

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.09.006

引用格式:史志福,王鑫,岳跃森,等.狼尾草WRKY基因家族全基因组鉴定与冷胁迫表达分析[J].草地学报,2026,34(9):3197—3210

SHI Zhi-fu, WANG Xin, YUE Yue-sen, et al. Genome-Wide Identification and Cold Stress Expression Analysis of the WRKY Gene Family in *Pennisetum alopecuroides*[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(9):3197—3210

狼尾草WRKY基因家族全基因组鉴定与冷胁迫表达分析

史志福^{1,2}, 王鑫², 岳跃森², 滕珂², 周伟², 刘凌云², 袁苏凡²,
范希峰^{2*}, 穆娜^{2*}

(1. 北京农学院, 北京 102206; 2. 北京市农林科学院草业花卉与景观生态研究所, 北京 100097)

摘要:为解析高抗寒性狼尾草(*Pennisetum alopecuroides*) WRKY 基因家族的分子特征及其在冷胁迫响应中的作用,本研究采用全基因组与转录组联合分析,对 WRKY 基因家族进行系统鉴定、进化分析及冷胁迫表达模式研究。结果表明:共鉴定出 104 个含完整 WRKY 结构域的 *PaWRKY* 基因,这些基因不均匀分布于 9 条染色体;编码蛋白均为亲水蛋白,多数体外稳定性较弱,易降解。经系统进化分析,将其分为 7 个亚族,Ⅱc 亚族成员最多,共预测 10 个核心保守基序;该家族与梗稻存在广泛同源共线性关系。*PaWRKY* 基因启动子区富集大量逆境与激素响应顺式作用元件。转录组数据表明,8 个 *PaWRKY* 基因在冷胁迫下出现差异表达,其中 4 个上调,4 个下调,且均含有茉莉酸甲酯响应元件。本研究明确了狼尾草 WRKY 家族的分子与进化特征,筛选获得冷胁迫响应关键基因,为狼尾草抗寒分子育种及黍亚科 WRKY 家族进化研究提供理论依据。

关键词:狼尾草;WRKY 基因家族;冷胁迫;差异表达

中图分类号:S543.9

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)09-3197-14

Genome-Wide Identification and Cold Stress Expression Analysis of the WRKY Gene Family in *Pennisetum alopecuroides*

SHI Zhi-fu^{1,2}, WANG Xin², YUE Yue-sen², TENG Ke², ZHOU Le², LIU Ling-yun²,
YUAN Su-fan², FAN Xi-feng^{2*}, MU Na^{2*}

(1. Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. Institute of Grassland, Flowers and Landscape Ecology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: To clarify the molecular characteristics of the WRKY gene family in highly cold-resistant *Pennisetum alopecuroides* and their functions in cold stress response, in this study we conducted systematic identification, phylogenetic analysis and cold stress-related expression pattern analysis of the WRKY gene family via combined genome-wide and transcriptome analyses. The results showed that a total of 104 *PaWRKY* genes with complete WRKY domains were identified, which were unevenly distributed on nine chromosomes. All the encoded proteins were hydrophilic, and most of them had poor *in vitro* stability and were susceptible to degradation. Based on phylogenetic analysis, the taxa were divided into seven subtribes, and Subtribe IIc comprises the most members, and ten core conserved motifs were predicted in total. Extensive homologous collinearity was found between this gene family and *Oryza sativa* subsp. *japonica*. The promoter regions of *PaWRKY* genes were enriched with numerous cis-acting elements responsive to abiotic stresses and phytohormones. Transcriptome data revealed that eight *PaWRKY* genes were differentially expressed under cold stress, including four upregulated and four downregulated genes, all of which harbored MeJA-responsive elements. This study clarified the

收稿日期:2026-03-11;修回日期:2026-04-15

作者简介:史志福(2001-),男,汉族,河北邯郸人,硕士研究生,主要从事狼尾草育种研究,E-mail:3405966520@qq.com; *通信作者
Author for correspondence E-mail: fanxifeng@baafs.net.cn; muna@baafs.net.cn

molecular and evolutionary characteristics of the WRKY gene family in *Pennisetum alopecuroides* and screened out key cold stress-responsive genes, which laid a theoretical foundation for cold-tolerant molecular breeding of *Pennisetum alopecuroides* and evolutionary research of the WRKY gene family in Panicoideae.

Key words: *Pennisetum alopecuroides*; WRKY gene family; Cold stress; Differential expression

狼尾草属(*Pennisetum*)植物隶属禾本科(Poaceae)黍亚科(Panicoideae),该属植物多为一年生或多年生草本,在热带、亚热带及温带区域均有广泛分布。象草(*P. purpureum*)、美洲狼尾草(*P. glaucum*)及其杂交种是目前产量最高的禾本科饲草,在热带和亚热带地区广泛应用于畜牧业^[1],但因其不抗寒,在我国北方地区难以应用。由北京市农林科学院草业花卉与景观生态研究所选育的优良品种‘丽秋’狼尾草(国S-BV-PA-007-2021. *P. alopecuroides* ‘Liqu’),在北京地区能安全越冬,成活率100%^[1-2],但产量和品质不及象草和美洲狼尾草。筛选抗寒狼尾草中参与冷胁迫响应的基因,并将其导入象草、美洲狼尾草等品种,培育出高产耐寒的狼尾草新品种,是我国未来狼尾草育种工作的重点之一。然而,目前关于挖掘狼尾草中抗寒基因的研究尚未报道,限制了研究进程^[3]。

WRKY 基因家族是植物特有的核心转录因子家族,能够特异性识别并结合下游基因启动子区域的 W-box 元件,进而在植物生长发育、逆境胁迫应答、次生代谢调控等诸多生物学过程中发挥精准调控作用,该家族基因功能兼具高度保守性与物种特异性。在生长发育调控方面,WRKY 基因通过整合内源年龄信号与植物激素通路,精准调控器官发育与衰老进程^[4-5]。在逆境响应过程中,WRKY 基因主要依托脱落酸(Absciscic acid, ABA),钙离子(Ca^{2+}),氧化应激等信号通路为核心位点,介导植株对于旱、低温、高盐等非生物胁迫的抗性^[6-8]。

WRKY 转录因子于1994年首次从甘薯(*Ipomoea batatas*)中克隆得到,其命名源于蛋白N端具有高度保守的WRKYGQK氨基酸基序(motif)^[9]。WRKY 蛋白通常含1~2个WRKY结构域及C端锌指结构(C2H2型或C2HC型)^[10-11]。依据WRKY结构域数量与锌指结构类型,WRKY家族可分为三大类:Ⅰ类含有2个WRKY结构域和C2H2型锌指结构,Ⅱ类仅含1个WRKY结构域与C2H2型锌指结构(根据WRKY结构域外氨基酸基序的保守性,进一步划分为Ⅱa,Ⅱb,Ⅱc,Ⅱd,Ⅱe 5个亚族),Ⅲ类则具有1个WRKY结构域与C2HC型锌指结构^[12-13]。

目前,已系统研究了多个禾本科植物的WRKY基因家族:玉米(*Zea mays*)基因组中鉴定出136个WRKY基因,该家族成员在应对生物与非生物胁迫的抗逆防御反应中发挥差异化调控功能^[14],有研究表明,过表达玉米 *ZmWRKY79* 可显著提升植株耐旱性,且该基因通过不依赖 *ZmNCED3* 的方式,结合 *ZmAAO3* 启动子 W-box 激活其表达以促进ABA合成,同时调控活性氧(Reactive oxygen species, ROS)清除、气孔关闭和侧根生长,还可协同调控茉莉酸(Jasmonic acid, JA)合成^[15]。高粱(*Sorghum bicolor*)中含有94个WRKY基因,多数成员响应干旱胁迫并在根中高表达^[16],且有研究表明,过表达 *SbWRKY50* 显著增加侧根数量与长度,敲除则导致侧根减少、变短。*SbWRKY50* 通过直接抑制乙烯合成基因 *SbACS1/2/7* 表达,并招募PRC1复合体,进而介导组蛋白H2A单泛素化修饰,促进侧根形成,从而增强高粱的抗旱性并提升干旱条件下的产量^[17]。这些研究表明,在禾本科植物中,WRKY基因家族具有保守的结构特征与多样化的功能,但其进化规律与功能分化仍需进一步探索。

本研究以‘丽秋’狼尾草为材料,结合生物信息与分子生物学技术,系统分析WRKY基因家族的特性,旨在鉴定狼尾草WRKY基因家族成员,解析其理化性质、基因结构与保守基序,构建狼尾草与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)WRKY基因的系统进化树,明确亚族分类与进化关系,分析WRKY基因在冷处理下的差异表达。研究结果可为狼尾草WRKY基因功能验证提供候选基因,也为禾本科植物WRKY基因家族进化研究补充数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验选取6株生长状态均一、无病虫害、无机械损伤的第二年生‘丽秋’狼尾草植株作为供试材料,狼尾草为多年生草本植物,第二年生植株根系已较为粗壮,生长势稳定,能更好地响应环境胁迫处理,确保实验结果的可靠性与重复性。

