网络出版时间:2025-07-18 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.01.002

新疆野苹果 *WRKY* 基因家族鉴定及低温沙藏过程中的表达模式分析

李静[1,2],房震[1],李美芸[1],叶春秀[1]

(1 新疆农业大学 林学与风景园林学院,新疆 乌鲁木齐 830052;2 新疆金丰源种业有限公司,新疆 阿克苏 843000)

[摘 要] 【目的】对新疆野苹果[*Malus sieversii* (Ledeb.) Roem.]的 WRKY 转录因子(transcription factor,TF)家族在全基因组进行鉴定,筛选其种子在低温沙藏层积过程中差异表达的转录因子,为新疆野苹果 *WRKY* 基因的功能研究提供理论基础。【方法】使用 TBtools、Pfam 数据库并利用 HMM-search 搜索,初步获取新疆野苹果 WRKY 家族候选成员;利用 ExPASy-ProtParam 分析新疆野苹果 WRKY 家族蛋白的理化性质;用 MEGA 软件对新疆野苹果和拟南芥的 WRKY 保守结构域序列进行多重比对分析并构建系统进化树;利用 MEME 在线网站和 NCBI-CDD 分析保守基序和结构域;使用 PlantCARE 软件预测 WRKY 转录因子基因上游 2 000 bp 的顺式作用元件,MCScanX 绘制共线性图,使用 TBtools 将结果可视化。基于转录组数据,采用 RT-qPCR 分析 WRKY 转录因子在新疆野苹果种子低温沙藏不同时间的表达模式。【结果】在新疆野苹果中共鉴定获得 121 个 *WRKY* 基因,其编码蛋白的氨基酸数目为 122~733,分子质量 17.033 1~80.055 1 ku,等电点 4.75~10.06。系统进化树分析表明,新疆野苹果 *WRKY* 基因家族的 121 个成员被分为 3 个组和 7 个亚组,其中Ⅰ组和Ⅲ组分别包含 21 和 19 个成员;Ⅱ组成员数量多达 82 个,分别包含 5 个Ⅱa 成员、14 个Ⅱb 成员、30 个Ⅱc 成员、19 个Ⅱd 成员和 14 个Ⅱe 成员。每个亚组内新疆野苹果 WRKY 家族蛋白的基序比较一致,而亚组间则存在一定的差异性。顺式作用调控元件分析发现,上游启动子区含有与光响应、非生物胁迫、低温胁迫相关的作用元件,且 *MsWRKY* 基因具有丰富的激素响应相关元件。基因染色体定位分析表明,17 条染色体上均分布有 *WRKY* 基因成员。基因种内共线性分析表明,该家族成员存在 144 对片段重复;基因种间共线性分析结果显示,103 个 *MsWRKY* 基因与 99 个 *MdWRKY*(栽培苹果 *WRKY*)基因之间共存在 359 对共线性关系。RT-qPCR 分析表明,随低温沙藏时间增加,*MsWRKY*17、*MsWRKY*31、*MsWRKY*33、*MsWRKY*51 和 *MsWRKY*53 的表达量均呈现先上升后下降趋势;验证结果显示,WRKY 家族在新疆野苹果种子低温沙藏层积过程中的表达差异趋势与转录组分析结果相似。【结论】WRKY 转录因子可能在新疆野苹果种子低温沙藏层积休眠解除过程中发挥关键作用。

[关键词] 新疆野苹果;种子休眠;*WRKY* 基因家族;转录组学;生物信息学;基因表达

[中图分类号] S661.1 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)01-0009-15

Identification of *WRKY* gene family in *Malus sieversii* and analysis of its expression patterns during low-temperature sand storage

LI Jing[1,2], FANG Zhen[1], LI Meiyun[1], YE Chunxiu[1]

(1 *College of Forestry and Landscape Architecture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang* 830052, *China*; 2 *China Xinjiang Jinfengyuan Seed Industry Co. Aksu, Xinjiang* 843000, *China*)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to conduct a genome-wide identification of the WRKY tran-

[收稿日期] 2024-08-29 [修回日期] 2024-10-14
[基金项目] 新疆农业大学高层次人才引进项目(2521GCCRC);新疆维吾尔自治区自然基金面上项目(2023D01A28)
[作者简介] 李静(1999—),女,新疆阿克苏人,硕士,主要从事种子休眠研究。E-mail:lj190113@163.com
[通信作者] 叶春秀(1982—),女,四川资阳人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事林木种质资源与分子育种研究。E-mail:yecx2008@163.com

scription factor (TF) family in *Malus sieversii* (Ledeb.) Roem. and screen for differentially expressed transcription factors in its seeds during low-temperature sand storage stratification, to provide a theoretical basis for the study of *WRKY* gene functions in *M. sieversii*. 【Method】 The candidate members of the WRKY family in *M. sieversii* were initially identified through HMM-search using TBtools and the Pfam database. Physicochemical properties of the WRKY family proteins were analyzed with ExPASy-ProtParam. Multiple comparison analysis and construction of phylogenetic trees of WRKY conserved structural domain sequences of *M. sieversii* and *Arabidopsis thaliana* were performed using MEGA software. The conserved motifs and structural domains were analyzed via MEME online website and NCBI-CDD. The cis-acting elements within the 2 000 bp upstream region of the WRKY transcription factor genes were predicted using PlantCARE, while the collinearity map was generated by MCScanX and visualized with TBtools. Based on the transcriptome data, RT-qPCR was used to analyze the expression patterns of WRKY transcription factors in *M. sieversii* seeds throughout low-temperature sand storage process. 【Result】 A total of 121 *WRKY* genes were identified in *M. sieversii*, encoding proteins with amino acid numbers ranging from 122 to 733 aa, molecular masses of 17.033 1 to 80.055 1 ku, and isoelectric points ranging from 4.75 to 10.06. The phylogenetic tree analysis showed that the 121 members of the *WRKY* gene family in *M. sieversii* were divided into three major groups (Group Ⅰ, Ⅱ, and Ⅲ) and seven subgroups (Ⅱa—Ⅱe). Group Ⅰ contained 21 members, Group Ⅲ had 19 members, and Group Ⅱ was the largest group with 82 members, including 5 Ⅱa, 14 Ⅱb, 30 Ⅱc, 19 Ⅱd, and 14 Ⅱe members. The motifs of *M. sieversii* WRKY family proteins were relatively consistent within each subgroup, while there was some variability between subgroups. Analysis of cis-acting regulatory elements revealed that the upstream promoter region contained elements related to light response, abiotic stress, and low-temperature stress, and that the *MsWRKY* gene was rich in hormone response related elements. Chromosomal localization analysis showed the *WRKY* gene members were distributed on 17 chromosomes. Intraspecific collinearity analysis showed 144 pairs of segmental duplications in this family, while interspecific collinearity analysis revealed a total of 359 collinearity gene pairs between 103 *MsWRKY* genes and 99 *MdWRKY* genes (Malus domestica WRKY). RT-qPCR analysis showed that the expression of *MsWRKY*17, *MsWRKY*31, *MsWRKY*33, *MsWRKY*51 and *MsWRKY*53 initially increased and subsequently decreased during prolonged low-temperature sand storage. The validation results showed that the trend of differential expression of the WRKY family during low-temperature sand stratification of the *M. sieversii* seeds was consistent with the results of the transcriptome analysis. 【Conclusion】 WRKY transcription factors may play a pivotal role in dormancy release process of *M. sieversii* seeds during low-temperature sand storage stratification.

Key words: *Malus sieversii*; seed dormancy; *WRKY* gene family; transcriptomics; bioinformatics; gene expression

WRKY 家族是一类广泛分布于植物中的转录因子,通过与其他转录因子的自主和交叉调控,在植物的生长、发育和逆境信号转导等过程中发挥作用[1-2]。当植物的外界环境发生变化时,植物细胞膜上的受体就会感应到外界的变化刺激,之后将刺激信号转导到细胞膜内,使体内的激素含量发生改变,最后以中间信使作为介质调控基因表达水平[3-4],从而帮助植物抵御不利的环境变化。

根据锌指模体的类型和 WRKY 结构域(WD)的数量和序列,WRKY 超家族蛋白被分为三大组。Ⅰ组和Ⅱ组均含有相同的 C2H2 型锌指结构,但 WD 的数目不同,Ⅰ组含有 2 个 WD,Ⅱ组含有 1 个 WD;Ⅲ组与其他组不同的是具有 1 个 WD 和 C2HC 锌指结构[5]。近年来,随着生物信息学技术的发展,基于大量的系统发育分析结果,Ⅱ组被进一步划分为Ⅱa、Ⅱb、Ⅱc、Ⅱd 和Ⅱe 5 个亚组,并且这些亚组在起源上不是单系的[6]。除 WD 外,WRKY 蛋白还含有基本核定位结构域、亮氨酸拉链、丝氨酸-苏氨酸富集区、谷氨酰胺富集区、脯氨酸富集区、激酶结构域和 TIR-NBS-LRR 结构域[7]。当前,已经鉴定

和分离出的特定基因大多与植物激素的平衡相关[8-10]。在这些基因中，WRKY 转录因子是关键的调控因子，在植物生长过程中扮演着重要角色，能参与植物对生物和非生物胁迫的响应，对于植物的信号转导起着至关重要的作用[11]。近年来的研究表明，WRKY 转录因子能参与植物对激素的响应，脱落酸（abscisic acid，ABA）、赤霉素（gibberellic acid，GA）等激素作为正向调控因子，影响种子休眠进程[12-14]。拟南芥（*Arabidopsis*）*AtWRKY*6、*AtWRKY*18、*AtWRKY*41、*AtWRKY*60 和 *AtWRKY*60 被认为是 ABA 信号的正调控因子，*AtWRKY*6 直接抑制 *AtRAV*1 表达，促进 *ABI*3、*ABI*4 和 *ABI*5 的表达，调控 ABA 抑制的种子萌发过程[15]。基于天山郁金香（*Tulipa thianschanica*）种子休眠不同时期的转录组数据，发现 *TgWRKY*4、*TgWRKY*24 和 *TgWRKY*28 的表达趋势与植物体内 ABA 含量的变化均呈先升后降趋势，推测 3 个 *WRKY* 正调控 ABA 信号[16]。葡萄 *VvWRKY*37 在休眠芽中高度表达，其异位过表达后显著延迟了转基因杨树的萌芽，原因是抑制了 ABA 分解代谢基因 *CYP*707*As* 的表达，增加了内源 ABA 在转基因杨树中的累积，表明 *VvWRKY*37 可能通过 ABA 介导的信号通路调节花芽分化[12]。综上所述，WRKY 在植物繁育中具有广泛的应用前景。

