1.4 CpWRKY2 基因的表达分析

选取颗粒饱满的西葫芦种子, 用 0.2%高锰酸钾溶液进行浸泡消毒 2 h, 清水洗净晾干, 在福建省蔬菜遗传育种重点实验室福清东张基地蔬菜育苗大棚内, 播种于 32 孔穴盘中, 出现第 2 片真叶后进行移栽, 采集商品期的西葫芦根、茎、叶、花和果, 利用百泰克试剂盒提取各组织的总 RNA, 反转录成 cDNA 后, 调整 cDNA 浓度至 50 ng/ μ L。根据获得的 *CpWRKY2* 序列设计特异引物(表 1), 以西葫芦 *Actin* 基因(GenBank 登录号: MH21108)为内参基因^[24], 利用 ABI7500 Real-Time PCR system (美国 ABI 公司), 参考 ChangesQ[™] Universal SYBR qPCR Master Mix 说明书进行 PCR 扩增, 均开展 3 次生物学和 3 次技术重复实验。

表 1 引物

Table 1 Primers

引物 Primer	正向引物 Forward primer (5'~3')	反向引物 Reverse primer (5'~3')
CpWRKY2	ATTCCCAATACCCCTTTTCTCTCCGTCCACCTC	ACGAAAGCAAACCCATGATCTTCTTCATTCTC
QCpWRKY2	AGTGAGCTTTAAATAGACAAAAAATAAATTATT	ATGGAAGGAGGTGGACGGAGAAG
MQCpWRKY2	ctctcgagctttgcgagctcATGGCGGTGGAGCTTCTCTC	gcacctgctcaccatggatccCATGATTCAAGGATGAGACTTGA
CpWRKY2	GCTCATCTCATTACTCTCCC	GAATCAGCCACCACCATTA
CpActin	CACACAGGATACGAGTGG	GCAATATCCTCATACGGTGG

下划线为 *Sca* I 和 *Bam*H I 酶切位点。

Underline are *Sca* I and *Bam*H I restriction sites.

1.5 不同处理下 *CpWRKY2* 的表达分析

西葫芦种子发芽后播种于 32 孔育苗盘中, 在光照培养箱(28 °C, 16 h 光照/28 °C, 8 h 黑暗)中培养 4 周后, 在 5 °C、10% PEG 6000、0.1 mmol/L ABA、50 mmol/L ETH、10 mmol/L SA 和 50 mmol/L MeJA 分别处理幼苗 20 株, 在 0、2、4、8 和 12 h 采集叶片液氮速冻, 并于 -80 °C 冰箱保存备用。每处理 3 个生物学重复。

1.6 *CpWRKY2* 亚细胞定位分析

利用 Primer3Plus 在线软件设计引物 *MQCp-WRKY2* (表 1), 在 *CpWRKY2* 基因的开放读码框(ORF)两端加入酶切位点 *Sac* I 和 *Bam* H I (去掉终止密码子), 以测序验证后的重组质粒 *PCE2 TA/Blunt-CpWRKY2* 为模板进行 ORF 全长扩增和胶回收。用限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Sac* I 对质粒 pCambia 1300-*GFP*(35S::*GFP*)进行双酶切。用同源重组连接酶将回收的 *CpWRKY2* 连接载体 35S::*GFP*, 转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态, 经菌液 PCR 及测序验证, 获得重组质粒 35S::*CpWRKY2*::*GFP*。将重组质粒 35S::*CpWRKY2*::*GFP* 和对照空载体质粒 35S::*GFP* 分别转入农杆菌 GV3101 菌株中, 挑取阳性的单克隆菌落于含有 50 μ g/mL 利福平和 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中培养, 在 28 °C 摇床以 200 r/min 培养过夜; 用含 10 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L MES 和 100 mmol/L 乙酰丁香酮的侵染液重悬农杆菌至 OD₆₀₀ 约为 0.8, 冰浴 1 h 后, 用无针头的 10 mL 注射器将 35S::*CpWRKY2*::*GFP* 重组载体和 35S::*GFP* 空载体的菌液注射至烟草(*Nicotiana tabacum*)下表皮。注射后的烟草置于室温黑暗放置 24 h, 然后于 28 °C 气候箱中培养 1 d。利用激光共聚焦显微镜(LEICA TCS SP8, 德国莱卡)观察侵染烟草叶片, 分析 *CpWRKY2* 蛋白的亚细胞定位情况。

1.7 数据分析

采用 Excel 软件和 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算 *CpWRKY2* 基因的相对表达量, 利用 SPSS 19.0 软件中单因素方差分析法对 *CpWRKY2* 表达进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 *CpWRKY2* 基因克隆

根据西葫芦全基因组信息, 设计 *WRKY* 基因启动子引物 *QCpWRKY2*, 扩增得到西葫芦 *WRKY* 基因启动子序列长度为 1 513 bp (图 1)。通过设计基因

全长引物, 从西葫芦基因组中克隆得到 1 条全长为 1 349 bp 基因序列, 同源性分析表明, 该 CDS 序列与同为南瓜属的中国南瓜(*Cucurbita moschata*, XM_023091218.1, E value: 0)的 *WRKY* 序列相似性高达 98.51%, 经测序验证和比对分析, 获得的 *WRKY* 基因(GenBank 登录号: MF988287)^[11]和 NCBI 中公布的西葫芦 *WRKY* 全基因组(XM_023676898.1)序列信息完全一致^[25], 将该基因命名为 *CpWRKY2*。