对6株供试植株统一进行刈割处理,刈割时保留基部10 cm左右老茬,便于后续新生芽萌发,刈割工具经无菌处理,避免伤口感染影响植株生长。刈割后将植株随机分为两组,每组3株,分别进行不同环境处理。实验组(编号 L_4, L_5, L_6)刈割后置于冬季自然环境条件下进行冷处理,地下平均温度 12°C ,12 h光照/12 h黑暗节律与60%~70%相对湿度。对照组(编号 L_{10}, L_{11}, L_{12})刈割后置于温室环境中培养,温室平均温度控制在 30°C ,参照狼尾草适宜生长的温室条件,调控光照时长为12小时,相对湿度不低于40%,提供充足且稳定的生长条件,作为非低温胁迫的对照基准。

冷处理持续16天,结束后立即对植株进行取样,对照组与实验组取样条件保持一致。选取各植株种茎基部萌发的健壮新生芽(剔除枯萎、弱小芽体),取样时用无菌水快速冲洗芽体表面杂质,吸水纸吸干后立即放入液氮中速冻,随后置于 -80°C 冰箱保存,用于后续转录组测序分析。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组数据获取与初步筛选 ‘丽秋’狼尾草全基因组测序数据由北京市农林科学院草业花卉与景观生态研究所提供,已上传NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/952524>)。基因组大小约845.71 MB^[18]。从基因组数据中提取所有预测的蛋白质序列,构建本地蛋白数据库。从Pfam数据库(<http://pfam.xfam.org/>)下载WRKY结构域(PF03106)的隐马尔可夫模型(HMM)文件,使用TBtools软件对本地蛋白数据库进行检索($E\text{-value} < 1e-5$),获取含WRKY结构域的候选蛋白^[19]。同时,以拟南芥、玉米、粳稻(*Oryza sativa* subsp. japonica)的氨基酸序列为查询序列,通过TBtools软件的BLASTP程序对本地数据库进行检索($E\text{-value} < 1e-5$, $\text{identity} > 30\%$),补充候选蛋白^[20]。将通过上述两步获得的候选蛋白序列提交至NCBI的CD-search在线分析工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)与InterPro(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>),验证是否含完整WRKY结构域(WRKY核心序列及锌指结构)。删除无WRKY结构域或结构域不完整的序列,合并重复序列,最终确定狼尾草WRKY基因家族成员。

本研究中,玉米、粳稻与拟南芥的WRKY蛋白

序列从PlantTFDB(<https://planttfdb.gao-lab.org>)下载,用于系统进化分析^[21]。拟南芥(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000001735.4/)与粳稻(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_001433935.1/)的全基因组序列从NCBI下载。

1.2.2 理化性质分析 采用TBtools软件对狼尾草WRKY基因家族蛋白的理化性质进行系统分析,具体检测指标包括氨基酸数量(Number of amino acids)、分子量(Molecular weight)、理论等电点(Theoretical pI)、不稳定指数(Instability index, II, $II < 40$ 为稳定蛋白, $II > 40$ 为不稳定蛋白^[22])、脂溶系数(Aliphatic index)及亲水性平均值(Grand average of hydropathicity, GRAVY, $\text{GRAVY} < 0$ 为亲水蛋白^[23])。数据统计工作通过Excel 2021软件完成。

1.2.3 系统进化分析 从NCBI数据库中下载拟南芥WRKY基因家族98个成员的蛋白序列,利用MEGA 12软件开展多序列比对分析。比对参数设置如下:空位开启罚分(Gap Opening Penalty)为10,空位延伸罚分(Gap Extension Penalty)为0.2,蛋白权重矩阵选用BLOSUM62。基于比对结果,采用最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建系统进化树,模型/方法选择JTT+G+I,自举检验(Bootstrap)重复次数设为1000次,缺失数据与空位处理方式采用部分缺失法(Partial deletion),位点覆盖度阈值为95%。随后通过iTOL在线平台对进化树进行可视化美化^[24-25],参照拟南芥WRKY基因家族的亚族分类标准,明确目标基因PaWRKY的亚族归属。

1.2.4 保守结构域分析 利用MEME在线分析平台(<http://meme-suite.org/>)对狼尾草WRKY基因家族蛋白进行保守基序预测,设定基序数量为10个^[26]。并采用TBtools软件完成保守基序结果的可视化绘图,进而解析不同亚族的基序组成特征。

1.2.5 启动子顺式作用元件分析 利用TBtools软件,从狼尾草基因组GFF注释文件中提取PaWRKY家族基因的染色体(Chromosome, Chr)定位信息,精准截取各基因转录起始位点(ATG)上游2000 bp的启动子序列,将所得序列上传至PlantCARE在线分析平台(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行顺式作用元件预测,后续对预测结果中的各类顺式作用元件开展数量统计、分类整理及针对性筛选^[27]。

1.2.6 染色体定位及共线性分析 利用 TBtools 软件的 MCSanX 共线性分析模块,对狼尾草与拟南芥和梗稻的 WRKY 家族基因数据及基因组注释文件进行整合分析,明确狼尾草 WRKY 家族基因的染色体分布密度与染色体定位特征,并系统鉴定和分析狼尾草与拟南芥和梗稻的共线性关系。

1.2.7 冷胁迫差异表达与组织特异性分析 取经 5% 次氯酸钠消毒的种子播撒于育苗盆中,置于人工气候室培养,培养条件设定为:温度 35℃,光周期 16 h 光照/8 h 黑暗,相对湿度保持适宜水平。分别采集 3 月龄健康植株的叶片、根系(主根及侧根,洗净表面附着泥土后用无菌滤纸吸干水分)、穗(长度 5~8 cm)、茎,以及发芽后 14 天的幼苗(无真叶,保留胚轴与胚根),各组织样品均设置 3 次生物学重复,采集后立即置于液氮中速冻,随后转移至 -80℃ 冰箱低温保存备用,用于后续组织特异性表达分析。

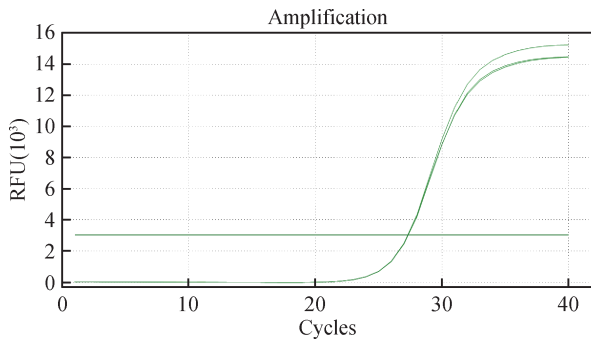


图1 内参基因的 qPCR 扩增曲线

Fig. 1 qPCR amplification curves of the reference gene

依据转录组数据,绘制冷胁迫差异表达热图,对差异表达的基因进行组织特异性分析,以 *PaWRKY* 基因完整编码序列(Coding sequence, CDS)为基础,用 Premier 5.0 设计特异性引物,参数设定为长度 20 bp,退火温度 59℃,预期 PCR 产物 150~250 bp,内参基因根据水稻泛素基因 *UBQ6* (LOC_Os05g06770.1) 的蛋白序列进行同源比对,从狼尾草基因组中筛选获得表达稳定的 *Pal02G022030* 基因(蛋白相似度 93.02%)作为内参,用于校正实时荧光定量 PCR 中的表达量偏差^[28]。*Pal02G022030* 含有两个 UBQ 结构域,为狼尾草泛素基因。内

参基因扩增曲线呈典型 S 形,循环阈值为 27~28,重复性好,可用于后续目的基因的相对定量分析(图 1)。采用普通 PCR 结合 1.5% 琼脂糖凝胶电泳验证引物特异性。每个样本设 3 次生物学重复和 3 次技术重复,以无菌水为阴性对照。基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算,经 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析及 Duncan 氏多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 WRKY 基因家族成员的鉴定与定位

通过隐马尔可夫模型检索与 BLASTP 同源比对,共获得 107 个含 WRKY 保守结构域的狼尾草候选蛋白,经 NCBI CD-search 与 InterPro 验证剔除 3 个无完整 WRKY 结构域序列,最终鉴定出 104 个 WRKY 基因家族成员。该家族成员均定位于 9 条染色体上,呈明显非均匀分布:Chr 03 最多(12 个),Chr 09 最少(4 个)。进一步分析发现,Chr 03 与 Chr 08 起始区段存在片段重复现象,且有 5 对 *PaWRKY* 基因家族成员的氨基酸序列完全一致(图 2)。