新疆野苹果（*Malus sieversii*）主要分布于中亚的西天山地区，位于中亚重要地段伊犁河谷山麓的伊犁野生果林，被认为是一种独特的“海洋性气候”阔叶林类型[17]。由于受到伊犁河谷地区干旱、寒冷和高温气候环境的影响，具有较强的抵御环境胁迫的能力[18-19]，并驯化形成了对病害的抗性，例如对苹果火疫病（fire blight）[1]、黑星病（*Cladosporium cucumerinum*）[20]、腐烂病（*Valsa mali*）[21]、青霉病（*Penicillium expansum*）[22] 等病害均具有一定抗性，为栽培苹果（*Malus domestica*）的遗传改良提供了良好的种质资源。目前，野果林生态系统遭到严重破坏[23]，随着新疆野苹果死亡数量的不断增加，其已成为中国二级保护植物。同时，土壤种子库更新不良和种子深度休眠特性导致新疆野苹果实生苗数量稀少、种群更新困难，部分野果林区退化现象明显[24]。目前，对新疆野苹果种子休眠的研究主要集中在催芽方式及生理生化层面上，尚缺乏分子水平调控机制的研究[25-27]。本研究基于转录组学和生物信息学方法，对新疆野苹果全基因组中的 WRKY 转录因子家族成员进行鉴定和分析，以期为进一步研究该转录因子家族成员在新疆野苹果种子休眠解除过程中的作用及抗逆性奠定理论基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

2022 年 10 月，从新疆塔城额敏县野苹果林（83°59′27″～83°59′50″E，46°22′6″～46°22′14″N）中采集当年生野苹果种子为试验材料，挑选颗粒饱满、大小均匀、无机械损伤、无病虫害的种子进行试验。低温沙藏层积处理的种子先用蒸馏水浸泡 24 h，然后将湿沙与种子按体积比 3∶1 均匀混合，容器底部铺一层湿沙，装入种子后其上再覆一层湿沙，置于 4 ℃沙藏。分别于沙藏层积 0，30，60 和 90 d 时取种子样品液氮速冻后于－80 ℃保存，同时以常规室温保存 0，30，60 和 90 的种子作为对照，每个时期样本均设 3 个生物学重复，共 24 个样品进行转录组数据测序。

1.2　试验方法

本研究基于低温沙藏不同时间的新疆野苹果种子响应休眠解除的转录组数据，以及新疆野苹果基因组数据[28]（http://bioinfo.bti.cornell.edu/apple_genome/），对 WRKY 转录因子基因家族进行鉴定与生物信息学分析。

1.2.1　WRKY 家族成员鉴定及蛋白理化性质分析

利用生物信息分析软件 TBtools[29]，通过 Pfam（http://pfam.xfam.org/）数据库中的 Pfam-A 文件和 WRKY 的隐马尔可夫模型（PF03106）进行 HMM-search，初步获取了新疆野苹果 WRKY 家族的候选成员。提取基因上、下游 5 000 bp 的基因坐标信息，利用 softberry（http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind）网页工具预测基因模型，将新的基因模型结果序列提交到 NCBI CDD-search 进行校验，以获得正确的基因序列信息，并获取筛选矫正后蛋白序列的保守结构域。利用 ExPASy-ProtPrama 在线软件（http://web.expasy.org/prot param/）和 TBtools，进行蛋白质理化性质分析并获得染色体位置及基因位置信息。WRKY 转录因子的理化性质包括氨基酸数目、蛋白质分子质量和等电点。

1.2.2　系统进化分析

在植物转录因子数据库 Plant TFDB（planttfdb.gao-lab.org）中获得拟南芥 WRKY 转录因子家族数据。利用 MEGA 软件对新

疆野苹果和拟南芥的WRKY保守结构域序列进行多重比对分析,筛选出匹配的模型后,采用邻接法(Neighbor-Joining method,NJ)构建系统发育树,其中自展值(Bootstrap)值设定为1 000。根据分类以及系统发育树结果,使用tvBOT[30](https://www.chiplot.online/)绘图。

1.2.3 保守基序和结构域分析 利用Multiple EM for motif Elicitation(https://meme-suite.org/meme/)由MEME的经典模式生成进行保守基序预测,将121个WRKY蛋白序列上传至MEME,设定最大模体数量为10,以检测不同亚组内MsWRKY蛋白所包含的基序种类及数量。利用在线工具NCBI-CDD-Batch(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi),对*MsWRKY*基因家族蛋白序列进行保守结构域分析。

1.2.4 *MsWRKY*基因家族启动子顺式作用元件分析 利用TBtools软件,从新疆野苹果基因GFF文件中获得基因位置,并提取*MsWRKY*基因转录起始位点(ATG)上游2 000 bp的序列;将序列上传至PlantCARE(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)在线分析软件,对顺式作用元件进行预测,整理不同顺式作用元件的数量并进行分类和筛选。

1.2.5 *MsWRKY*基因染色体定位及共线性分析 利用TBtools的MCSanX,对新疆野苹果基因(*MsWRKY*)组与栽培苹果基因(*MdWRKY*)组数据以及注释文件进行处理,获得新疆野苹果染色体密度和WRKY家族在染色体上的分布情况,并分析种内和种间(栽培苹果)WRKY家族基因间的复制。

1.2.6 *MsWRKY*基因家族在种子低温沙藏不同时间的表达模式 通过设定|lb *FC*(差异倍数,Fold change)|≥1和P_{adj}($P_{校正值}$)<0.05的阈值,对差异基因进行筛选。设计WRKY转录因子的实时荧光定量PCR(RT-qPCR)引物(表1),利用SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ试剂盒(TAKARA),以低温沙藏不同时间的种子cDNA为模板,*β-actin*为内参基因进行荧光定量分析,检测WRKY转录因子在新疆野苹果种子沙藏不同时间的表达情况。RT-qPCR定量采用ABI7900HT型荧光定量PCR仪,扩增程序为:95 ℃预变性30 s;95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,循环40次。熔解曲线标准程序为:95 ℃ 10 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s,60 ℃冷却15 s。基于RT-qPCR的原始检测结果,通过比较待测样品中目标基因的*Ct*值与参考样品(对照组)中的*Ct*值之差,设置3次技术重复,使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$公式计算基因相对表达量[31]。基于转录组测序对差异表达基因的表达量进行分析,结合每千碱基对每百万对应基因的读取数,即FPKM(fragments per kilobase million)进行数据统计和绘图。

表1 新疆野苹果*WRKY*基因特异引物信息

Table 1 Specific primers for *WRKY* genes in *Malus sieversii*

引物名称 Primer name	正向引物(5′→3′) Forward primer (5′→3′)	反向引物(5′→3′) Reverse primer (5′→3′)
β-actin	CAGCATCACTACCATCTGCAAC	CCGCCATCTTCTACTTCCTGTTT
WRKY31-F	GCCTGTAACGCTCGATCTCA	TGCTTTGAGGGCTTCCCAAT
WRKY53-F	AATGGGGAATATGTGCTTCTGATTT	GCCGAATTTGCCATGCTGTG
WRKY17-F	GCGCCCTATCCAATCATCCC	TTGTCACGGTGAAGTCGGTG
WRKY51-F	AAGCGGTCAAGAACAGCTCA	CCAGCGAAGTAACCAGTATTCA
WRKY21-F	GCATCAATGCATCAGGACAGG	ATTGGCATTCCACCAGAGCAT
WRKY33-F	CCACAGCCACAAAGGCAATC	TGCTGCTAGTACCCCCATTG

2 结果与分析

2.1 新疆野苹果WRKY转录因子家族成员的鉴定及其理化性质

利用构建的WRKY转录因子的隐马尔可夫模型(PF03106),从新疆野苹果基因组中检索到121个MsWRKY转录因子,理化性质分析结果表明,121个MsWRKY蛋白家族的蛋白质序列长度在122个氨基酸(Msi_12g011760)至733个氨基酸(Msi_03g003550)不等,其中Ⅰ组家族成员氨基酸数目最多,均在470个氨基酸以上;蛋白质分子质量为17.033 1 ku(Msi_14g016280)至80.055 1 ku(Msi_12g022310);等电点在4.75(Msi_14g012590和Msi_14g012610)至10.06(Msi_12g020910)之间均匀分布,且MsWRKY蛋白分子酸性和碱性氨基酸数量相当(表2)。

表 2　新疆野苹果 WRKY 转录因子家族的基本信息

Table 2　Basic information of the WRKY transcription factor family in *Malus sieversii*