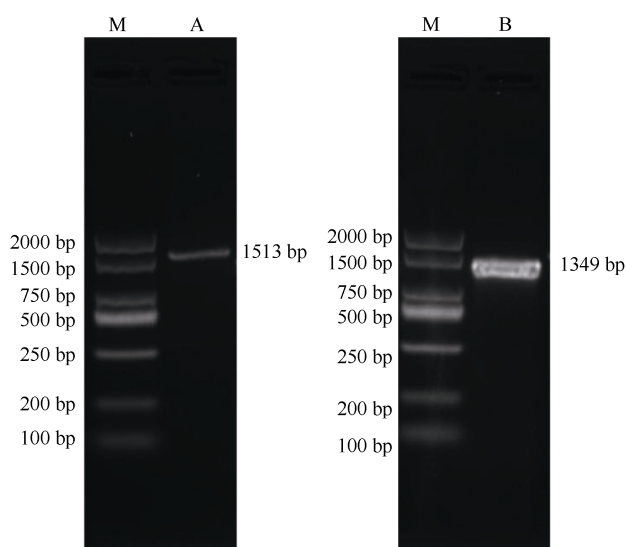


图 1 西葫芦 *CpWRKY2* 基因和启动子的 PCR 扩增。M: DL2000 marker; A: 启动子; B: *CpWRKY2* 基因。

Fig. 1 PCR amplified of *CpWRKY2* and promoter of *Cucurbita pepo*.

M: DL2000 marker; A: Promoter; B: *CpWRKY2* gene.

2.2 生物信息学分析

序列分析表明, *CpWRKY2* 基因全长 1 351 bp, 上游和下游非编码区长度分别为 193 和 38 bp, 基因编码区含有 2 个内含子(第 590~775, 905~998 位)(图 2)。预测 *CpWRKY2* 基因编码 279 个氨基酸(AA), *CpWRKY2* 蛋白(登录号: XP_023532666.1)理论分子量(Mw)为 30.18 kD, 等电点为 9.29, pH 7.0 时的带电荷数为 12.87。CpWRKY2 蛋白由 20 种氨基酸构成, 其中丝氨酸(Ser)含量最高(17.6%), 丙氨酸(Ala)次之(9%), 色氨酸(Trp)最低(0.7%)。CpWRKY2 蛋白包含 79 个疏水氨基酸(A、I、L、F、W 和 V)、91 个极性氨基酸(N、C、Q、S、T 和 Y)、34 个碱性氨基酸(K 和 R)和 23 个酸性氨基酸(D 和 E)。CpWRKY2 蛋白的总平均疏水性(GRAVY)为 -0.534, 蛋白不稳定系数(II)为 48.37, 脂肪族指数(AI)为 68.60, 预测为亲水性蛋白。

```

1 attccaatacccttttcttctccgtccacctccttccATGGCGGTGGAGCTTCTCTCAG
1 M A V E L L S A
61 CCTACCAACGCCCATCTCTCCGCCGCAATGGACCAAGACTCCGCCGTCCATGAAGCCG
9 Y T N A H L S A A M D Q D S A V H E A A
121 CCTCCGGTATCCACACCTCAAAAAGCTCATCTCATTACTCTCCCACTCCCACTTCTA
29 S G I H T L K K L I S L L S H S P P S N
181 ACCTCGACTCCGATTGCCAAGCCGTTGCTAACGCCGCCGTCTCCATTTCAAAAAGGCCA
49 L D S D C Q A V A N A A V S H F K K A I
241 TTTCTCTCTCGGCCACTCCCTCGTACCGGACACGCTCGATTCCGCCGCGCCCTTAG
69 S L L G H S P R T G H A R F R R A P L D
301 ATTCTCTCAAATTTACAACGCAACCCCATTCAGCAAATCCCTCCGCCGCTCTCGAAT
89 S S Q I Y N A T P I Q Q I P P P P L E S
361 CAGCCACCACCATTAATTTCTCTCATTCTCGTTCCGCCGCCGACTCTGAAATTAACC
109 A T T I N F S H S S F P A A D S E I N L
421 TCCAACCAACCTCTCTCTCTTTCAAATCACTGATCTCTCCAGGGTTCTCTCTG
129 Q H Q P S S S S F Q I T D L S R V S S V
481 TTGTCTCTAAGCCCTCTCTGGCTCCAAGAGAAAGTGGGCTCTGAAAATTTGGGCTCTG
149 V S K P S S G S K R K C G S E N L G S G
541 GGAAGTGGGCGAATCTCCGGTGGTCGATGCCATTGCTCCAAGAAGAGgtacaattcta
169 K C G E S S G G R C H C S K K S
601 aacttaaatccattaattctctcggtatctgatactaacatgttgaaatcatgacataacat
661 agccaagaacttttagatttctagggttttgtatgaatttcaagtagctatctgtttaatc
721 ttcaatggatatgaactaaacaaacaccccatgttttgtatgcaatgaatagCAGAA
185 R K
781 AAATGAGGTTCAAAAGAGTGGTGAGAGTTCAGCTATTAGCTCAAAGAAGCTGATATCC
187 M R F K R V V R V P A I S S K N A D I P
841 CTCCTGATGATTATTCATGGAGGAAGTATGGACAGAAGCAATAAAGGGTCTCCATATC
207 P D D Y S W R K Y G Q K P I K G S P Y P
901 CAAGGtaatgatcatagacattcattaaattcactcaaagttgctgaaattcatcaagt
227 R
961 tcttgagattaataatgggggggtttgtgatttgcagAGGTTACTATAAATGCAGCAGT
228 G Y Y K C S S
1021 TTAAGAGGATGCCCTGCTAGAAAACATGTGGAGAGAGCTTCAGATGATCCATCTATGTTA
235 L R G C P A R K H V E R A S D D P S M L
1081 ATAGTGACATATGAAGGCGATCATAATCACTCTCAATCAGTGGCAGAGGCCTCAAGTCTC
255 I V T Y E G D H N H S Q S V A E A S S L
1141 ATCCTTGAATCATGGTGAacacaaagaacagaatcacaacaaaaaaaaaattcactctgt
275 I L E S W *
1201 ttttcttttgattcatacagaaatagaaatagttatttgtttacatcacagttcttagtt
1261 cttgtgagaaactctccaaaaatgaattaatttttagttttgagcttagaagaagaaga
1321 gaaatgaagaagatcatgggtttgcttttctgt

```

图 2 *CpWRKY2* 基因全长及其编码氨基酸序列。红色：特征序列 WRKYGQK 和锌指结构域 C_2H_2 ；方框：起始密码子(ATG)和终止密码子(TGA)。

Fig. 2 Full-length sequence of *CpWRKY2* and encoding amino acid sequence. Red: Characteristic sequence WRKYGQK and C_2H_2 domain; Box: Start codon (ATG) and stop codon (TGA).