2.2 狼尾草 WRKY 蛋白的理化性质分析

狼尾草 WRKY 家族成员的氨基酸数量介于 125~860 个,分子量介于 13.59~97.78 kDa。有 94 个狼尾草 WRKY 蛋白的氨基酸残基数介于 200~600 之间。氨基酸数量跨度达 735,分子量跨度达 84 kDa,参数存在显著差异。狼尾草 WRKY 蛋白的理论等电点(pI)为 4.72~10.09,涵盖酸性、中性和碱性范围。86 个蛋白的理论 pI 集中在 5.0~9.0 之间,其中酸性蛋白(pI<7)59 条,碱性蛋白(pI>7)42 条。不稳定指数(II)为 37.32~90.22。仅 4 个蛋白的不稳定指数低于 40,其余 100 条均大于 40,该家族蛋白整体在体外易降解,稳定性较弱。狼尾草 WRKY 蛋白的脂溶系数为 39.42~105.78,平均 62.02。亲水性平均值为 -0.957 至 -0.09,均小于 0,所有狼尾草 WRKY 蛋白均为亲水蛋白(表 1)。

表 1 *PaWRKY* 蛋白理化性质

Table 1 Physicochemical properties of proteins in the *PaWRKY*

基因名称 Sequence ID	氨基酸数量 Number of amino acid	相对分子量 Molecular weight	理论等电点 Theoretical pI	不稳定系数 Instability index	脂溶系数 Aliphatic index	亲水性平均值 Grand average of hydropathicity
<i>Pal09G036140.1</i>	504	53 486.68	8.81	61.46	55.91	-0.787
<i>Pal09G031120.1</i>	412	44 388.79	6.09	53.60	71.33	-0.477
<i>Pal09G015790.1</i>	351	37 586.29	9.81	52.23	61.45	-0.601

续表 1

基因名称 Sequence ID	氨基酸数量 Number of amino acid	相对分子量 Molecular weight	理论等电点 Theoretical pI	不稳定系数 Instability index	脂溶系数 Aliphatic index	亲水性平均值 Grand average of hydropathicity
<i>Pal09G014400.1</i>	140	14 896.60	9.51	57.10	52.43	−0.799
<i>Pal09G014390.1</i>	125	13 591.22	9.42	43.94	54.08	−0.812
<i>Pal09G009170.1</i>	397	42 595.58	9.87	49.75	70.83	−0.454
<i>Pal09G007930.1</i>	313	32 729.26	6.26	71.91	56.87	−0.526
<i>Pal09G007830.1</i>	427	44 949.64	6.09	56.31	53.63	−0.671
<i>Pal09G005140.1</i>	406	43 059.09	9.35	50.59	69.04	−0.308
<i>Pal09G000540.1</i>	424	45 678.10	6.14	54.00	57.92	−0.514
<i>Pal08G016330.1</i>	860	97 778.80	7.03	38.76	105.78	−0.090
<i>Pal08G012080.1</i>	216	23 363.61	9.54	39.67	42.55	−0.877
<i>Pal08G000730.1</i>	283	31 865.41	6.23	48.89	69.26	−0.810
<i>Pal08G000660.1</i>	268	30 438.80	7.11	51.41	57.95	−0.788
<i>Pal07G023170.1</i>	314	32 821.35	10.09	58.21	68.85	−0.362
<i>Pal07G022560.1</i>	472	49 238.95	5.27	50.78	57.58	−0.471
<i>Pal07G019100.1</i>	238	25 838.14	8.56	37.32	57.06	−0.52
<i>Pal07G013810.1</i>	690	73 869.69	8.46	47.80	59.97	−0.669
<i>Pal07G004310.1</i>	329	34 778.08	9.65	57.11	57.90	−0.609
<i>Pal06G021290.1</i>	453	49 551.20	8.34	49.19	80.57	−0.355
<i>Pal06G019450.1</i>	704	76 756.23	5.41	62.89	61.95	−0.662
<i>Pal06G012990.1</i>	351	36 703.85	6.38	58.44	65.58	−0.358
<i>Pal06G010670.1</i>	571	61 953.43	6.05	53.85	60.46	−0.780
<i>Pal06G008940.1</i>	329	33 831.31	9.96	58.77	66.69	−0.371
<i>Pal06G007310.1</i>	809	91 639.40	6.01	52.06	80.31	−0.449
<i>Pal06G007300.1</i>	795	90 156.21	6.06	46.23	85.52	−0.356
<i>Pal05G038310.1</i>	339	35 619.59	5.52	64.03	59.53	−0.565
<i>Pal05G037060.1</i>	554	59 114.37	6.57	67.41	39.42	−0.840
<i>Pal05G036710.1</i>	303	32 476.19	6.05	59.99	59.14	−0.499
<i>Pal05G036700.1</i>	333	35 679.08	6.33	55.40	64.92	−0.446
<i>Pal05G036690.1</i>	343	36 550.50	5.77	52.57	58.95	−0.495
<i>Pal05G036680.1</i>	267	29 805.67	5.45	67.13	43.56	−0.841
<i>Pal05G036670.1</i>	237	26 668.03	6.82	52.24	66.33	−0.542
<i>Pal05G032290.1</i>	308	33 946.25	4.72	90.22	53.28	−0.938
<i>Pal05G031150.1</i>	259	27 398.72	7.71	56.33	67.80	−0.545
<i>Pal05G030950.1</i>	307	31 665.92	5.01	53.19	55.41	−0.492
<i>Pal05G029870.1</i>	234	25 195.31	7.68	52.12	59.70	−0.356
<i>Pal05G026660.1</i>	427	44 978.18	9.69	68.12	51.33	−0.830
<i>Pal05G026110.1</i>	330	34 799.79	6.06	54.21	58.36	−0.482
<i>Pal05G024490.1</i>	365	39 188.47	6.54	58.67	49.23	−0.798
<i>Pal05G024400.1</i>	374	39 540.24	6.11	52.37	62.86	−0.559
<i>Pal05G021810.1</i>	329	33 554.96	8.99	39.94	73.50	−0.202
<i>Pal05G021670.1</i>	263	27 757.47	5.45	53.82	63.92	−0.506
<i>Pal05G014300.1</i>	583	60 634.39	7.83	46.74	63.36	−0.494
<i>Pal05G003030.1</i>	248	26 094.93	6.94	67.77	46.29	−0.503
<i>Pal05G003020.1</i>	502	51 626.53	6.57	45.78	68.45	−0.335
<i>Pal05G002720.1</i>	268	28 636.08	9.66	47.18	55.45	−0.610
<i>Pal05G000070.1</i>	447	46 766.37	6.83	62.82	68.08	−0.432
<i>Pal04G038220.1</i>	322	35 036.74	9.47	59.43	72.24	−0.614
<i>Pal04G032150.1</i>	395	41 749.29	5.83	60.98	52.71	−0.703
<i>Pal04G021050.1</i>	370	39 217.04	6.18	51.86	52.97	−0.632
<i>Pal04G020170.1</i>	619	65 023.87	7.03	48.19	58.66	−0.557
<i>Pal04G016550.1</i>	342	34 817.29	5.74	43.29	65.18	−0.267
<i>Pal04G015780.1</i>	218	23 650.08	8.78	63.14	40.00	−0.794