基因序列 ID Gene sequence ID	分组 Group	氨基酸数目 Amino acid number	分子质量/ku Molecular weight	等电点 Theoretical pI	染色体 Chromosome	定位 Location	
						起始 Start	结束 End
Msi_13g005810	Ⅰ	526	57.411 1	7.70	chr13	4 325 460	4 328 156
Msi_16g006220	Ⅰ	528	57.246 1	8.11	chr16	4 584 438	4 586 669
Msi_12g011750	Ⅰ	470	51.530 1	9.06	chr12	18 806 212	18 809 339
Msi_04g010950	Ⅰ	471	51.656 3	9.06	chr4	19 247 304	19 249 774
Msi_09g005410	Ⅰ	528	57.631 7	8.62	chr9	4 053 090	4 055 854
Msi_12g015670	Ⅰ	512	56.646 9	6.73	chr12	24 299 823	24 301 807
Msi_03g016140	Ⅰ	584	63.879 1	5.97	chr3	24 851 414	24 856 260
Msi_04g015090	Ⅰ	520	57.679 0	7.10	chr4	24 738 092	24 740 088
Msi_03g004890	Ⅰ	514	56.350 6	8.74	chr3	4 438 234	4 445 730
Msi_03g003550	Ⅰ	733	79.542 3	5.96	chr3	3 324 053	3 327 089
Msi_11g016740	Ⅰ	589	64.192 6	5.96	chr11	26 552 668	26 556 782
Msi_11g005030	Ⅰ	572	62.879 5	6.77	chr11	4 717 401	4 719 969
Msi_09g011430	Ⅰ	484	53.149 2	5.85	chr9	9 330 169	9 332 208
Msi_12g022310	Ⅰ	727	80.055 1	6.57	chr12	30 857 355	30 860 986
Msi_17g004700	Ⅰ	531	57.508 8	8.12	chr17	3 998 922	4 001 805
Msi_17g010320	Ⅰ	471	53.321 4	6.66	chr17	9 435 688	9 438 056
Msi_04g021680	Ⅰ	726	79.622 9	5.99	chr4	31 071 852	3 1075 229
Msi_02g000820	Ⅰ	480	52.863 0	8.52	chr2	605 381	608 433
Msi_15g014560	Ⅰ	483	53.329 2	6.16	chr15	11 323 551	11 326 881
Msi_08g005190	Ⅱa	565	31.270 1	7.87	chr8	4 496 887	4 508 312
Msi_09g020050	Ⅱa	320	35.309 6	7.59	chr9	26 077 678	26 079 379
Msi_17g019850	Ⅱa	321	35.656 7	8.20	chr17	27 193 029	27 194 791
Msi_15g003930	Ⅱa	302	33.600 6	7.10	chr15	2 688 535	2 690 004
Msi_15g003940	Ⅱa	286	32.054 0	8.15	chr15	2 703 540	2 705 045
Msi_15g037430	Ⅱb	538	58.689 1	5.05	chr15	53 782 357	53 784 889
Msi_09g010170	Ⅱb	625	68.199 6	6.47	chr9	8 292 073	8 294 939
Msi_17g009220	Ⅱb	645	69.946 4	6.42	chr17	8 344 157	8 346 850
Msi_11g017620	Ⅱb	531	57.888 5	6.34	chr11	28 148 550	28 152 244
Msi_05g033000	Ⅱb	606	68.050 3	7.19	chr5	44 860 053	44 862 626
Msi_03g016850	Ⅱb	538	58.927 9	6.42	chr3	25 863 336	25 865 925
Msi_16g007220	Ⅱb	595	64.864 4	6.65	chr16	5 322 514	5 327 350
Msi_06g016790	Ⅱb	683	73.433 9	7.22	chr6	32 475 100	32 478 713
Msi_09g004620	Ⅱb	624	68.700 3	6.00	chr9	3 431 441	3 437 512
Msi_10g029660	Ⅱb	611	65.597 4	6.47	chr10	43 572 623	43 575 124
Msi_08g020560	Ⅱb	572	71.050 5	5.35	chr8	29 727 039	29 729 480
Msi_17g004110	Ⅱb	455	49.994 7	8.28	chr17	3 490 988	3 493 243
Msi_14g019710	Ⅱb	584	63.307 9	6.48	chr14	29 947 152	29 950 401
Msi_13g006850	Ⅱb	576	62.323 6	6.02	chr13	5 101 239	5 105 005
Msi_12g011760	Ⅱc	122	17.411 7	8.67	chr12	18 824 564	18 826 272
Msi_04g010990	Ⅱc	179	62.101 0	9.19	chr4	19 268 552	19 269 493
Msi_09g025270	Ⅱc	350	38.393 3	5.85	chr9	34 798 402	34 799 845
Msi_13g013160	Ⅱc	385	42.703 9	6.11	chr13	11 321 715	11 323 445
Msi_17g024210	Ⅱc	346	38.198 3	6.27	chr17	33 310 706	33 312 153
Msi_16g013850	Ⅱc	371	41.144 2	5.60	chr16	11 365 151	11 366 844
Msi_16g011220	Ⅱc	190	21.389 9	9.82	chr16	8 736 311	8 738 268
Msi_07g011130	Ⅱc	222	24.924 3	9.44	chr7	18 726 270	18 727 758
Msi_13g010750	Ⅱc	190	21.714 4	9.74	chr13	8 598 451	8 600 144
Msi_17g012640	Ⅱc	365	41.285 2	6.91	chr17	12 481 088	12 483 471
Msi_04g012330	Ⅱc	297	33.413 3	5.72	chr4	21 291 359	21 293 274
Msi_10g024830	Ⅱc	327	35.938 7	6.46	chr10	38 660 976	38 662 736
Msi_09g000990	Ⅱc	221	25.441 2	9.12	chr9	747 654	750 368
Msi_01g007170	Ⅱc	218	24.584 9	9.36	chr1	17 303 287	17 306 010
Msi_05g027490	Ⅱc	319	35.119 9	6.83	chr5	40 289 223	40 290 911
Msi_17g000900	Ⅱc	244	27.764 8	9.03	chr17	816 825	818 766
Msi_12g012940	Ⅱc	297	32.982 7	5.77	chr12	20 719 654	20 721 577
Msi_01g011900	Ⅱc	208	23.582 1	8.69	chr1	23 643 452	23 644 190
Msi_16g005980	Ⅱc	324	35.482 1	6.26	chr16	4 444 141	4 446 769
Msi_06g012970	Ⅱc	150	17.147 3	9.56	chr6	28 550 314	28 551 179
Msi_13g005510	Ⅱc	321	34.943 4	6.05	chr13	4 139 330	4 142 598

表 2(续) Table 2(continued)

基因序列 ID Gene sequence ID	分组 Group	氨基酸数目 Amino acid number	分子质量/ku Molecular weight	等电点 Theoretical pI	染色体 Chromosome	定位 Location	
						起始 Start	结束 End
Msi_15g030380	Ⅱc	271	30.227 7	8.93	chr15	37 962 440	37 966 896
Msi_15g005460	Ⅱc	161	18.178 8	5.65	chr15	3 790 293	3 791 152
Msi_01g001640	Ⅱc	270	30.391 9	8.93	chr1	5 818 817	5 822 363
Msi_14g016280	Ⅱc	148	17.033 1	9.40	chr14	26 090 128	26 091 010
Msi_09g013710	Ⅱc	369	41.290 4	8.14	chr9	11 854 505	11 856 791
Msi_07g009100	Ⅱc	236	26.784 3	8.17	chr7	12 032 085	12 036 499
Msi_15g029860	Ⅱc	197	22.048 0	6.30	chr15	36 905 030	36 907 943
Msi_08g006140	Ⅱc	220	24.913 2	9.32	chr8	5 338 394	5 341 342
Msi_01g021010	Ⅱc	350	38.732 6	9.36	chr1	31 968 036	31 969 479
Msi_05g020090	Ⅱd	354	39.934 2	9.67	chr5	32 319 428	32 321 309
Msi_15g010300	Ⅱd	338	36.747 5	9.48	chr15	7 614 054	7 615 592
Msi_06g006480	Ⅱd	318	35.951 1	9.64	chr6	11 393 373	11 394 804
Msi_08g012160	Ⅱd	341	37.033 8	9.46	chr8	12 130 313	12 131 816
Msi_15g007740	Ⅱd	342	37.186 4	9.27	chr15	5 465 088	5 466 597
Msi_15g026220	Ⅱd	331	36.220 9	9.54	chr15	26 269 824	26 271 168
Msi_04g019990	Ⅱd	311	34.894 9	9.54	chr4	29 584 423	29 585 692
Msi_02g015060	Ⅱd	330	35.928 6	9.61	chr2	14 914 522	14 915 851
Msi_10g019350	Ⅱd	355	39.966 3	9.68	chr10	32 041 136	32 043 190
Msi_08g008940	Ⅱd	356	38.637 1	9.41	chr8	8 026 096	8 027 771
Msi_13g020620	Ⅱd	281	30.733 7	9.90	chr13	23 846 925	23 848 024
Msi_12g020910	Ⅱd	289	32.761 8	10.06	chr12	29 707 399	29 708 543
Msi_16g021500	Ⅱd	284	30.922 1	9.87	chr16	26 021 029	26 022 169
Msi_15g010050	Ⅱd	164	18.307 1	9.30	chr15	7 466 743	7 469 000
Msi_10g005800	Ⅱd	565	61.702 3	6.69	chr10	7 463 768	7 466 698
Msi_06g001220	Ⅱd	530	58.030 4	8.61	chr6	1 473 309	1 475 889
Msi_15g015040	Ⅱd	423	46.451 2	8.74	chr15	11 754 087	11 756 088
Msi_15g021680	Ⅱd	589	64.102 2	8.03	chr15	19 454 458	19 456 781
Msi_03g011280	Ⅱd	557	60.676 2	7.00	chr3	12 384 698	12 387 706
Msi_13g024800	Ⅱd	520	57.567 4	10.03	chr13	45 142 943	45 144 920
Msi_01g007150	Ⅱe	351	37.881 1	7.66	chr1	17 259 442	17 260 739
Msi_10g023090	Ⅱe	491	53.079 7	6.05	chr10	36 779 306	36 783 230
Msi_01g018740	Ⅱe	445	48.805 8	4.78	chr1	30 000 336	30 002 068
Msi_10g025530	Ⅱe	266	29.490 2	5.10	chr10	39 424 002	39 425 226
Msi_07g011150	Ⅱe	348	37.658 8	6.75	chr7	18 818 352	18 819 620
Msi_07g022460	Ⅱe	456	50.643 4	5.54	chr7	33 999 959	34 001 606
Msi_11g026120	Ⅱe	268	30.828 5	4.81	chr11	39 585 402	39 586 763
Msi_05g025530	Ⅱe	490	53.549 1	5.78	chr5	38 139 443	38 144 017
Msi_05g028330	Ⅱe	273	30.201 8	5.80	chr5	41 059 949	41 061 344
Msi_14g012590	Ⅱe	291	32.889 5	4.75	chr14	19 437 385	19 438 834
Msi_14g012610	Ⅱe	291	32.889 5	4.75	chr14	19 471 958	19 473 407
Msi_06g008980	Ⅱe	316	35.937 3	5.20	chr6	22 085 258	22 086 619
Msi_09g020930	Ⅱe	250	27.398 5	5.47	chr9	27 825 211	27 827 814
Msi_03g025040	Ⅱe	260	30.342 4	5.17	chr3	36 059 029	36 060 376
Msi_12g016390	Ⅲ	659	36.956 4	5.98	chr12	25 393 773	25 406 136
Msi_12g016380	Ⅲ	707	35.293 3	5.18	chr12	25 376 775	25 383 710
Msi_01g019170	Ⅲ	347	38.719 7	6.01	chr1	30 452 378	30 453 910
Msi_07g019100	Ⅲ	342	37.326 5	5.38	chr7	30 685 316	30 687 471
Msi_07g022850	Ⅲ	342	38.048 9	5.50	chr7	34 392 523	34 394 068
Msi_01g014970	Ⅲ	344	37.656 1	6.42	chr1	26 839 422	26 842 026
Msi_06g009980	Ⅲ	351	39.406 6	5.72	chr6	24 385 608	24 387 179
Msi_01g007770	Ⅲ	353	39.238 8	5.54	chr1	18 115 960	18 117 991
Msi_07g012580	Ⅲ	356	39.731 2	5.48	chr7	21 687 918	21 690 136
Msi_14g013390	Ⅲ	355	39.845 0	5.58	chr14	21 234 540	21 236 167
Msi_01g014980	Ⅲ	303	34.399 2	5.72	chr1	26 843 084	26 845 897
Msi_04g015710	Ⅲ	333	37.191 6	5.38	chr4	25 653 018	25 654 767
Msi_14g000600	Ⅲ	333	37.191 6	5.38	chr14	723 123	724 872
Msi_04g015730	Ⅲ	344	38.212 9	6.01	chr4	25 674 994	25 676 789
Msi_14g000620	Ⅲ	344	38.223 0	6.01	chr14	745 104	746 899
Msi_07g019110	Ⅲ	302	33.972 9	6.38	chr7	30 688 391	30 690 581
Msi_12g016360	Ⅲ	333	36.847 2	5.11	chr12	25 351 447	25 353 179
Msi_12g016320	Ⅲ	327	36.851 7	6.65	chr12	25 253 804	25 255 802
Msi_12g016340	Ⅲ	307	34.197 5	5.47	chr12	25 297 162	25 298 807