西葫芦 *CpWRKY2* 蛋白的二级结构(CFSSP)分析表明, 随机卷曲最多, 为 71.68%, 其次为 α 螺旋和延伸链, 分别占 19.71%和 6.81%, 没有 β 转角结构。利用 SWISS-MODEL、SPDBV 和 VMD 软件进行三级结构建模和可视化作图(图 3), 拟参与 WRKY 转录激活功能的 61 个保守结构域(204~264 位)由 1 个 WRKYGQK (212~218 位)基序和 C_2H_2 (Cys: 232, 238 位; His: 262, 64 位)锌指结构共同组成。

Motif Scan 在线软件分析表明, *CpWRKY2* 蛋白包含 1 个保守的 WRKY 结构域(201~267 位, E 值为 $1.6e^{-24}$), 206~266 位为 WRKY 蛋白 DNA 结合区域, 锌指结构域(232~264 位)为 C_2H_2 型, 且含有 1 个保守 RTGHARFRRAP (76~86 位)氨基酸序列, 属于典型的IId 型 WRKY 蛋白。分析表明, 113~116 和 263~266 位为 N 糖基化位点; 47~50 和 267~270 位为酪蛋白激酶 II 磷酸化位点; 166~171 位为

N-豆蔻酰化位点; 33~35、74~76、156~158、167~169、181~183、184~186、199~201、211~213 和 234~236 位为蛋白激酶 C 磷酸化位点。TMHMM 表明, *CpWRKY2* 属于非跨膜蛋白, 不含跨膜螺旋区。SignalP 分析表明, *CpWRKY2* 蛋白不含信号肽序列。*CpWRKY2* 中没有核定位信号保守基序。

蛋白亚细胞定位预测表明, *CpWRKY2* 转录因子位于细胞核中。通过农杆菌介导的烟草瞬时表达亚细胞定位分析表明, 在注射空载体 *35S::GFP* 的对照组中, 绿色荧光在细胞膜、细胞质和细胞核中均有分布, 而注射瞬时表达载体 *35S::CpWRKY2::GFP* 的细胞中, 仅在细胞核中有绿色荧光。说明 *CpWRKY2* 蛋白定位在细胞核上, 这与亚细胞定位预测结果一致, 推测 *CpWRKY2* 在细胞核内发挥转

录调控作用(图 4)。

从 PlantTFDB (<http://planttfdb.gao-lab.org/>)转录因子数据库中下载了 18 个 *CpWRKY2* 同源蛋白的序列, 利用 MEGA7.0 软件构建 *CpWRKY2* (XP_023532666.1)、6 个葫芦科(Cucurbitaceae)、4 个十字花科(Brassicaceae)、4 个禾本科(Gramineae)和 4 个茄科(Solanaceae)植物的 WRKY 蛋白系统进化树。结果表明, 西葫芦 *CpWRKY2* 与中国南瓜、印度南瓜、黄瓜和甜瓜等葫芦科植物 WRKY 聚为一类, 亲缘关系较近, 与烟草、番茄和马铃薯等茄科植物 WRKY 蛋白的亲缘关系较远(图 5)。

2.3 *CpWRKY2* 基因上游启动子分析

PlantCARE 启动子预测软件分析表明(表 2), *CpWRKY2* 基因启动子上游 1 513 bp 具有许多顺式

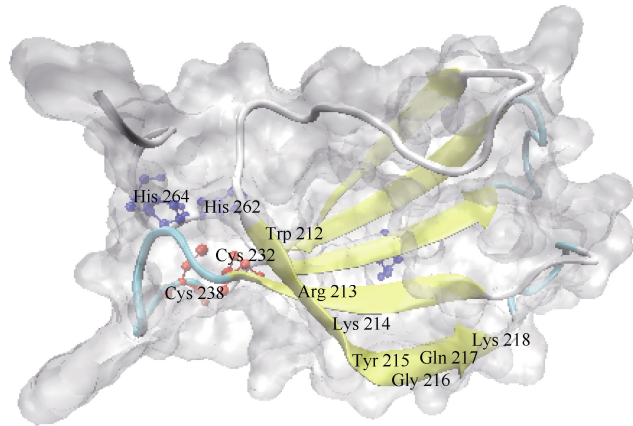


图 3 *CpWRKY2* 的三级结构预测

Fig. 3 Prediction of tertiary structure of *CpWRKY2*

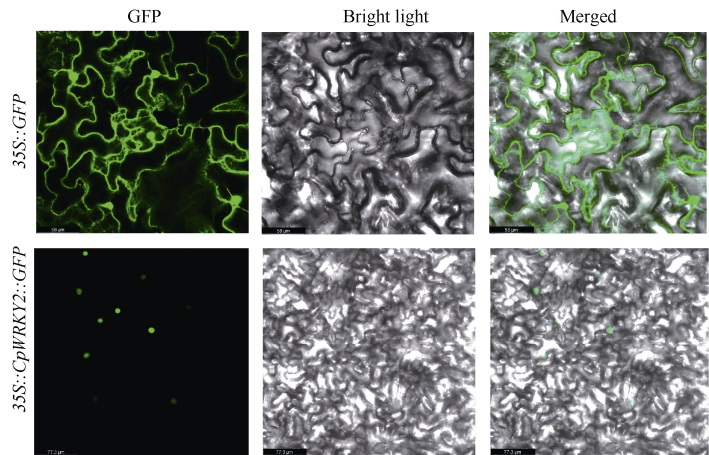


图 4 *CpWRKY2* 在本氏烟草下表皮细胞中的亚细胞定位。35S::GFP: 携带空载 pCAMBIA1300-GFP 的农杆菌菌株; 35S::*CpWRKY2*::GFP: 携带重组载体 pCAMBIA1300-*CpWRKY2*-GFP 的农杆菌菌株。

Fig. 4 Subcellular localization of *CpWRKY2* in lower epidermal cells of *Nicotiana benthamiana*. 35S::GFP: *Agrobacterium tumefaciens* strain with empty vector pCAMBIA1300-GFP; 35S::*CpWRKY2*::GFP: *A. tumefaciens* strain with recombinant vector pCAMBIA1300-*CpWRKY2*-GFP.