续表 1

基因名称 Sequence ID	氨基酸数量 Number of amino acid	相对分子量 Molecular weight	理论等电点 Theoretical pI	不稳定系数 Instability index	脂溶系数 Aliphatic index	亲水性平均值 Grand average of hydropathicity
<i>Pal03G040200.1</i>	339	36 236.04	9.88	60.49	61.98	-0.577
<i>Pal03G037160.1</i>	569	64 463.10	8.20	48.66	82.97	-0.548
<i>Pal03G037140.1</i>	500	56 762.76	7.91	42.59	87.16	-0.471
<i>Pal03G035350.1</i>	491	52 171.45	8.16	56.10	56.76	-0.757
<i>Pal03G029700.1</i>	416	44 355.80	7.29	55.17	65.12	-0.431
<i>Pal03G029690.1</i>	310	33 030.45	5.94	47.56	60.94	-0.615
<i>Pal03G029210.1</i>	483	51 258.47	7.65	53.98	52.44	-0.727
<i>Pal03G021890.1</i>	563	59 315.92	5.57	53.69	48.63	-0.597
<i>Pal03G021630.1</i>	141	15 866.71	4.85	49.37	66.45	-0.538
<i>Pal03G021620.1</i>	278	30 846.39	6.34	62.30	63.60	-0.719
<i>Pal03G021610.1</i>	291	31 858.45	4.98	58.72	62.82	-0.565
<i>Pal03G018450.1</i>	225	23 831.99	9.15	43.03	74.22	-0.403
<i>Pal03G017940.1</i>	223	22 971.20	7.81	55.11	52.29	-0.432
<i>Pal03G015980.1</i>	411	43 702.26	6.22	42.94	52.21	-0.613
<i>Pal03G015860.1</i>	595	61 634.08	6.45	50.49	66.25	-0.424
<i>Pal03G015540.1</i>	295	31 428.95	5.67	53.51	65.66	-0.512
<i>Pal03G014680.1</i>	310	33 085.60	6.22	58.59	57.48	-0.697
<i>Pal03G014650.1</i>	351	37 632.83	5.19	54.43	67.07	-0.554
<i>Pal03G012660.1</i>	207	22 120.29	6.72	57.38	47.25	-0.576
<i>Pal03G009860.1</i>	511	52 596.34	6.66	51.28	61.84	-0.441
<i>Pal03G000820.1</i>	295	32 154.36	4.97	64.37	59.90	-0.686
<i>Pal08G000740.1</i>	295	32 138.36	4.97	65.02	60.58	-0.676
<i>Pal03G000810.1</i>	289	32 480.09	6.23	49.60	71.52	-0.772
<i>Pal03G000790.1</i>	288	32 726.16	6.80	70.92	59.31	-0.957
<i>Pal08G000710.1</i>	288	32 683.09	6.62	69.03	59.31	-0.935
<i>Pal03G000780.1</i>	267	30 233.17	6.45	45.46	80.67	-0.564
<i>Pal08G000700.1</i>	267	30 249.19	6.30	43.82	80.67	-0.578
<i>Pal03G000760.1</i>	250	28 507.15	7.21	46.34	70.92	-0.647
<i>Pal08G000690.1</i>	250	28 563.12	7.22	47.85	69.76	-0.652
<i>Pal03G000750.1</i>	223	25 093.74	9.22	49.52	44.66	-0.861
<i>Pal08G000680.1</i>	223	25 093.74	9.22	49.52	44.66	-0.861
<i>Pal03G000730.1</i>	287	32 032.89	5.46	41.27	66.03	-0.487
<i>Pal03G000720.1</i>	310	33 760.06	6.12	57.78	65.23	-0.452
<i>Pal02G044680.1</i>	352	36 416.01	8.32	75.95	50.03	-0.511
<i>Pal02G038630.1</i>	598	64 024.23	6.07	52.07	62.16	-0.660
<i>Pal02G026050.1</i>	624	66 963.41	6.38	52.83	61.33	-0.527
<i>Pal02G025790.1</i>	583	62 455.95	5.85	57.87	54.77	-0.601
<i>Pal02G021910.1</i>	272	29 217.80	6.67	48.36	75.07	-0.442
<i>Pal02G021890.1</i>	296	31 657.44	8.33	54.54	64.73	-0.540
<i>Pal02G018940.1</i>	338	35 398.56	6.35	51.21	73.20	-0.293
<i>Pal02G018930.1</i>	323	34 128.92	5.48	53.69	71.08	-0.315
<i>Pal02G013330.1</i>	337	35 704.41	7.57	63.96	71.57	-0.327
<i>Pal02G000650.1</i>	363	38 419.75	5.70	53.25	66.61	-0.439
<i>Pal01G032930.1</i>	569	60 321.26	5.02	56.55	54.48	-0.744
<i>Pal01G029460.1</i>	482	49 877.72	5.78	40.07	57.66	-0.334
<i>Pal01G026860.1</i>	234	26 029.49	8.00	50.76	56.28	-0.517
<i>Pal01G015750.1</i>	298	31 622.01	9.87	57.38	47.32	-0.813
<i>Pal01G013660.1</i>	413	44 497.16	5.60	73.37	60.80	-0.557
<i>Pal01G012030.1</i>	207	22 564.63	9.42	82.85	55.22	-0.774
<i>Pal01G006470.1</i>	358	38 669.70	8.64	65.86	67.99	-0.659

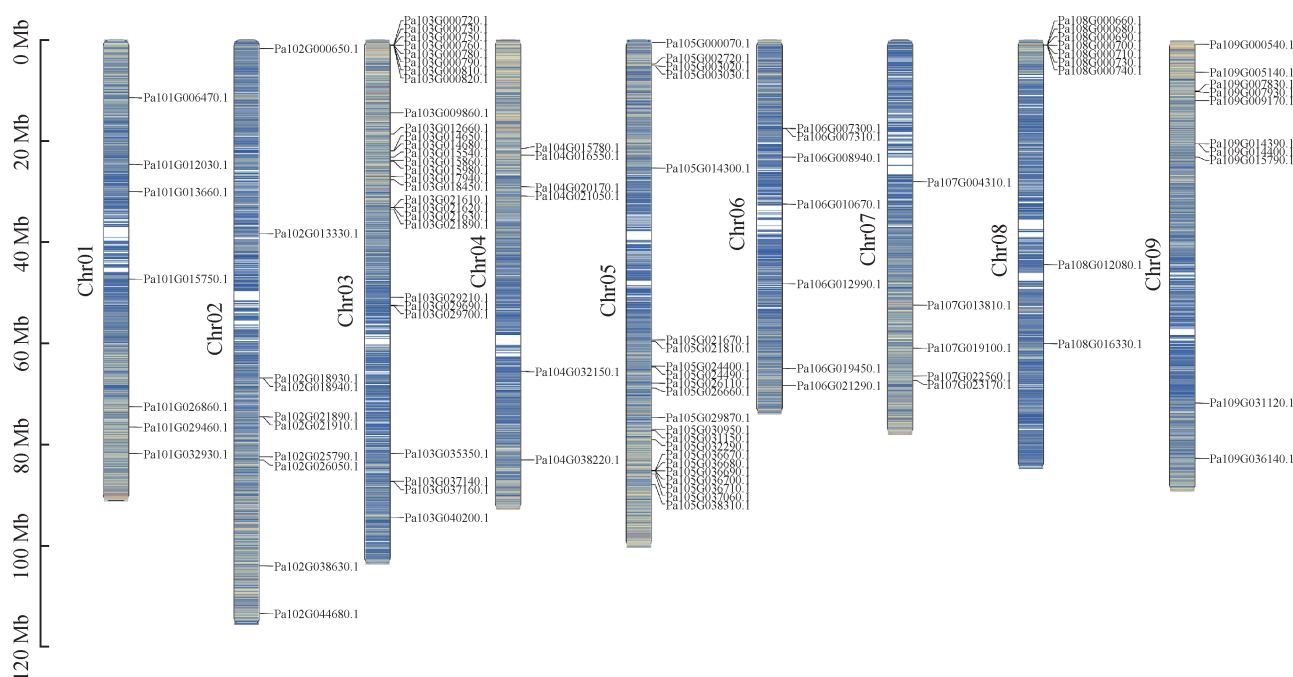
图2 *PaWRKY*基因家族染色体定位分析

Fig. 2 Chromosomal localization analysis of the *PaWRKY* gene family

2.3 WRKY 基因的系统进化分析

基于 104 个狼尾草 WRKY 与 98 个拟南芥 WRKY 蛋白的保守序列,构建 ML 系统进化树。根据拟南芥 WRKY 亚族分类标准,将狼尾草 WRKY 家族分为 7 个亚族,各亚族成员数量分别为:I 亚族 17 个、II a 亚族 12 个,IIb 亚族 7 个,IIc 亚族 23 个,II d 亚族 8 个,II e 亚族 10 个,III 亚族 27 个。其中,III 亚族成员最多,II b 亚族成员最少(图 3)。在 104 个 *Pa*WRKY 成员中,发现 7 个 I 亚族成员(*Pal03G000820*, *Pal08G000740*, *Pal06G007300*, *Pal06G007310*, *Pal06G021290*, *Pal08G016330*, *Pal01G012030*)缺失 1 个 WRKY 结构域,5 个基因(*Pal03G017940*, *Pal05G003030*, *Pal05G021670*, *Pal03G012660*,*Pal05G029870*)WRKYGQK 突变为 WRKYGKK,9 个基因(*Pal03G000750*,*Pal08G000680*, *Pal04G015780*, *Pal03G021630*, *Pal03G000730*, *Pal08G016330*, *Pal03G021620*, *Pal08G000660*, *Pal03G000720*)突变为 WRKYGEK,4 个基因(*Pal06G021290*, *Pal03G021610*, *Pal09G014400*, *Pal09G014390*)突变为 WKYGYGQK,1 个基因(*Pal02G013330*)突变为 WRKYGQR,1 个基因(*Pal03G037160*)突变为 WRKYRQK,1 个基因(*Pal08G000690*)突变为 WRKYGQM。