2.2　新疆野苹果 WRKY 转录因子家族的系统进化分析

对已鉴定的 121 个 MsWRKY 预测蛋白序列，采用邻接法（NJ）与 90 个拟南芥 AtWRKY 蛋白序列进行多重比较并构建系统进化树。对新疆野苹果 WRKY 家族成员的分类结果显示，其与拟南芥 WRKY 家族成员有相似的聚集模式。以拟南芥 WRKY 家族成员聚集规律作为参考，对新疆野苹果 WRKY 家族进行分类，得到以下结果：121 个新疆野苹果 WRKY 家族成员被分为 3 个组和 7 个亚组。其中，Ⅰ组和Ⅲ组分别包含 21 和 19 个成员；Ⅱ组成员数最多，共有 82 个成员，分别包含 5 个Ⅱa 成员、14 个Ⅱb 成员、30 个Ⅱc 成员、19 个Ⅱd 成员和 14 个Ⅱe 成员，总共占 WRKY 家族的 71%（图 1）。

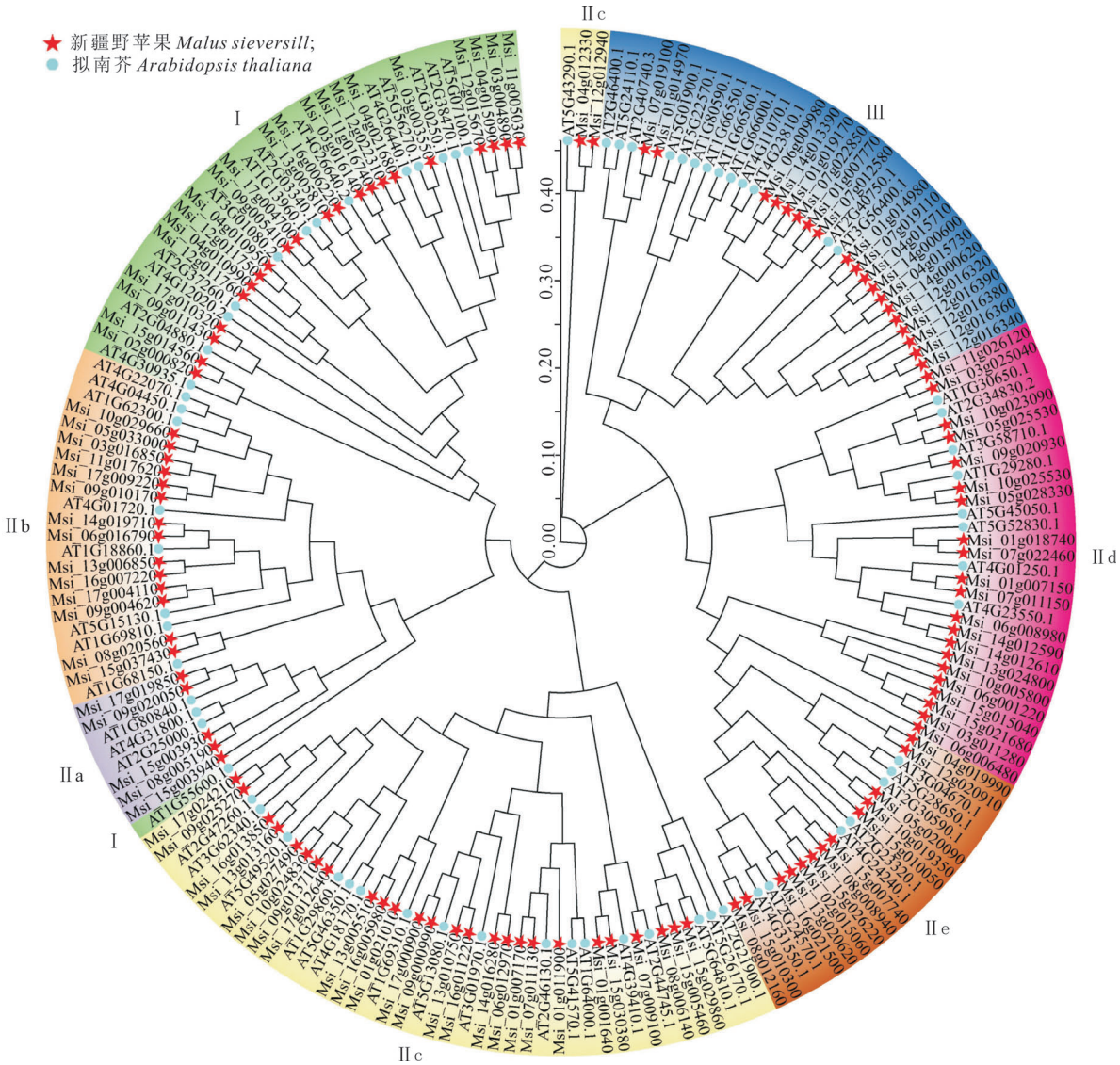


图 1　新疆野苹果 WRKY 转录因子家族的系统进化树

Fig. 1　Phylogenetic tree of the WRKY transcription factor family in *Malus sieversii*

2.3　新疆野苹果 *WRKY* 基因家族蛋白保守基序和结构域分析

对 MsWRKY 的保守基序进行分析，结果（图 2）显示，19 个Ⅰ组 MsWRKY 成员均含有基序 1～4 和基序 6，蛋白基序相对保守；Ⅱe 亚组除 Msi_05g025530 有 3 个基序外，其余成员均只有 2 个基序，数量最少；Ⅱb 亚组和Ⅲ组的部分成员含有 6 个基序，数量最多；Ⅱc 亚组成员除 Msi_04g012330 和 Msi_12g012940 外，都含有基序 1～3；每个亚组基序分布的位置和数量差异不大。上述结果说明每个亚组内新疆野苹果 WRKY 家族蛋白的基序比较一致，而亚组间则存在一定的差异性。

对 MsWRKY 的保守结构域进行分析，结果（图 3）显示，Ⅱd 亚组成员包含 WRKY、DELLA 或

WEMBL 超家族结构域，Ⅰ组中的 Msi_15g014560 中还包含了 rad2 超家族结构域，Ⅱc 亚组中的 Msi_04g010990 中包含了 RVT_2 和 RNase_H_like 超家族结构域。