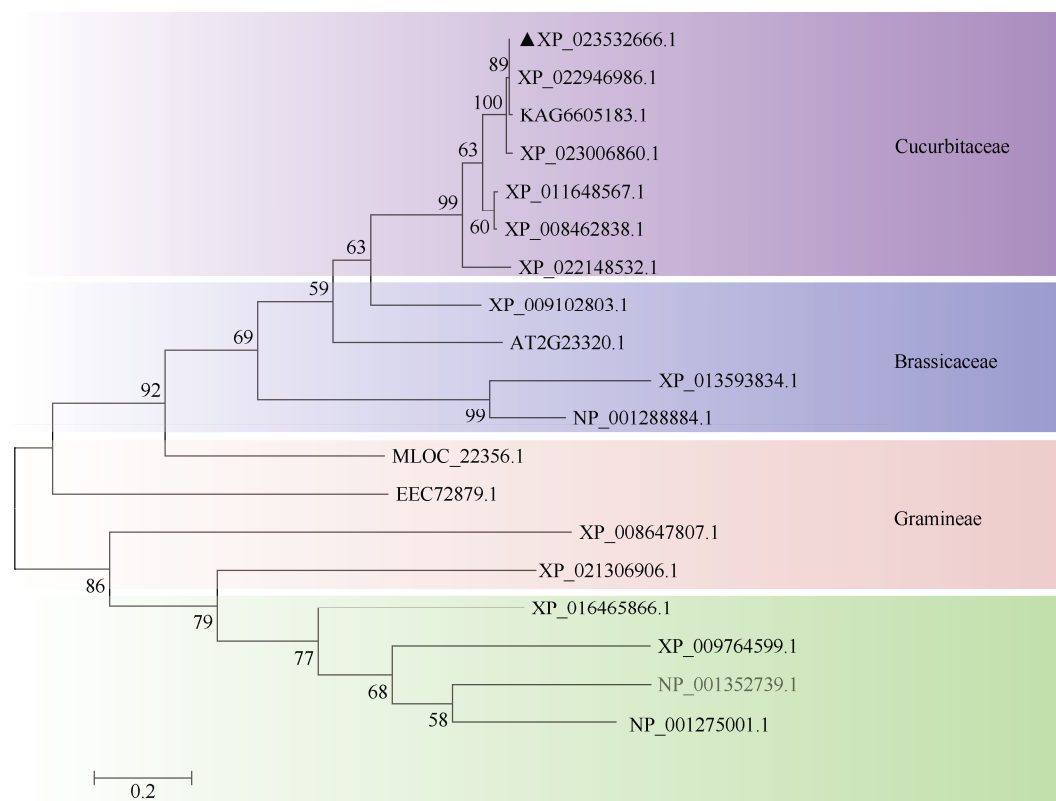


图 5 WRKY 的系统进化树。XP_023532666.1: 西葫芦; XP_022946986.1: 中国南瓜; KAG6605183.1: 野生灰籽南瓜; XP_023006860.1: 印度南瓜; XP_011648567.1: 黄瓜; XP_008462838.1: 甜瓜; XP_022148532.1: 苦瓜; XP_009102803.1: 芜菁; AT2G23320.1: 拟南芥; XP_013593834.1: 甘蓝; NP_001288884.1: 欧洲油菜; MLOC_22356.1: 大麦; EEC72879.1: 水稻; XP_008647807.1: 玉米; XP_021306906.1: 高粱; XP_016465866.1, XP_009764599.1: 烟草; NP_001352739.1: 番茄; NP_001275001.1: 马铃薯。

Fig. 5 Phylogenetic tree of WRKY. XP_023532666.1: *Cucurbita pepo*; XP_022946986.1: *C. moschata*; KAG6605183.1: *C. argyrosperma*; XP_023006860.1: *C. maxima*; XP_011648567.1: *Cucumis sativus*; XP_008462838.1: *C. melo*; XP_022148532.1: *Momordica charantia*; XP_009102803.1: *Brassica rapa*; AT2G23320.1: *Arabidopsis thaliana*; XP_013593834.1: *Brassica oleracea*; NP_001288884.1: *B. napus*; MLOC_22356.1: *Hordeum vulgare*; EEC72879.1: *Oryza sativa*; XP_008647807.1: *Zea mays*; XP_021306906.1: *Orghum bicolor*; XP_016465866.1, XP_009764599.1: *Nicotiana tabacum*; NP_001352739.1: *Lycopersicon esculentum*; NP_001275001.1: *Solanum tuberosum*.