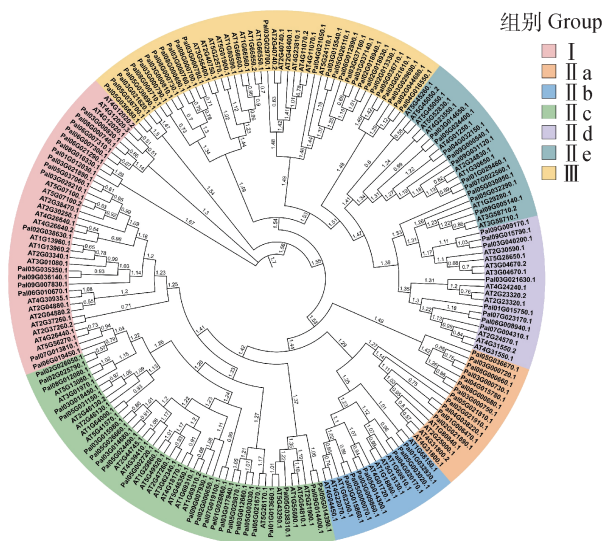
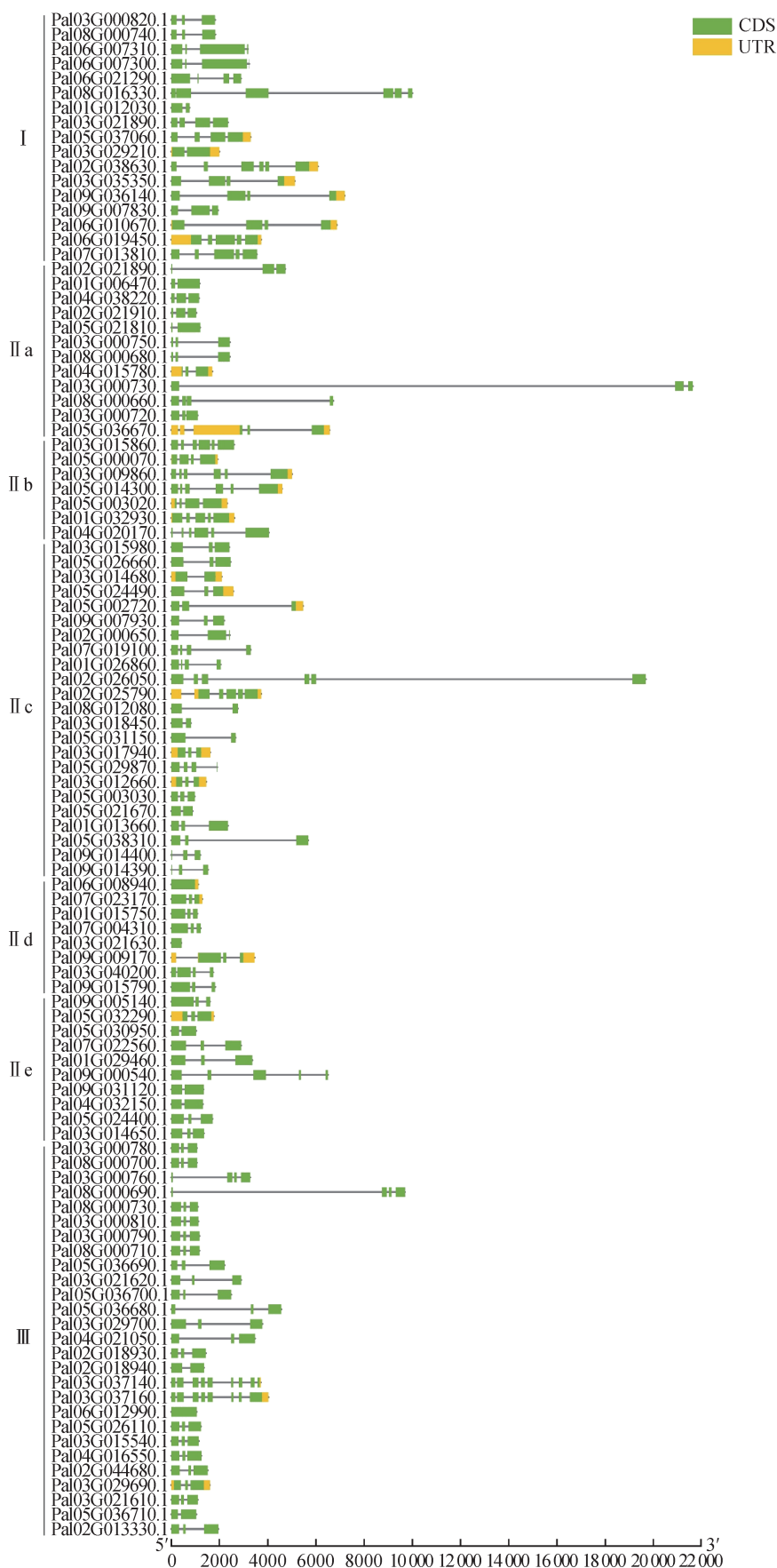


图3 狼尾草与拟南芥 WRKY 基因家族系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of WRKY gene family from *Pennis-*
etum alopecuroides and *Arabidopsis thaliana*

2.4 基因结构与保守基序分析

PaWRKY 家族基因的外显子数目为 1~9 个, 有 53 个成员含有 3 个外显子, I 亚族外显子数为 2~6 个, II 亚族外显子数为 1~6 个, III 亚族外显子数为 1~9 个。同一进化亚族中基因的外显子数量特征相对保守, 多数外显子位于基因的两端(图 4)。

图 4 *PaWRKY* 基因家族结构分析Fig. 4 Gene structure analysis of the *PaWRKY* gene family

狼尾草 WRKY 转录因子的保守基序分析结果显示,共得到 10 个保守基序(图 5),这些基序的氨基酸位置分布集中在 100~900 aa 区间。motif 1 与部分 motif 3 为 WRKY 结构域,其中 102 个 *PaWRKY* 基因均含 motif 1。IIc 亚族多数含有 motif 4, motif 1, motif 2, 而 I 亚族多含 motif 3, motif 5, IId 亚族均含有 motif 8(图 6)。

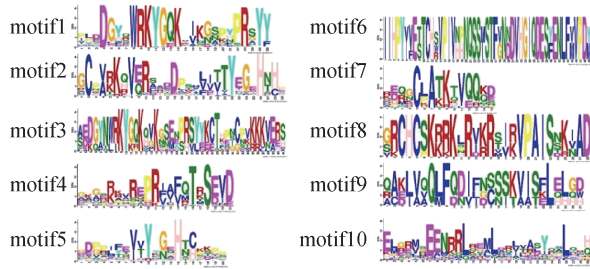


图 5 *PaWRKY* 基因保守基序 (motif 1–motif 10) 的序列 Logo 分析

Fig. 5 Sequence Logo analysis of conserved motifs (motif 1–motif 10) in *PaWRKY* genes

2.5 启动子顺式作用元件分析

对 104 个 *PaWRKY* 基因转录起始位点 5'→3' 方向上游 0~2000 bp 启动子区域进行了系统地解析,共鉴定出 40 多种具有不同功能的顺式作用调控元件。其中,光响应相关元件的占比最高,包括光响应(Light responsive element)元件、光响应模块组件(G-box, gapA-CMA1 等)以及参与光响应的 MYB 转录因子(MYB, *v*-Myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)结合位点(MYB binding site involved in light responsiveness),这暗示 *PaWRKY* 很可能通过光信号途径来调控光合作用以及光形态建成。植物激素响应元件涵盖 ABA、赤霉素(Gibberellin, GA)、生长素(Indole-3-acetic acid, IAA)、茉莉酸甲酯(Methyl jasmonate, MeJA)及水杨酸(Salicylic acid, SA)等多条信号通路,提示该基因家族极可能通过整合多种激素信号,构建出复杂的调控网络。非生物胁迫与防御响应元件包含干旱诱导性 MYB 结合位点(MYB binding site involved in drought-inducibility)、创伤(Wound-responsive element)响应元件、厌氧诱导(Anaerobic induction)必需元件、低温(Low-temperature responsiveness)响应元件及激发子(Elicitor-mediated activation)介导的激活元件,组织特异性表达元件包含分生组织特异性激活(Meristem-specific activation)、根特异性(Root specific)、胚乳/种子特异性调