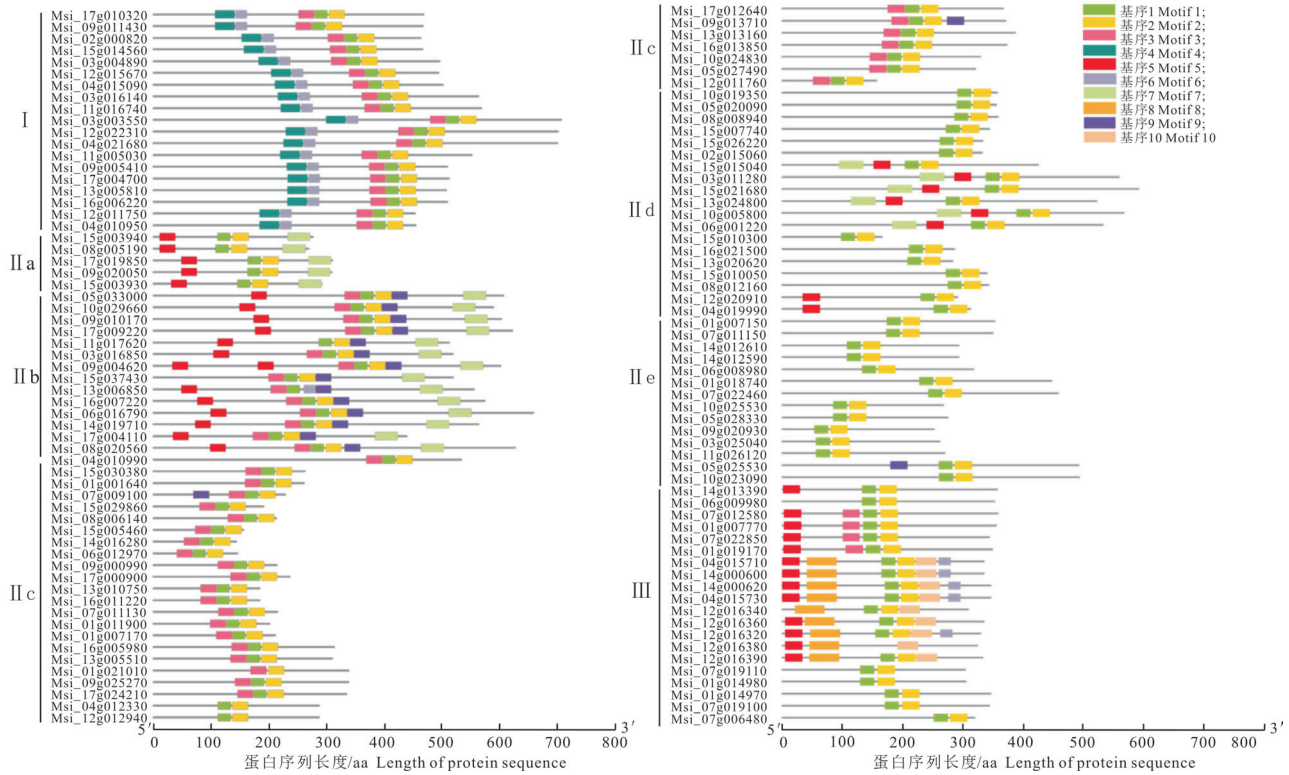


图 2 新疆野苹果 *WRKY* 基因家族保守基序分析

Fig. 2 Conserved motif analysis of the *WRKY* gene family in *Malus sieversii*

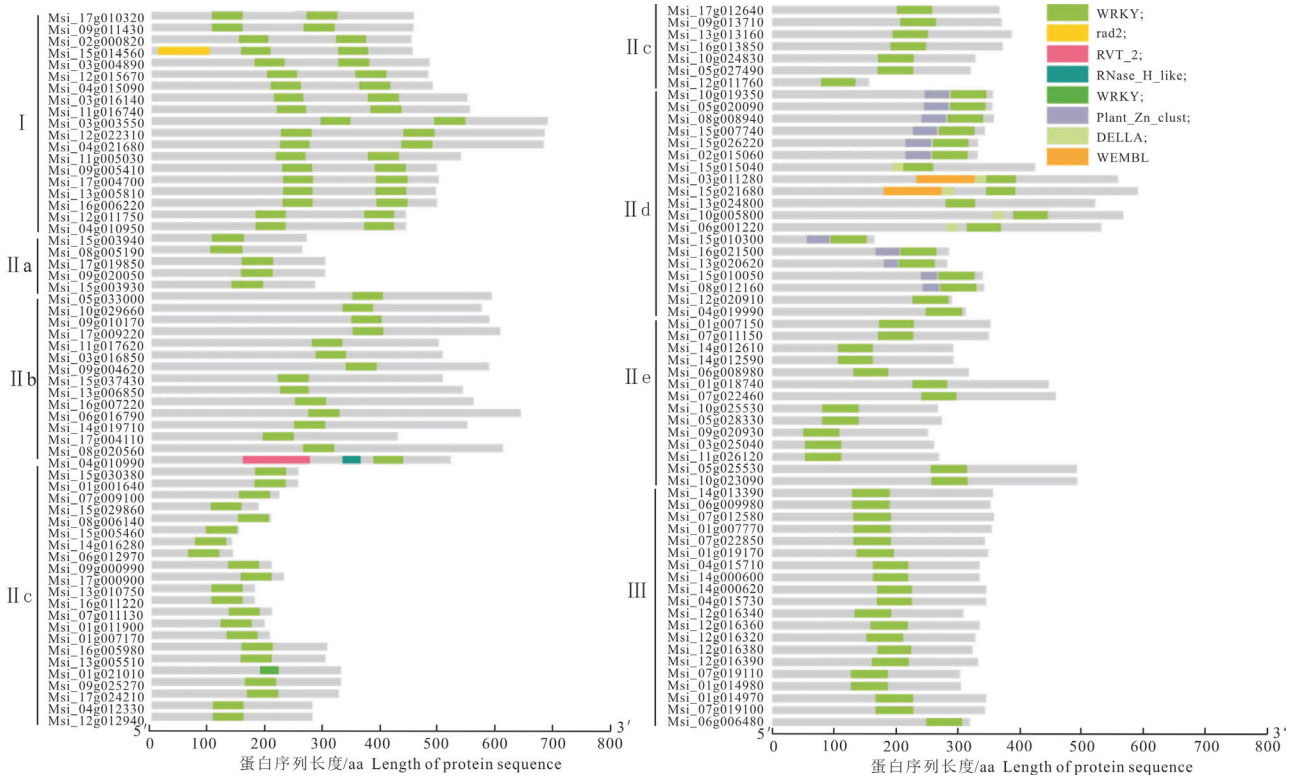


图 3 新疆野苹果 *WRKY* 基因家族保守基序结构域分析

Fig. 3 Conserved structure analysis of the *WRKY* gene family in *Malus sieversii*

2.4　*MsWRKY* 基因家族启动子顺式作用元件分析

转录因子可特异性地结合存在于靶基因启动子中的顺式元件，为 WRKY 转录因子在植物中具有的多样性功能奠定了基础。对鉴定出的 121 个新疆野苹果 WRKY 蛋白进行分析，结果（图 4）显示，所有启动子元件按照功能分为 5 种，即组织（tissue）、转录因子（transcription factor）、阶段（stage）、植物激素（phytohormone）和环境（environment）。