作用元件, 其中包含 ARE、ABRE、MBS、TC-rich repeat 和 W-box 等胁迫响应元件, 也存在光响应、昼夜节律响应等元件, 暗示 *CpWRKY2* 基因可能受低温、弱光、干旱等非生物胁迫诱导表达。

2.4 *CpWRKY2* 基因表达模式分析

定量 PCR 分析表明, *CpWRKY2* 基因在西葫芦的根、茎、叶、花和果实中均有表达, 其中, 花中的表达丰度最高, 其次为根和茎, 在果实中的表达量最低, *CpWRKY2* 基因表达呈现组织特异性(图 6)。

西葫芦幼苗经 5 °C 低温处理, *CpWRKY2* 在处理 2、4 和 6 h 有较高的表达丰度, 12 h 后表达量降低, 但表达量仍显著高于对照(0 h) (图 7)。用 10% PEG 6000 模拟干旱胁迫, *CpWRKY2* 在处理 4 h 内的表达无明显变化, 处理 8 h 后表达量显著高于对

照, 并在 12 h 出现峰值。0.1 mmol/L ABA 处理后 *CpWRKY2* 呈现先上调后下调的表达趋势, 处理 2 h

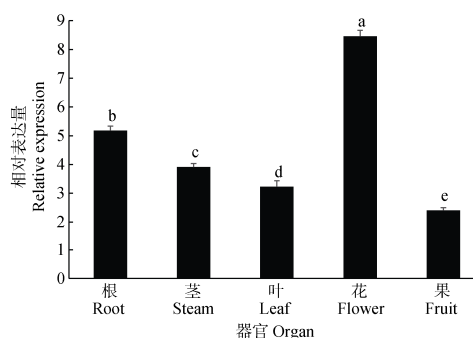


图 6 *CpWRKY2* 的表达模式。柱上不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同
Fig. 6 *CpWRKY2* Expression pattern of *CpWRKY2*. Different letters upon column indicate significant difference at 0.05 level. The same below

表 2 PlantCARE 启动子预测

Table 2 Promoter prediction by PlantCARE

顺式作用元件 <i>cis</i> -Element	序列(5'~3') Sequence	功能 Function	数量 Number
A-box	CCGTCC	顺式调控元件 <i>cis</i> -Acting regulatory element	1
ABRE	CACGT	参与脱落酸反应 Absciscic acid response	2
ARE	TGTTT	厌氧诱导必需元件 Essential element for anaerobic induction	1
Box 4	ATTAAT	参与光响应的保守 DNA 模块的部分元件 Part of a conserved DNA module involved in light response	5
CAAT-box	CAAAAT	启动子和增强子区域中常见的顺式作用元件 Common <i>cis</i> -acting elements in promoter and enhancer	24
CCAAT-box	CAACGG	MYBHv1 结合位点 MYBHv1 binding site	1
G-box	CACGTC	参与光响应 Light response	3
GATA-motif	GATAGGA	部分光响应元件 Part light response element	1
GT1-motif	GGTTAAT	光响应元件 Light responsive element	2
MBS	CAACTG	参与干旱响应的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in drought-induced	1
MRE	AACCTAA	参与光反应的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in light response	2
TATA-box	TATAA	转录起始的-30 附近的核心启动子元件 Core promoter element near -30 start transcription	49
TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	参与防御和胁迫反应 Defense and stress response	1
TCA-element	CCATCTTTT	参与盐胁迫反应 Salt stress	1
TGA-element	AACGAC	生长素响应元件 Auxin-response element	1
W-box	TTGACC	生物和非生物胁迫应答, 结合 WRKY 类转录因子 Bio-, abiotic stress response, combined with WRKY-like transcription factors	3
WUN-motif	AAATTTCCT	机械损伤响应元件 Wound-response element	1
P-box	CCTTTTG	赤霉素响应元件 Gibberellin-response element	1