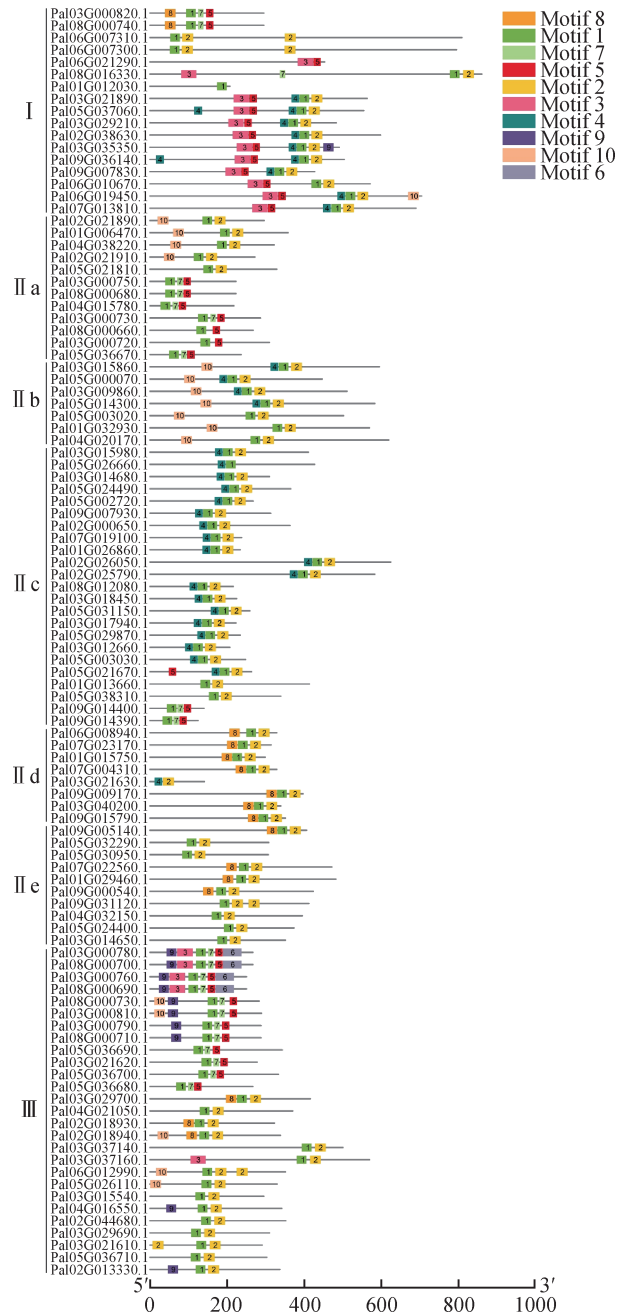


图 6 *PaWRKY* 基因保守基序分析

Fig. 6 Conserved motif analysis of *PaWRKY* genes

控(Endosperm and seed-specific regulation)及栅栏叶肉细胞分化相关元件,这些提示 *PaWRKY* 可能参与根系发育、分蘖调控及繁殖过程。另外,还鉴定到昼夜节律调控(Circadian control)及细胞周期调控(Cell cycle regulation)元件(图 7)。

2.6 共线性分析

通过对 *PaWRKY* 与拟南芥和梗稻基因组整体进行共线性分析发现, *PaWRKY* 与拟南芥的共线性关系不明显,与梗稻存在广泛又复杂的同源共线性

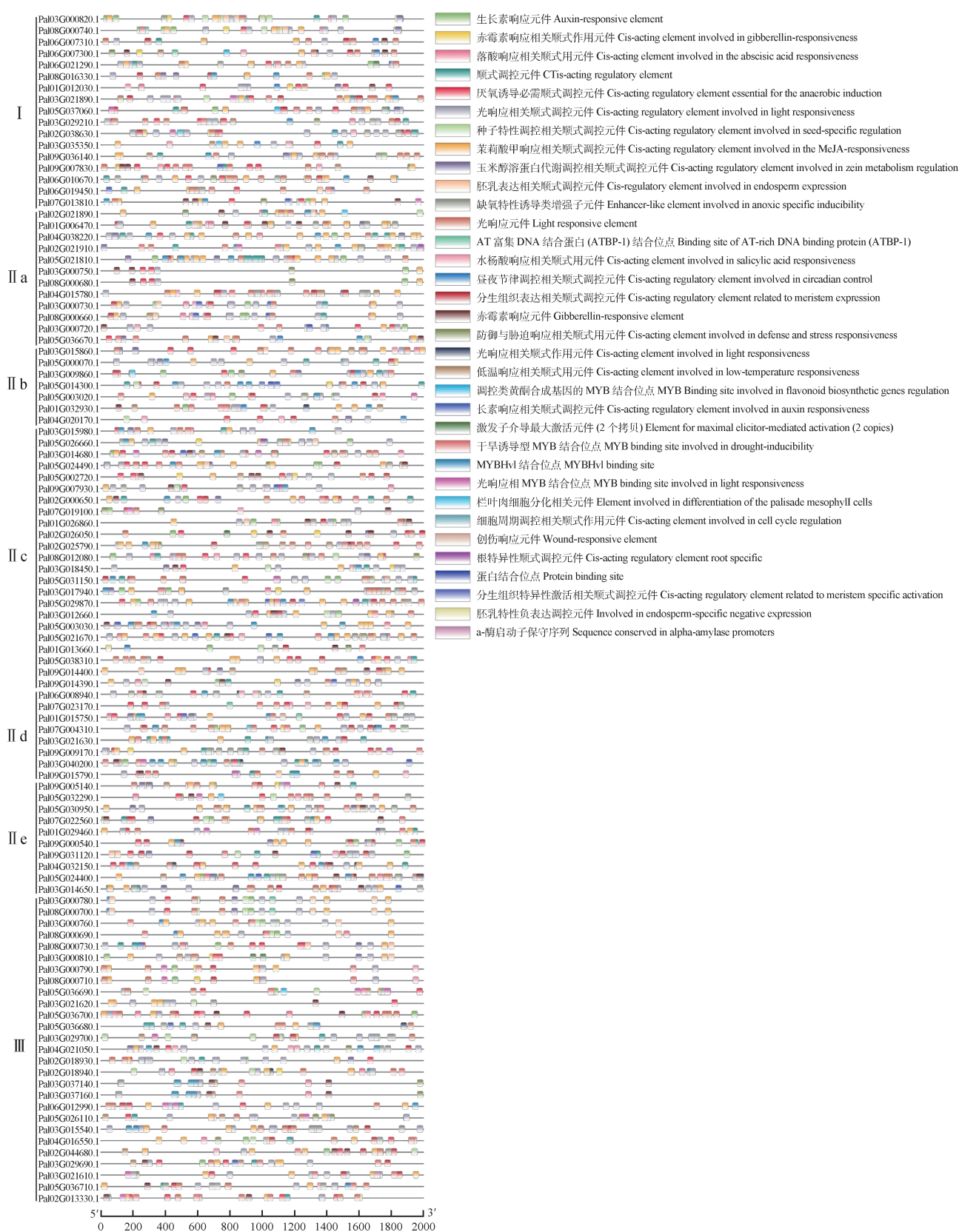


Fig. 7 *Cis*-acting element analysis of *PaWRKY* genes

关系,并且呈现出明显的多对一映射特性。从染色体层面分析能够发现,狼尾草的 Chr 03 和 Chr 05 与

梗稻 Chr 01 形成了高密度的连续共线性区块,二者之间的直系同源基因连线数量也是最多的。而梗稻

的 Chr 05 同时与狼尾草的 Chr 02, Chr 03 及 Chr 05 形成密集的共线性关联,这说明这段祖先基因组片段在狼尾草中发生了染色体水平的分散分布。通过

对基因水平分析可知,部分基因(如 *Pal01G029460*, *Pal04G016550* 及 *Pal03G014680*)同时与梗稻多条染色体上的多个位点形成共线性(图 8)。

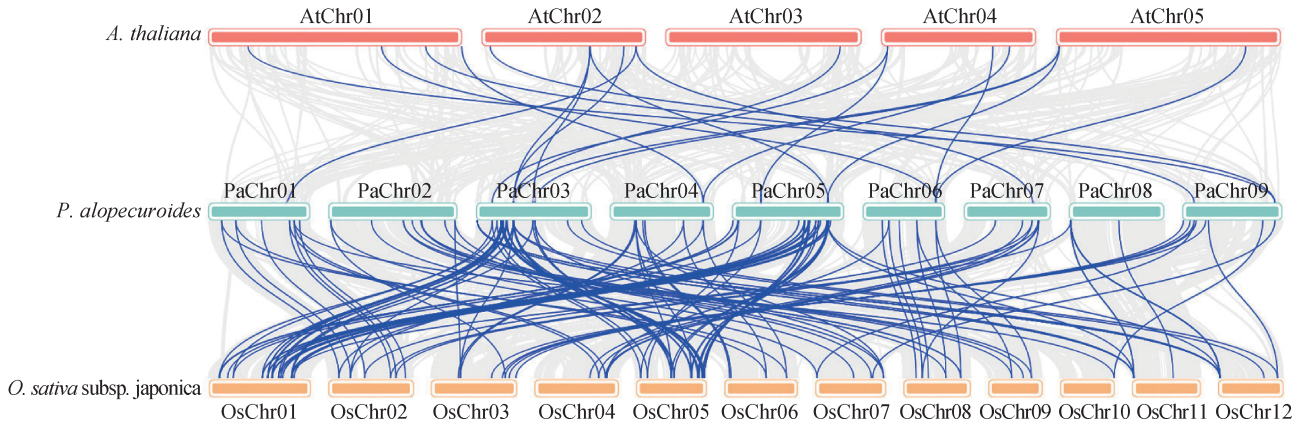


图 8 *PaWRKY* 与拟南芥和梗稻 *WRKY* 基因的共线性分析

Fig. 8 Collinearity analysis between *PaWRKY* and *WRKY* genes of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* subsp. japonica