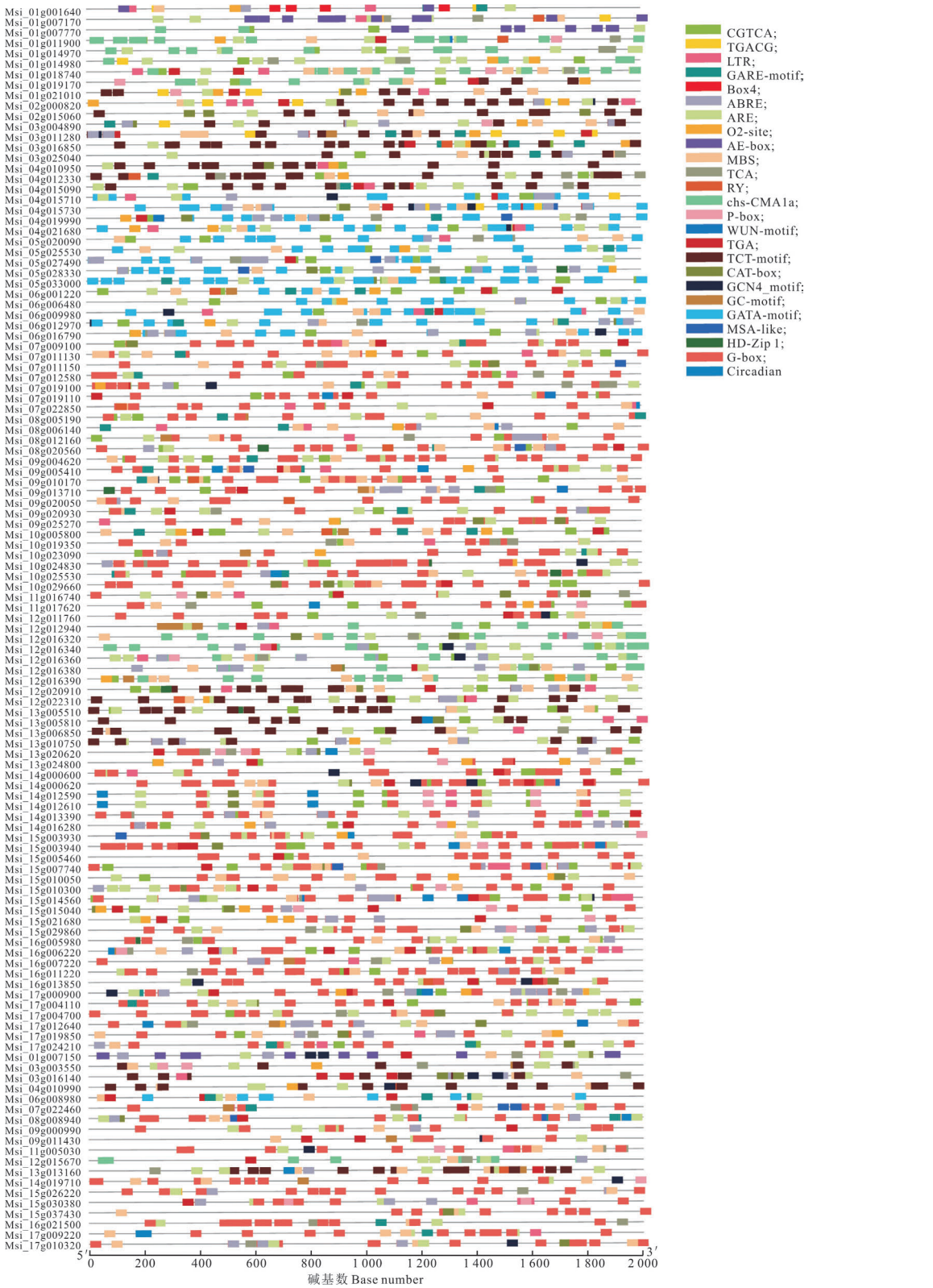


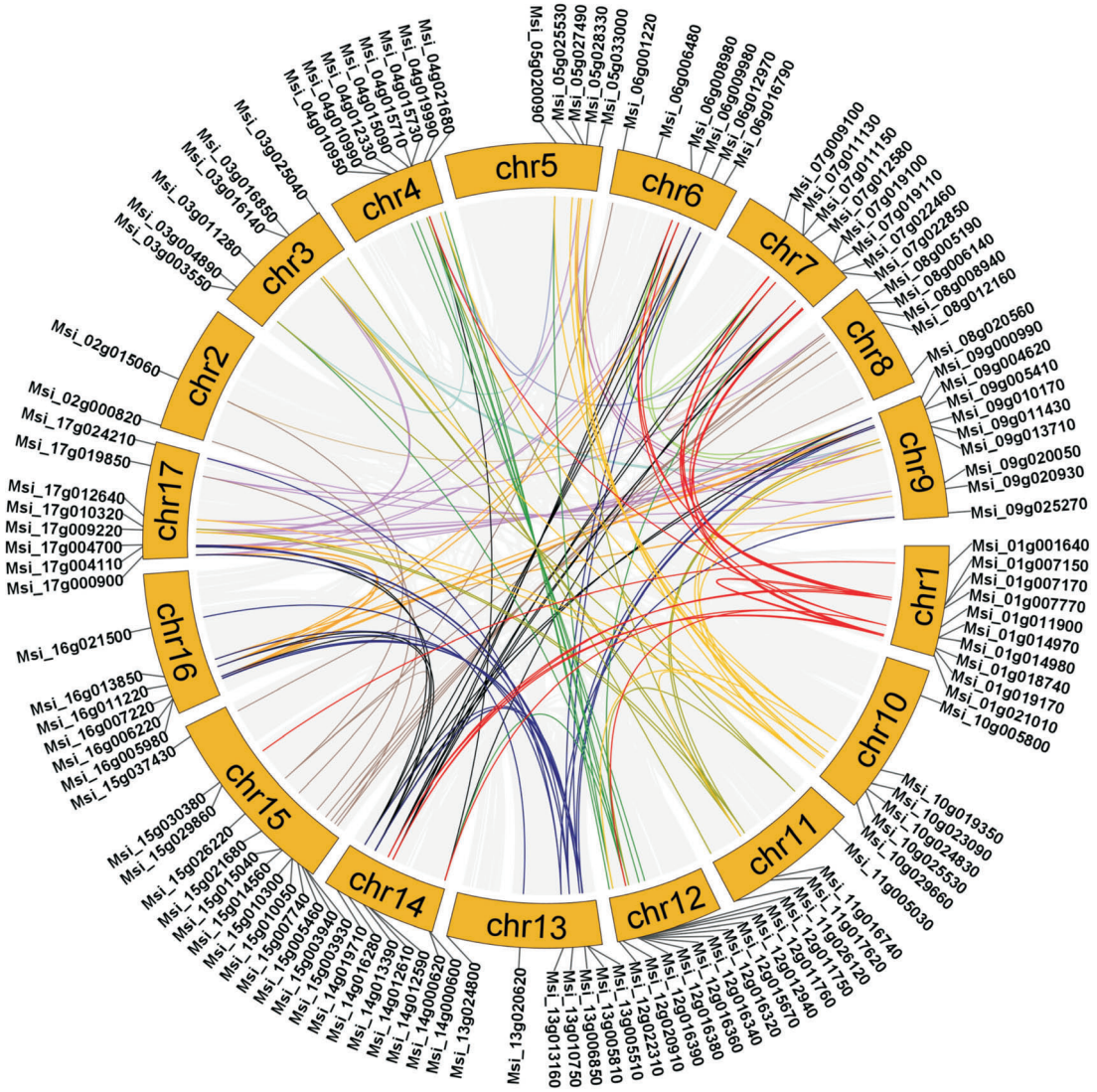
图 4　新疆野苹果 *WRKY* 基因家族启动子顺式作用元件的分布

Fig. 4　Distribution of cis-acting elements of *WRKY* gene family promoter in *Malus sieversii*

WRKY 家族基因含有数目较多的光响应元件(Box4、chs-CMA1a、TCT-motif、GATA-motif 和 G-box)以及非生物胁迫相关元件(ARE)和部分低温响应元件(low-temperature response,LTR)等。此外,大部分 *MsWRKY* 基因含有茉莉酸响应(methyl jasmonate responsiveness,CGTCA、TGACG)、脱落酸响应(abscisic acid responsiveness,ABRE)、生长素响应(auxin responsive element,TGA)、赤霉素响应(gibberellin responsive element,GARE-motif、P-box)和水杨酸响应(salicylic acid responsiveness,TCA)等植物激素相关元件。

2.5 *MsWRKY* 基因染色体定位及共线性分析

染色体定位结果(图 5)表明,121 个新疆野苹果 WRKY 家族基因在 17 条染色体上呈不均匀分布,其中 Chr1、Chr12、Chr15 染色体均分布有 10 个以上 *WRKY* 基因,Chr9 染色体分布有 9 个 *WRKY* 基因,Chr4、Chr7、Chr17 染色体均分布有 8 个 *WRKY* 基因,Chr14 号染色体上分布着 7 个 *WRKY* 基因,Chr3、Chr6、Chr10、Chr13、Chr16 染色体则各分布有 6 个 *WRKY* 基因,Chr5 和 Chr8 染色体上均分布有 5 个 *WRKY* 基因,Chr11 和 Chr2 染色体分别分布有 4 个和 2 个 *WRKY* 基因。



Chr1—Chr17 代表染色体编号。

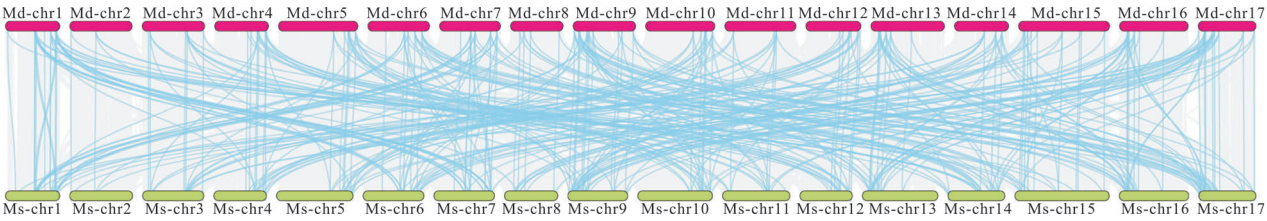
Chr1—Chr17 represent chromosome labels.

图 5 新疆野苹果 *WRKY* 基因定位分析

Fig. 5 Localization analysis of *WRKY* genes in *Malus sieversii*

种内共线性分析结果(图 6)表明,在新疆野苹果 WRKY 家族内存在 144 对片段重复。其中,Chr13、Chr10 中没有共线性对应产物,Chr1、Chr11 分别只有 1 个共线性产物,Chr8、Chr9 未与其他染

色体产生共线性；对 17 条染色体进行两两比较，发现 Chr4 与 Chr12、Chr15 与 Chr8、Chr5 与 Chr10、Chr9 与 Chr17、Chr13 与 Chr16 染色体的大片段之间以及 Chr3 与 Chr11、Chr1 与 Chr7、Chr2 与 Chr15 染色体的短片段之间存在较强的共线性。物种间共线性分析结果显示，103 个 *MsWRKY* 基因与 99 个 *MdWRKY* 基因之间共存在 359 对共线性关系。



Md 代表栽培苹果，Ms 代表新疆野苹果，数字是染色体编号

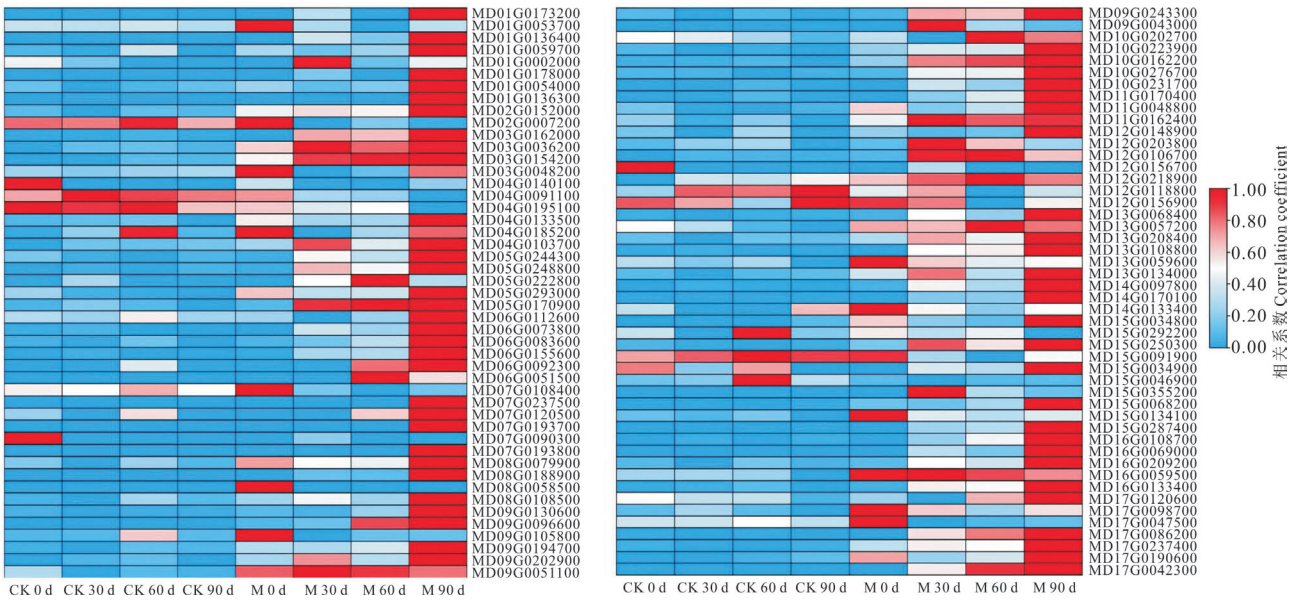
Md represents *Malus domestica*; Ms represents *Malus sieversii*; Number indicates chromosome label.

图 6　新疆野苹果与栽培苹果 *WRKY* 基因的种内和种间共线性分析

Fig. 6　Intraspecific and interspecific collinearity analysis of *WRKY* genes in *Malus sieversii* and *Malus domestica*

2.6　新疆野苹果种子低温沙藏层积过程中 WRKY 转录因子的表达分析

基于转录组测序数据，对 96 个 *WRKY* 基因的表达模式进行分析，使用 FPKM 值进行评估。在低温沙藏层积过程中发现了 38 个差异表达基因（图 7）。为了验证这些结果，选择了新疆野苹果种子在低温沙藏层积过程中表达变化明显的 6 个 *WRKY* 基因进行了 RT-qPCR 验证，结果（图 8）显示，RT-qPCR 的结果与转录组数据表达趋势基本一致。这表明在低温沙藏层积处理过程中，*WRKY* 基因的差异表达可能参与了种子解除休眠的响应过程，并且不同沙藏时间之间存在着响应程度的差异。



CK. 常温处理（对照）；M. 低温层积处理；CK、M 后的 0，30，60，90 d 表示处理时间。

CK. Room temperature (control); M. Low-temperature stratification; 0, 30, 60, 90 d indicates the time of each treatment.