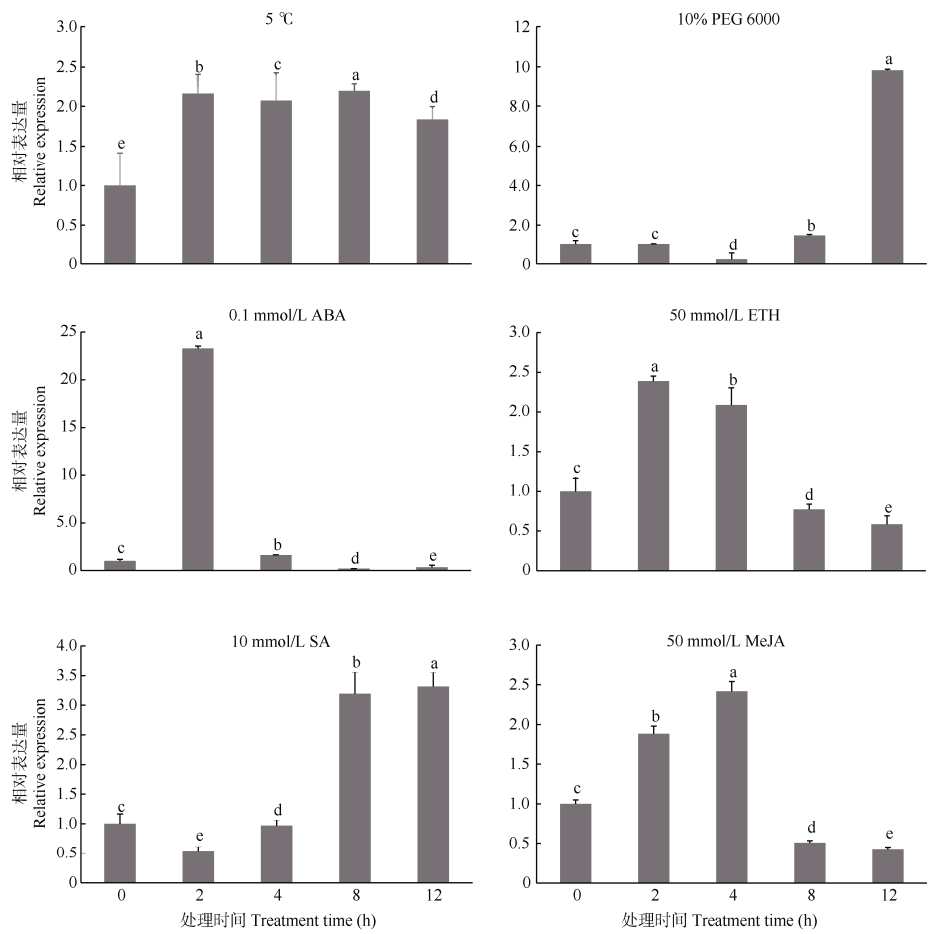


图 7 不同胁迫下 *CpWRKY2* 基因的表达模式

Fig. 7 Expression pattern of *CpWRKY2* gene under different stresses

的表达量最高,为对照的 23 倍,达极显著差异。*CpWRKY2* 表达在 50 mmol/L ETH 处理 2 和 4 h 上调,此后逐渐降低。*CpWRKY2* 表达在 10 mmol/L SA 处理 12 h 内总体呈上调趋势,在 12 h 的表达丰度最高。*CpWRKY2* 表达在 50 mmol/L MeJA 处理 2 和 4 h 上升,此后逐渐降低,处理 8 和 12 h 的表达量低于对照。

3 结论和讨论

转录因子调节的应答胁迫转录重排在植物耐逆防御反应过程中起重要调节作用,并以多基因家族的形式存在,据 PlantTFDB 统计。目前鉴定出的转录因子至少有 58 种,主要包括 NAC、MYB、WRKY、DREB/ERF 和 M-type_MADS 等家族。随着转录组测序、全基因组测序等技术的快速发展,越来越多的 *WRKY* 基因被逐渐分离出来,植物中的 *WRKY* 转录因子已达 14 549 个,成为高等植物中最为常见及研究较多的转录因子家族之一^[26]。研究表明,植物通过信号传导并产生一系列应答基因表达产物,以此减少胁迫产生的伤害并增加耐受性,*WRKY* 蛋白在此起着重要的调控作用。*WRKY* 转录因子的基因克隆与功能鉴定研究在模式植物和其他作物中不断深入,但鲜见西葫芦中 *WRKY* 基因的克隆和分析的报道。本研究利用转录组测序技术,从西葫芦‘福美 6 号’叶片中克隆得到 *CpWRKY2* 转录因子基因,*CpWRKY2* 的 ORF 全长为 840 bp, *CpWRKY2* 蛋白与中国南瓜(XP_022946987.1)和黄瓜(XP_011648567.1)同源蛋白的相似性分别为 99.64%和 86.39%,具有高度的蛋白进化保守性。Wolf Psort 在线预测和烟草瞬时表达分析表明, *CpWRKY2* 蛋白亚细胞定位于细胞核中。此外, Motif Scan 分析表明, *CpWRKY2* 蛋白包含 *WRKY* 保守结构域(201~267 位)、*WRKY* 蛋白 DNA 结合区域(206~266 位)和 C_2H_2 型($C_{x5}C_{x23}H_{x1}H$) 锌指(232~264 位),且含有 1 个 RTGHARFRRAP 氨基酸保守基序,属于典型的 IId 亚类 *WRKY* 转录因子蛋白家族^[27]。

本研究结果表明, *CpWRKY2* 基因具有组织表达特异性,在花中的表达量较高,暗示 *CpWRKY2* 基因可能参与了西葫芦花期的发育调控^[28-29]。目前已识别和克隆的 *WRKY* 转录因子在各种环境(干旱、低温、盐、机械损伤等)的诱导下,其表达具有快速、瞬时等特点,同时还具有组织表达特异性,可通过

介导 ETH、SA、ABA 和 MeJA 等信号通路对多种逆境胁迫进行防御反应^[30-32]。*WRKY* 转录因子上游启动子的顺式作用元件是其参与何种逆境胁迫响应的重要依据,本研究通过 PlantCARE 在线网站预测 *CpWRKY2* 上游启动子 1 513 bp 内包括 1 个胁迫响应元件 ARE、2 个脱落酸(ABA)响应元件 ABRE、1 个 MBS 干旱胁迫响应的 MYB 结合响应元件、1 个 TC-rich repeat 防御和胁迫反应元件以及 3 个结合 *WRKY* 响应生物和非生物胁迫响应的 W-box 元件^[33-35]。经 RT-qPCR 验证,在 5 °C、PEG 6000 模拟干旱胁迫、ABA、ETH、SA 和 MeJA 处理后, *CpWRKY2* 均出现不同程度的上调表达,暗示 *CpWRKY2* 基因可能参与多种非生物逆境,包括低温、干旱等胁迫的调控,这与课题组前期对 *CpWRKY2* 基因在低温弱光胁迫中的研究结果一致^[11]。进一步分析表明,正常情况下, *CpWRKY2* 在西葫芦叶片的表达量相对较低,但 ABA 处理后呈先上调后下调的表达趋势,可能受其他 *WRKY* 蛋白或 *CpWRKY2* 上游启动子中含有的 W-box (TTGACC)结合而调控自身表达,或在此响应过程中受其他转录因子的竞争抑制影响而呈现下调表达^[36-37]。因此,推测 *CpWRKY2* 可能通过 ABA 信号途径介导并参与多种胁迫反应。但对非生物胁迫下西葫芦中 *CpWRKY2* 的生物学功能及其调控分子机制还需进一步验证。本研究加深了对 *CpWRKY42* 参与逆境应答调控的认识,为下一步开展 *CpWRKY2* 转录因子基因调控低温、干旱等非生物胁迫的分子机制研究奠定了基础。

综上所述,本研究从西葫芦转录组数据库筛选出 1 条 *CpWRKY2* 基因,全长 1 071 bp,与中国南瓜的 *WRKY* 核苷酸序列相似性为 98.51%,具有高度的保守性。*CpWRKY2* 蛋白包含 1 个 *WRKY* 保守结构域和 C_2H_2 型锌指,且含有 1 个 RTGHARFRRAP 氨基酸保守基序,属于 IId 亚类 *WRKY* 转录因子蛋白家族。*CpWRKY2* 基因启动子中含有 ARE、ABRE 和 W-box 等可能的胁迫响应顺式作用调控元件,且 *CpWRKY2* 基因可受激素、低温及干旱胁迫诱导表达,推测 *CpWRKY2* 基因在响应西葫芦低温、干旱等非生物胁迫应答过程中具有重要的调控作用。