2.7 冷胁迫差异表达与组织特异性表达分析

为筛选与抗寒有关的基因,本研究系统分析了 *PaWRKY* 基因家族在冷胁迫下的差异表达以及组织特异性表达。结果显示,在 104 个 *PaWRKY* 基因家族成员中,有 8 个差异表达基因(图 9、表 2)。其中 *Pal03G000750* 冷处理下表达量为温室条件的 4.02 倍,启动子区域含 GA 响应元件与厌氧诱导调控元件;*Pal05G000070* 是上调幅度最大的基因(冷处理下表达量是温室条件的 7.18 倍),启动子含光响应模块与分生组织相关的调控元件;*Pal05G003030* 与 *Pal05G014300* 冷处理表达量分别为温室条件的

2.24 倍和 3.17 倍,启动子均富集干旱诱导性 MYB 结合位点与光响应模块;*Pal01G026860* 与 *Pal05G038310* 温室表达量分别为冷胁迫的 3.62 倍和 4.15 倍,启动子均含分生组织表达相关的调控元件与昼夜节律控制元件;*Pal06G007300* 温室表达量为冷处理表达量的 5.75 倍,启动子含 GA 响应元件与黄酮类生物合成相关 MYB 结合位点(MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation);*Pal09G000540* 温室表达量为冷处理的 2.50 倍,启动子含有与分生组织特异性激活元件(图 10)。在 8 个差异表达基因中,均发现 MeJA 响应元件。

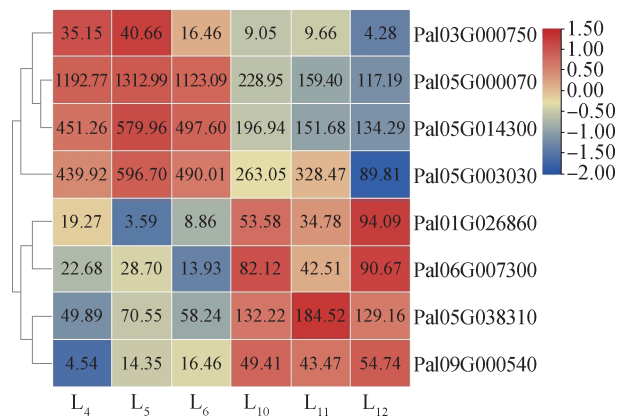


图 9 *PaWRKY* 基因冷处理下的表达差异

Fig. 9 Expression differences of *PaWRKY* genes under cold treatment

注:L₄, L₅, L₆ 为冷胁迫实验组; L₁₀, L₁₁, L₁₂ 为温室培养对照组

Note: L₄, L₅, L₆ are cold stress treatment group; L₁₀, L₁₁, L₁₂ are greenhouse cultured control group

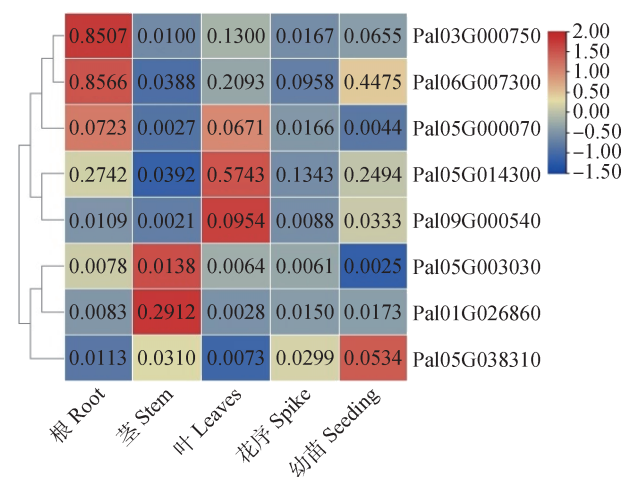


图 10 *PaWRKY* 组织特异性表达

Fig. 10 Tissue-specific expression of *PaWRKY* genes

表 2 8 个冷响应 *PaWRKY* 基因信息汇总表
Table 2 Summary of 8 cold-responsive *PaWRKY* genes

基因 ID Gene ID	转录组 log ₂ FC Transformed log ₂ fold change	转录组 <i>p</i> adj Transcriptome <i>p</i> adj	RT-qPCR 引物 RT-qPCR primer	亚家族 Subfamily	组织特异性高表达 Tissue-specific high expression
<i>Pal03G000750</i>	2.0067	$P=0.032$	F: TTCAACCATCACACCTGCAG R: ACTGAAACCGGCTTGCATAG	II a	根 Root
<i>Pal05G000070</i>	2.8411	$P<10^{-10}$	F: ACGGGCAGAAGGAGATACAA R: GAAGCTGATGAGGCGTGAG	II b	根 Root
<i>Pal05G003030</i>	1.1642	$P=0.048$	F: ATGAGCTACGCGGACGATG R: CTGCTCTTGACCGCCTTCTT	II c	茎 Stem
<i>Pal05G014300</i>	1.6604	$P<10^{-10}$	F: CAGCAGCTTCTACAGGTCAC R: CAACATCCTCAACTCCGGC	II b	叶 Leaf
<i>Pal01G026860</i>	-2.5178	$P=0.004$	F: TGCACCTCGGTGACAAAAGT R: CATCATCCAGCACATCCACG	II c	茎 Stem
<i>Pal05G038310</i>	-1.3184	$P=0.003$	F: CTACAGCCCGATGCATCTCG R: GGAGCTCGTGCACCTGTAGT	II c	苗 Seedling
<i>Pal06G007300</i>	-1.7208	$P=0.011$	F: ATAGAAAGACATATTCCAGCTCCAGC R: TCCTGTGCTTGTTCCACTAAGG	I	根 Root
<i>Pal09G000540</i>	-2.0714	$P=0.007$	F: CACCTACACAGCAGAGCACA R: ATCGAGGTCGTTGCCACTAC	II e	叶 Leaf

3 讨论

WRKY 基因家族作为植物特有的转录因子家族,其成员数量、进化特征与功能分化在禾本科不同物种中呈现出保守性与特异性,本研究鉴定出 104 个 *PaWRKY* 基因,其中 IIc 亚族为最大亚族。本研究发现同一亚族成员基序组成相似,而各亚族之间有一定差异。亚族间的基序差异是 WRKY 基因家族功能分化的重要结构基础,特异性基序的存在使其能够结合不同的下游靶基因,进而参与生长发育与逆境响应的不同调控通路^[26]。

WRKY 结构域易发生突变、缺失。玉米中有 9 个 WRKY 基因缺失 1 个 WRKY 结构域、7 个缺失锌指结构、3 个缺失 WRKY 基序^[29]。栽培花生 (*Arachis hypogaea* L.) 中 17 个 *AhWRKY* 基因 WRKY 结构域突变、13 个缺失^[30]。本研究发现,有 7 个成员仅含有 1 个 WRKY 结构域,21 个基因 WRKY 结构域发生突变,推测这些变异推动了 *PaWRKY* 家族新功能分化。

本研究初步检测到狼尾草在 Chr 03 与 Chr 08 起始区段存在片段重复现象,且未鉴定到串联重复事件,这一结果与象草 WRKY 基因家族中报道的片段重复为核心扩张驱动力、未发现串联重复的结论吻合^[31],同时与玉米 WRKY 基因家族 Chr 03 与 Chr 08 间高频发生片段重复的进化规律相呼应^[29],进一步证实片段重复是禾本科狼尾草属及近缘作物 WRKY 基因家族扩张与基因组演化的关键机制。

WRKY 转录因子在植物生长发育、非生物胁迫应答及次生代谢调控等重要生物学过程中均发挥关键调控作用^[32]。作为调控基因转录与表达的关键区域,WRKY 基因启动子上富集了多种顺式作用元件^[33]。本研究系统解析了狼尾草 WRKY 基因的启动子序列,从中鉴定出大量参与生长发育调控与逆境胁迫响应的顺式作用元件,涵盖光响应、低温应答元件,以及受 MeJA, GA, ABA, IAA, SA 等多种激素信号诱导的调控元件,表明狼尾草 WRKY 基因家族可能在调控植株生长发育、提升逆境胁迫抗性中发挥重要功能。上述结论与玉米^[29,34]、番茄 (*Solanum lycopersicum*)^[35] 等物种中的相关研究结果基本一致。