图 7　新疆野苹果种子低温层积中 WRKY 转录因子表达热图

Fig. 7　Heat map analysis of WRKY transcription factor expression during cold stratification in *Malus sieversii* seeds

3　讨　论

转录因子是生物体内调控下游靶基因转录的重要调控系统。转录因子作为一个开关来开启或关闭转录过程，同样也有可能启动和终止信号级联反应[32]。基于新疆野苹果全基因组数据信息，本研究对新疆野苹果 WRKY 家族进行了系统分析，筛选获得了 121 个家族成员。随着基因组鉴定技术的迅速发展，许多物种的 WRKY 转录因子家族陆续被鉴定。到目前为止，模式植物拟南芥中有 *WRKY* 基因 74 个[33]，水稻（*Oryza sativa*）中有 100 多个[34]，大豆（*Glycine max*）有 197 个[35]，大麦（*Hor-*

deum vulgare)有 45 个[36],黑杨(*Populus nigra*)有 104 个[37]。通过全基因组分析,已经鉴定了卷柏(*Selaginella tamariscina*)中的 35 个 *WRKY* 基因[13]和马尾松(*Pinus massoniana*)中的 43 个 *WRKY* 基因[38],以及番茄(*Solanum lycopersicum*)中的 81 个 WRKY 成员[39]。此外,WRKY 转录因子的不同类群在不同植物中的分布也存在差异,如拟南芥和水稻中Ⅰ组的 WRKY 蛋白丰度高于野草莓(*Fragaria vesca*)[40]。同样,杨树(*Populus przewalskii*)基因组中 50%的 WRKY 转录因子属于Ⅰ组,桑树(*Morus alba*)中Ⅰ组成员仅由Ⅰa 亚组构成[41]。在桑树所有Ⅰa 成员 C 末端及Ⅱb 中 1 个成员的 N 端均发现一个明显的 GGD-FDDNEPEAKR-WKGE 基序[14]。谷彦冰等[42]发现,苹果(*Malus domestica*)基因组中有 132 个 *WRKY* 基因,其中Ⅰ组成员 24 个、Ⅱ组成员 79 个、Ⅲ组成员 29 个。苹果中 *WRKY* 基因家族保守性较高,大部分具有 WRKYGQK 七肽序列和锌指结构。在本研究中,121 个新疆野苹果 WRKY 家族成员可被分为 3 组共计 7 个亚组,Ⅰ组和Ⅲ组分别有 21 和 19 个成员;Ⅱ组成员最多,共有 82 个,包含 5 个Ⅱa 成员、14 个Ⅱb 成员、30 个Ⅱc 成员、19 个Ⅱd 成员和 14 个Ⅱe 成员,共占 WRKY 家族的 71%;这与栽培苹果的 WRKY 分组结果及各组成员分布情况类似,表明 WRKY 家族具有较高的同源性并拥有相似的基因功能。

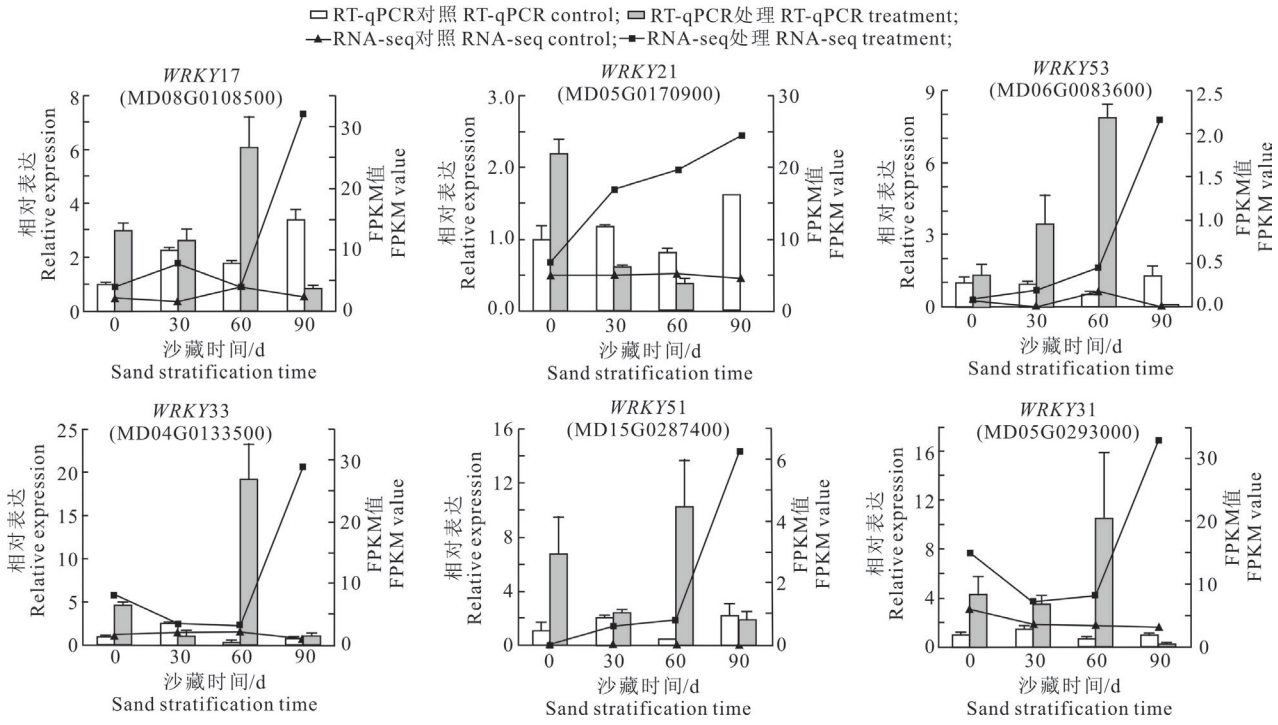


图 8 新疆野苹果低温沙藏层积不同时期 6 个 *WRKY* 基因的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of six *WRKY* genes in different stages of low temperature sand stratification of *Malus sieversii*

本研究中,筛选鉴定出新疆野苹果 *WRKY* 基因共 121 个,而栽培苹果中有 132 个成员。前人研究表明,在进化过程中,*WRKY* 基因家族的扩张从绿藻中的一个或少数几个基因开始,到苔藓等早期陆生植物中的 30 多个基因,再到一些开花植物中的 100 多个基因,这种巨大扩张的贡献者主要是全基因组、片段和串联重复等复制事件[43]。前期研究表明,在一次相对较近的(>5 000 万年)苹果全基因组复制导致了从 9 个祖先染色体到 17 个染色体的转变[44]。进化分析研究表明,含有 2 个结构域的Ⅰ组蛋白最初被归为"祖先形式"[13]。随着克里藻属(*Klebsormidium*)基因组序列的获得,进一步发现Ⅱb 亚组基因也存在于植物进化的早期[45]。Ⅲ组 *WRKY* 基因在植物适应过程中发挥着极其重要的作用,因此发现 *WRKY* 具有进化上的动态性。而在水稻基因组的重复染色体区域存在超过 100 个 *WRKY* 基因,这表明基因组复制是 WRKY 家族扩展的常见机制之一[32,46]。其中,粳稻(*Oryza sativa* ssp. *japonica*)和尼瓦拉野生稻(*Oryza nivara*)中Ⅲ组 *WRKY* 基因的扩增是片段和串联基因复制事

件的结果[47-48]。而本研究发现，新疆野苹果 WRKY Ⅲ组成员比栽培苹果Ⅲ组成员数量少近 1/3，而Ⅰ组和Ⅱ组成员数量变化很小，说明新疆野苹果 *WRKY* 基因的复制和变异可能与其适应性和生态分布密切相关。

许多 WRKY TF 通过识别和结合其自身靶基因或其他 *WRKY* 基因的启动子区 W-box，正向或负向调节各种非生物胁迫应答反应[49-51]。同时，WRKY 转录因子还能够正向或负向调节种子休眠和萌发，可以作为精确调节网络的一部分，适当地介导生命周期的启动，以响应内部和外部条件的变化。在水稻（*Oryza sativa*）中，*OsWRKY*29 作为 ABA 信号抑制因子，能够通过直接下调水稻 ABA 响应基因（*OsABF*1）和 ABA 响应元件结合因子 1（*OsVP*1）的表达来抑制种子休眠。因此，*OsWRKY*29 的敲除会增强种子休眠性，而其过表达品系则显示出种子休眠性降低[52]。在拟南芥中，ABI5 结合蛋白 2（AFP2）与 WRKY36 相互作用，*WRKY*36 识别 DOG1 启动子中的 W-BOX，抑制 *AFP*2 的表达；过表达 *WRKY*36 打破了种子的初级休眠，而 WRKY36 突变体表现出较强的种子初级休眠[53]。在低温胁迫处理下的甘薯（*Ipomoea batatas*）转录组数据中，发现甘薯块根贮藏期有 34 个 *WRKY* 基因差异表达[54]。在短孢炭疽菌侵染番木瓜（*Carica papaya*）的转录组数据中，从番木瓜耐性品种中筛选出了特异表达的 *CpWRKY*2、*CpWRKY*11、*CpWRKY*22、*CpWRKY*25 和 *CpWRKY*33，RT-qPCR 结果表明上述基因在耐性品种中特异上调表达，在敏感性品种中的表达量无明显变化[55]。因此，为明确与新疆野苹果种子休眠解除相关的 *WRKY* 基因，结合 *MsWRKY* 基因在低温沙藏层积过程中的表达情况，探究了该基因在解除种子休眠中的作用。转录组结果表明，低温沙藏层积过程中存在 38 个差异表达基因，同一沙藏时间不同基因在沙藏层积过程中的表达量存在显著差异，但大多数基因在沙藏 90 d 时表达量较高。经 RT-qPCR 验证发现，新疆野苹果种子经低温沙藏层积处理后，与未沙藏种子相比，*WRKY*17、*WRKY*31、*WRKY*33、*WRKY*51 和 *WRKY*53 基因表达量均显著增加。其中，*WRKY*33 在沙藏 60 d 时表达量达到最高，其表达量相较于未沙藏种子显著增加了约 30 倍。有研究表明，对苜蓿（*Medicago sativa*）中与非生物胁迫相关的 WRKY 家族成员进行蛋白互作分析，发现拟南芥 WRKY33 位于蛋白互作网络的中心位置，说明 WRKY33 可以参与多种非生物胁迫反应[56]。例如，经高温处理后，*AtWRKY*33 的表达受到抑制，从而促进了乙烯激活和热休克蛋白相关信号通路之间的协同作用，进而引导细胞对热应激做出反应[57]。同时，*AtWRKY*33 的过表达也会增加拟南芥对盐（NaCl）胁迫的耐受性[57]。因此，鉴于 WRKY 转录因子结构的显著保守性，*MsWRKY*33 可能与 *AtWRKY*33 具有相似的功能。沙藏过程中新疆野苹果种子 *WRKY* 基因表达量的显著增加，可能与种子的低温胁迫响应机制有关。WRKY 转录因子可能在新疆野苹果种子低温沙藏层积休眠解除过程中发挥关键作用，这为新疆野苹果 *WRKY* 基因功能的研究提供了理论基础。

[参考文献]

[1] HARSHMAN J M, EVANS K M, ALLEN H, et al. Fire blight resistance in wild accessions of *Malus sieversii*[J]. Plant Disease, 2017, 101(10): 1738-1745.