参考文献

- [1] CHEN C H, CHEN X Q, HAN J, et al. Genome-wide analysis of the *WRKY* gene family in the cucumber genome and transcriptome-wide

- identification of WRKY transcription factors that respond to biotic and abiotic stresses [J]. BMC Plant Biol, 2020, 20(1): 443. doi: 10.1186/s12870-020-02625-8.
- [2] LI W X, PANG S Y, LU Z G, et al. Function and mechanism of WRKY transcription factors in abiotic stress responses of plants [J]. Plants, 2020, 9(11): 1515. doi: 10.3390/plants9111515.
- [3] BAI Y L, SUNARTI S, KISSOUDIS C, et al. The role of tomato *WRKY* genes in plant responses to combined abiotic and biotic stresses [J]. Front Plant Sci, 2018, 9: 801. doi: 10.3389/fpls.2018.00801.
- [4] WANI S H, ANAND S, SINGH B, et al. WRKY transcription factors and plant defense responses: Latest discoveries and future prospects [J]. Plant Cell Rep, 2021, 40(7): 1071–1085. doi: 10.1007/s00299-021-02691-8.
- [5] SUN W J, MA Z T, CHEN H, et al. Genome-wide investigation of WRKY transcription factors in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) and their potential roles in regulating growth and development [J]. PeerJ, 2020, 8: e8727. doi: 10.7717/peerj.8727.
- [6] YANG S, CAI W W, SHEN L, et al. A CaCDPK29-CaWRKY27b module promotes CaWRKY40-mediated thermotolerance and immunity to *Ralstonia solanacearum* in pepper [J]. New Phytol, 2022, 233(4): 1843–1863. doi: 10.1111/NPH.17891.
- [7] YUAN Y, REN S Y, LIU X F, et al. SIWRKY35 positively regulates carotenoid biosynthesis by activating the MEP pathway in tomato fruit [J]. New Phytol, 2022, 234(1): 164–178. doi: 10.1111/nph.17977.
- [8] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. Trends Plant Sci, 2000, 5(5): 199–206. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01600-9.
- [9] HU W J, REN Q Y, CHEN Y L, et al. Genome-wide identification and analysis of *WRKY* gene family in maize provide insights into regulatory network in response to abiotic stresses [J]. BMC Plant Biol, 2021, 21(1): 427. doi: 10.1186/s12870-021-03206-z.
- [10] LIU J T, ZENG M J, WEN W X, et al. Cloning and drought response pattern of *CpNCED2*, a 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene from zucchini (*Cucurbita pepo* L.) [J]. J Nucl Agric Sci, 2021, 35(8): 1751–1760. [刘建汀, 曾美娟, 温文旭, 等. 西葫芦 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶 *CpNCED2* 基因的克隆及其干旱响应模式研究 [J]. 核农学报, 2021, 35(8): 1751–1760. doi: 10.11869/j.issn.100-8551.2021.08.1751.]
- [11] LIU J T, WANG B, LI Y P, et al. RNA sequencing analysis of low temperature and low light intensity-responsive transcriptomes of zucchini (*Cucurbita pepo* L.) [J]. Sci Hort, 2020, 265: 109263. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109263.
- [12] HU Q, AO C W, WANG X R, et al. *GhWRKY1-like*, a WRKY transcription factor, mediates drought tolerance in *Arabidopsis* via modulating ABA biosynthesis [J]. BMC Plant Biol, 2021, 21(1): 458. doi: 10.1186/S12870-021-03238-5.
- [13] NEGI N, KHURANA P. A salicylic acid inducible mulberry WRKY transcription factor, *MiWRKY53* is involved in plant defence response [J]. Plant Cell Rep, 2021, 40(11): 2151–2171. doi: 10.1007/s00299-021-02710-8.
- [14] YIN W C, WANG X H, LIU H, et al. Overexpression of *VqWRKY31* enhances powdery mildew resistance in grapevine by promoting salicylic acid signaling and specific metabolite synthesis [J]. Hort Res, 2022, 9: uhab064. doi: 10.1093/HR/UHAB064.
- [15] LEE F C, YEAP W C, APPLETON D R, et al. Identification of drought responsive *Elaeis guineensis* WRKY transcription factors with sensitivity to other abiotic stresses and hormone treatments [J]. BMC Genom, 2022, 23(1): 164. doi: 10.1186/S12864-022-08378-Y.
- [16] CHENG S Y, LIU X M, LIAO Y L, et al. Genome-wide identification of *WRKY* family genes and analysis of their expression in response to abiotic stress in *Ginkgo biloba* L. [J]. Not Bot Hort Agrob, 2019, 47(4): 1100–1115. doi: 10.15835/nbha47411651.
- [17] GOYAL P, MANZOOR M M, VISHWAKARMA R A, et al. A comprehensive transcriptome-wide identification and screening of *WRKY* gene family engaged in abiotic stress in *Glycyrrhiza glabra* [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 373. doi: 10.1038/s41598-019-57232-x.
- [18] GOVARDHANA M, KUMUDINI B S. *In-silico* analysis of cucumber (*Cucumis sativus* L.) genome for *WRKY* transcription factors and cis-acting elements [J]. Comput Biol Chem, 2020, 85: 107212. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2020.107212.
- [19] GULZAR F, FU J Y, ZHU C Y, et al. Maize WRKY transcription factor *ZmWRKY79* positively regulates drought tolerance through elevating ABA biosynthesis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 10080. doi: 10.3390/ijms221810080.
- [20] ZHANG Y, YU H J, YANG X Y, et al. CsWRKY46, a WRKY transcription factor from cucumber, confers cold resistance in transgenic plant by regulating a set of cold-stress responsive genes in an ABA-dependent manner [J]. Plant Physiol Biochem, 2016, 108: 478–487. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.08.013.
- [21] HUANG Z, GUO H D, LIU L, et al. Heterologous expression of dehydration-inducible *MjWRKY17* of *Myrothamnus flabellifolia* confers drought and salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(13): 4603. doi: 10.3390/ijms21134603.
- [22] WANG Y X, MENG Q W, MA N N. Characterization and analysis of some chilling-response WRKY transcription factors in tomato [J]. Plant Physiol J, 2021, 57(6): 1349–1362. [王艺璇, 孟庆伟, 马娜娜. 番茄