本研究发现,狼尾草冷胁迫下表达上调的 *PaWRKY* 基因,其启动子区域多富集 MeJA 响应元件与 IAA 响应元件,而表达下调的基因,其启动子则多含有 GA 响应元件 (*Pal06G007300*) 和分生组织特异性调控元件 (*Pal01G026860*, *Pal05G038310*)。已有研究证实,植物冷响应 WRKY 基因的表达调控依赖 MeJA 与 ABA 信号通路的协同调控作用,GA 信号通路则可通过拮抗调控,实现植株冷胁迫响应与生长发育的动态平衡。该研究还表明,由 MeJA, ABA 协同激活、GA 拮抗抑制 WRKY 基因的调控机制,是植物在长期进化过程中形成的适应低温胁迫的核心分子策略^[32]。其中响应冷胁迫上调的狼尾草基因 *Pal05G003030* 与玉米 *ZmWRKY48* 同源,而 *ZmWRKY48* 是玉米响应低温胁迫的关键基因。低

温诱导可使 *ZmWRKY48* 基因发生特异性可变剪切,突变体的相对生长率、根长、侧根长度及相对根表面积较野生型均显著降低 15.16%~19.87%,表明其正向调控玉米低温适应性^[36]。

本研究筛选的 8 个冷胁迫差异 *PaWRKY* 基因,其表达模式与调控特征进一步印证了禾本科植物 WRKY 基因家族在冷胁迫响应中的进化保守性与物种特异性,也为狼尾草抗寒分子育种及高产抗寒新品种培育提供了重要的基因资源与理论支撑。

4 结论

研究共鉴定出 104 个狼尾草 WRKY 基因,其在 9 条染色体上呈非均匀分布,编码蛋白均为亲水蛋白,整体体外稳定性偏低。部分基因的保守序列发生变异。基因启动子富含逆境与激素响应元件,且与粳稻 WRKY 家族成员表现出显著的共线性。冷胁迫下共检测到 8 个差异表达基因,上调和下调各 4 个,为狼尾草抗寒分子机制的进一步研究提供了重要参考。

参考文献

- [1] 侯新村,滕珂,郭强,等. 狼尾草属牧草研究进展[J]. 植物学报,2022,57(6):814-825
HOU X C, TENG K, GUO Q, et al. Research advances in forage *Pennisetum* resource [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2022, 57(6):814-825
- [2] 武菊英,滕文军,袁小环,等. 几种狼尾草属观赏植物在北京地区的生长特性[J]. 武汉植物学研究,2009,27(6):661-666
WU J Y, TENG W J, YUAN X H, et al. Evaluation of five ornamental grasses from *Pennisetum* rich. grown in Beijing[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2009, 27(6):661-666
- [3] 唐军,周汉林,王文强,等. 狼尾草属牧草育种及分子生物学研究进展[J]. 热带作物学报,2018,39(11):2313-2320
TANG J, ZHOU H L, WANG W Q, et al. Advances in breeding and molecular biology research of *Pennisetum* [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(11):2313-2320
- [4] ZHANG H Y, ZHANG L P, WU S G, et al. AtWRKY75 positively regulates age-triggered leaf senescence through gibberellin pathway[J]. Plant Diversity, 2021, 43(4):331-340
- [5] XIE W Y, LI X R, WANG S P, et al. OsWRKY53 promotes abscisic acid accumulation to accelerate leaf senescence and inhibit seed germination by downregulating abscisic acid catabolic genes in rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 12: 816156
- [6] WEI W, LIANG D W, BIAN X H, et al. GmWRKY54 improves drought tolerance through activating genes in abscisic acid and Ca^{2+} signaling pathways in transgenic soybean[J]. The Plant Journal, 2019, 100(2):384-398
- [7] TAO Z, KOU Y J, LIU H B, et al. OsWRKY45 alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(14):4863-4874
- [8] VAN ECK L, DAVIDSON R M, WU S C, et al. The transcriptional network of WRKY53 in cereals links oxidative responses to biotic and abiotic stress inputs[J]. Functional & Integrative Genomics, 2014, 14(2):351-362
- [9] ISHIGURO S, NAKAMURA K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1 that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and β -amylase from sweet potato[J]. Molecular and General Genetics, 1994, 244(6):563-571
- [10] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(5):199-206
- [11] 王淑叶,伍国强,魏明. WRKY 转录因子调控植物逆境胁迫响应的作用机制[J]. 生物工程学报, 2024, 40(1):35-52
WANG S Y, WU G Q, WEI M. Functional mechanisms of WRKY transcription factors in regulating plant response to abiotic stresses [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(1):35-52
- [12] JIANG J J, MA S H, YE N H, et al. WRKY transcription factors in plant responses to stresses [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2017, 59(2):86-101
- [13] CHEN X J, LI C, WANG H, et al. WRKY transcription factors: evolution, binding, and action [J]. Phytopathology Research, 2019, 1(1):13
- [14] WEI K F, CHEN J, CHEN Y F, et al. Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in maize [J]. DNA Research, 2012, 19(2): 153-164
- [15] GULZAR F, FU J Y, ZHU C Y, et al. Maize WRKY transcription factor *ZmWRKY79* positively regulates drought tolerance through elevating ABA biosynthesis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(18):10080
- [16] BAILLO E H, HANIF M S, GUO Y H, et al. Genome-wide Identification of WRKY transcription factor family members in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) [J]. PLoS One, 2020, 15(8):e0236651
- [17] CHEN W, WANG Z K, TAO C Z, et al. SbWRKY50 promotes drought tolerance of sorghum by regulating lateral root formation [J]. Plant, Cell & Environment, 2026, 49(2): 954-967
- [18] TENG K, GUO Q, LIU L Y, et al. Chromosome-level reference genome assembly provides insights into the evolution of *Pennisetum alopecuroides* [J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14:1195479
- [19] PAYSAN-LAFOSSE T, ANDREEVA A, BLUM M, et al. The Pfam protein families database: embracing AI/ML [J]. Nucleic Acids Research, 2025, 53(D1):D523-D534
- [20] ALTSCHUL S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local

- alignment search tool[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215(3):403-410
- [21] JIN J P, TIAN F, YANG D C, et al. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D1040-D1045
- [22] GURUPRASAD K, BHASKER REDDY B V, PANDIT M W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence[J]. *Protein Engineering*, 1990, 4(2):155-161
- [23] KYTE J, DOOLITTLE R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 157(1):105-132
- [24] 邓雅茹, 柳燕, 吴丽霞, 等. WRKY 转录因子调控植物养分吸收利用及重金属解毒的研究进展[J]. *植物营养与肥料学报*, 2023, 29(10):1932-1943
- DENG Y R, LIU Y, WU L X, et al. Functions of plant WRKY transcription factors in nutrient uptake and utilization as well as detoxification of heavy metals[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2023, 29(10):1932-1943
- [25] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(1):127-128
- [26] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME Suite: tools for motif discovery and searching[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(suppl_2):W202-W208
- [27] LESCOT M, DÉHAIS 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
- [28] 张兰, 檀鹏辉, 滕珂, 等. 草地早熟禾荧光定量PCR分析中内参基因的筛选[J]. *草业学报*, 2017, 26(3):75-81
- ZHANG L, TAN P H, TENG K, et al. Screening of reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in Kentucky bluegrass[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2017, 26(3):75-81
- [29] 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 Biology*, 2021, 21(1):427
- [30] YAN L, JIN H T, RAZA A, et al. WRKY genes provide novel insights into their role against *Ralstonia solanacearum* infection in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:986673
- [31] MAO C L, ZHANG J, ZHANG Y N, et al. Genome-wide analysis of the WRKY gene family and their response to low-temperature stress in elephant grass[J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1):947
- [32] KHOSO M A, HUSSAIN A, RITONGA F N, et al. WRKY transcription factors (TFs): molecular switches to regulate drought, temperature, and salinity stresses in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:1039329
- [33] 于元平, 蒋宇佳, 孙向一, 等. 假俭草 WRKY 家族基因鉴定及其响应干旱胁迫表达分析[J]. *草地学报*, 2024, 32(5):1378-1391
- YU Y P, JIANG Y J, SUN X Y, et al. Identification of the WRKY family genes and thier expression analysis in response to drought stress in centipedegrass[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2024, 32(5):1378-1391
- [34] WANG C T, RU J N, LIU Y W, et al. The maize WRKY transcription factor *ZmWRKY40* confers drought resistance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(9):2580
- [35] GUO M Y, YANG F J, ZHU L J, et al. Loss of cold tolerance is conferred by absence of the *WRKY34* promoter fragment during tomato evolution [J]. *Nature Communications*, 2024, 15:6667
- [36] ZHANG J Y, LIANG Y H, ZHANG S M, et al. Global landscape of alternative splicing in maize response to low temperature[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(50):15715-15725

(责任编辑 闵芝智)