- 低温响应 WRKY 转录因子的鉴定和分析 [J]. 植物生理学报, 2021, 57(6): 1349–1362. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2020.0523.]
- [23] LIU J T, ZHU H S, WEN Q F, et al. Cloning and expression analysis of transcription factor *LcWRKY21* gene from *Luffa cylindrica* [J]. Chin J Cell Biol, 2017, 39(10): 1268–1278. [刘建汀, 朱海生, 温庆放, 等. 丝瓜 *LcWRKY21* 转录因子基因的克隆与表达分析 [J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(10): 1268–1278. doi: 10.11844/cjcb.2017.010.0178.]
- [24] LIU J T, ZHU H S, WANG B, et al. Isolation of *CpActin* gene from *Cucurbita pepo* L. and its preliminary application as an internal standard [J]. J Plant Genet Resour, 2019, 20(1): 188–198. [刘建汀, 朱海生, 王彬, 等. 西葫芦 *CpActin* 内参基因的分离及其作为内参基因的初步应用 [J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(1): 188–198. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.20180607001.]
- [25] MONTERO-PAU J, BLANCA J, BOMBARELY A, et al. *De novo* assembly of the zucchini genome reveals a whole-genome duplication associated with the origin of the *Cucurbita* genus [J]. Plant Biotechnol J, 2018, 16(6): 1161–1171. doi: 10.1111/pbi.12860.
- [26] ERPEN L, DEVI H S, GROSSER J W, et al. Potential use of the DREB/ERF, MYB, NAC and WRKY transcription factors to improve abiotic and biotic stress in transgenic plant [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2018, 132(1): 1–25. doi: 10.1007/s11240-017-1320-6.
- [27] ZHOU J, ZENG M Y, AN X M. Identification of *Populus trichocarpa* WRKY gene family and its' response to drought stress [J]. Chin J Cell Biol, 2019, 41(11): 2160–2173. [周静, 曾玫艳, 安新民. 杨树 WRKY 基因家族鉴定及其干旱胁迫响应模式分析 [J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(11): 2160–2173. doi: 10.11844/cjcb.2019.11.0012.]
- [28] ZHENG J J, ZHANG Z L, TONG T, et al. Genome-wide identification of WRKY gene family and expression analysis under abiotic stress in barley [J]. Agronomy, 2021, 11(3): 521. doi: 10.3390/agronomy11030521.
- [29] WEN F, WU X Z, LI T J, et al. Characterization of the WRKY gene family in *Akebia trifoliata* and their response to *Colletotrichum acutatum* [J]. BMC Plant Biol, 2022, 22(1): 115. doi: 10.1186/S12870-022-03511-1.
- [30] GARRIDO-GALA J, HIGUERA J J, RODRÍGUEZ-FRANCO A, et al. A comprehensive study of the WRKY Transcription factor family in strawberry [J]. Plants, 2022, 11(12): 1585. doi: 10.3390/plants11121585.
- [31] QIN Y, YU H X, CHENG S Y, et al. Genome-aide analysis of the WRKY gene family in *Malus domestica* and the role of *MdWRKY70L* in response to drought and salt stresses [J]. Genes, 2022, 13(6): 1068. doi: 10.3390/genes13061068.
- [32] REBOLEDO G, AGORIO A, DE LEÓN I P. Moss transcription factors regulating development and defense responses to stress [J]. J Exp Bot, 2022, 73(13): 4546–4561. doi: 10.1093/jxb/erac055.
- [33] LIU J J, WANG X M, MA L, et al. Isolation, identification, and response to abiotic stress of *MsWRKY42* gene from *Medicago sativa* L. [J]. Sci Agric Sin, 2020, 53(17): 3455–3466. [刘佼佼, 王学敏, 马琳, 等. 紫花苜蓿 *MsWRKY42* 的分离、鉴定及其对非生物胁迫的响应 [J]. 中国农业科学, 2020, 53(17): 3455–3466. doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.17.004.]
- [34] ZHANG T T, XU Y, DING Y D, et al. Identification and expression analysis of WRKY gene family in response to abiotic stress in *Dendrobium catenatum* [J]. Front Genet, 2022, 13: 800019. doi: 10.3389/fgene.2022.800019.
- [35] JAVED T, ZHOU J R, LI J, et al. Identification and expression profiling of WRKY family genes in sugarcane in response to bacterial pathogen infection and nitrogen implantation dosage [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 917953. doi: 10.3389/fpls.2022.917953.
- [36] YAN L, LIU Z Q, XU Y H, et al. Auto- and cross-repression of three *Arabidopsis* WRKY transcription factors WRKY18, WRKY40, and WRKY60 negatively involved in ABA signaling [J]. J Plant Growth Regul, 2013, 32(2): 399–416. doi: 10.1007/s00344-012-9310-8.
- [37] LIN L K, YUAN K L, HUANG Y D, et al. A WRKY transcription factor *PbWRKY40* from *Pyrus betulaefolia* functions positively in salt tolerance and modulating organic acid accumulation by regulating *PbVHA-B1* expression [J]. Environ Exp Bot, 2022, 196: 104782. doi: 10.1016/j.envexpbot.2022.104782.