[2] 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.

[3] BOSSI F, CORDOBA E, DUPRÉ P, et al. The *Arabidopsis* ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2. 2 genes during sugar signaling[J]. The Plant Journal, 2009, 59(3): 359-374.

[4] BEDI S, SENGUPTA S, RAY A, et al. ABI3 mediates dehydration stress recovery response in *Arabidopsis thaliana* by regulating expression of downstream genes[J]. Plant Science, 2016, 250: 125-140.

[5] 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.

[6] ZHANG Y, ZHAO J Y, TANG G D, et al. Ab initio and DFT studies on vibrational spectra of some halides of group IIIB elements[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2005, 62(1/2/3): 1-10.

[7] CHEN L G, SONG Y, LI S J, et al. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2012, 1819(2): 120-128.

[8] SOHN S I, PANDIAN S, KUMAR T S, et al. Seed dormancy and pre-harvest sprouting in rice: an updated overview[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(21): 11804.

[9] CARRERA-CASTAÑO G, CALLEJA-CABRERA J, PERNAS M, et al. An updated overview on the regulation of seed germination[J]. Plants, 2020, 9(6): 703.

[10] 宋松泉，刘军，徐恒恒，等. 脱落酸代谢与信号传递及其调控种

子休眠与萌发的分子机制[J]. 中国农业科学,2020,53(5):857-873.
SONG S Q,LIU J,XU H H,et al. ABA metabolism and signaling and their molecular mechanism regulating seed dormancy and germination[J]. Scientia Agricultura Sinica,2020,53(5):857-873.

[11] MAHIWAL S,PAHUJA S,PANDEY G K. Review:structural-functional relationship of WRKY transcription factors:unfolding the role of WRKY in plants[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2024,257(Pt 2):128769.

[12] WANG F P,ZHAO P P,ZHANG L,et al. The VvWRKY37 regulates bud break in grape vine through ABA-mediated signaling pathways [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13:929892.

[13] WANG H P,CHEN W Q,XU Z Y,et al. Functions of WRKYs in plant growth and development[J]. Trends in Plant Science, 2023,28(6):630-645.

[14] WANI S H,ANAND S,SINGH B,et al. WRKY transcription factors and plant defense responses:latest discoveries and future prospects [J]. Plant Cell Reports, 2021, 40 (7): 1071-1085.

[15] HUANG Y,FENG C Z,YE Q,et al. *Arabidopsis* WRKY6 transcription factor acts as a positive regulator of abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development[J]. PLoS Genetics,2016,12(2):e1005833.

[16] 肖漫. 天山郁金香种子休眠特性及其相关 *WRKY* 基因分析[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2020.
XIAO M. Dormancy characteristics of tulip seeds in Tianshan Mountains and analysis of related *WRKY* genes[D]. Shenyang:Shenyang Agricultural University,2020.

[17] ZHANG X S. On the eco-geographical characters and the problems of classification of the wild fruit-tree forest in the Ili Valley of Sinkiang[J]. Acta Botanica Sinica,1973,15(2):239-253.

[18] YANG M L,CHE S Y,ZHANG Y X,et al. Universal stress protein in *Malus sieversii* confers enhanced drought tolerance [J]. Journal of Plant Research,2019,132(6):825-837.

[19] WÜRDIG J,FLACHOWSKY H,SASS A,et al. Improving resistance of different apple cultivars using the Rvi6 scab resistance gene in a cisgenic approach based on the Flp/FRT recombinase system[J]. Molecular Breeding,2015,35(3):95.

[20] 胡小平,张吉光,陈婧,等. 新疆野苹果和秦冠的抗黑星病特性[J]. 植物病理学报,2010,40(6):609-614.
HU X P,ZHANG J G,CHEN J,et al. Resistance characteristics of Xinjiang wild apple and Qinguan cultivars to apple scab [J]. Acta Phytopathologica Sinica,2010,40(6):609-614.

[21] LIU X J,LI X S,WEN X J,et al. PacBio full-length transcriptome of wild apple (*Malus sieversii*) provides insights into canker disease dynamic response[J]. BMC Genomics,2021,22(1):52.

[22] BALLESTER A R,NORELLI J,BURCHARD E,et al. Transcriptomic response of resistant (PI613981-*Malus sieversii*) and susceptible ("Royal Gala") genotypes of apple to blue mold (*Penicillium expansum*) infection [J]. Frontiers in Plant Science,2017,8:1981.

[23] SHAN Q J,LING H B,ZHAO H Z,et al. Do extreme climate events cause the degradation of *Malus sieversii* forests in China? [J]. Frontiers in Plant Science,2021,12:608211.

[24] 于婷,胡晓静,邢皓文. 额敏县新疆野苹果种群土壤种子库空间分布特征[J]. 湖北农业科学,2023,62(10):119-123,177.
YU T,HU X J,XING H W. Spatial distribution characteristics of soil seed bank of *Malus sieversii* population in Emin County[J]. Hubei Agricultural Sciences,2023,62(10):119-123,177.

[25] NIU J P,ZHAO L,FAN Y M,et al. The effects of ascorbic acid on breaking the seed dormancy of *Malus sieversii*[J]. Journal of Plant Growth Regulation,2019,38(3):909-918.

[26] 樊永梅. 新疆野苹果种胚萌发过程中乙烯合成和信号转导相关基因表达的研究[D]. 西安:陕西师范大学,2016.
FAN Y M. Study on the expression of genes related to ethylene synthesis and signal transduction during embryo germination of wild apple in Xinjiang[D]. Xi'an:Shaanxi Normal University,2016.

[27] XU J,ZHANG Z F,BAI S L,et al. Recovery and germination of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. (Rosaceae) seeds after ingestion by cattle,horses,and sheep[J]. Sustainability,2022,14(21):13930.

[28] SUN X P,JIAO C,SCHWANINGER H,et al. Phased diploid genome assemblies and pan-genomes provide insights into the genetic history of apple domestication[J]. Nature Genetics,2020,52(12):1423-1432.

[29] CHEN C J,WU Y,LI J W,et al. TBtools-Ⅱ:A "one for all,all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining[J]. Molecular Plant,2023,16(11):1733-1742.

[30] XIE J M,CHEN Y R,CAI G J,et al. Tree visualization by one table (tvBOT):a web application for visualizing,modifying and annotating phylogenetic trees [J]. Nucleic Acids Research,2023,51(W1):W587-W592.

[31] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods,2001,25(4):402-408.

[32] KIDOKORO S,SHINOZAKI K,YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Transcriptional regulatory network of plant cold-stress responses[J]. Trends in Plant Science,2022,27(9):922-935.

[33] RUSHTON P,SOMSSICH I,RINGLER P,et al. WRKY transcription factors[J]. Trends in Plant Science,2010,15(5):247-258.

[34] ROSS C A,LIU Y,SHEN Q J. The *WRKY* gene family in rice (*Oryza sativa*)[J]. Journal of Integrative Plant Biology,2007,49(6):827-842.

[35] 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.

[36] MANGELSEN E,KILIAN J,BERENDZEN K W,et al. Phy-

logenetic and comparative gene expression analysis of barley (*Hordeum vulgare*) WRKY transcription factor family reveals putatively retained functions between monocots and dicots[J]. BMC Genomics,2008,9:194.

[37] PANDEY S P,SOMSSICH I E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity[J]. Plant Physiology,2009,150(4):1648-1655.

[38] SUN S,CHEN H,YANG Z Q,et al. Identification of WRKY transcription factor family genes in *Pinus massoniana* Lamb. and their expression patterns and functions in response to drought stress[J]. BMC Plant Biology,2022,22(1):424.

[39] HUANG S X,GAO Y F,LIU J K,et al. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum* [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2012, 287(6): 495-513.

[40] ZHOU H Y,LI Y X,ZHANG Q,et al. Genome-wide analysis of the expression of WRKY family genes in different developmental stages of wild strawberry (*Fragaria vesca*) fruit[J]. PLoS One,2016,11(5):e0154312.

[41] BARANWAL V K,NEGI N,KHURANA P. Genome-wide identification and structural, functional and evolutionary analysis of WRKY components of mulberry[J]. Scientific Reports,2016,6:30794.

[42] 谷彦冰，冀志蕊，迟福梅，等. 苹果 *WRKY* 基因家族生物信息学及表达分析[J]. 中国农业科学，2015，48(16)：3221-3238.
GU Y B,JI Z R,CHI F M,et al. Bioinformatics and expression analysis of the *WRKY* gene family in apple[J]. Scientia Agricultura Sinica,2015,48(16):3221-3238.

[43] XIE T,CHEN C J,LI C H,et al. Genome-wide investigation of *WRKY* gene family in pineapple: evolution and expression profiles during development and stress[J]. BMC Genomics, 2018,19(1):490.

[44] VELASCO R,ZHARKIKH A,AFFOURTIT J,et al. The genome of the domesticated apple (*Malus*×*domestica* Borkh.) [J]. Nature Genetics,2010,42(10):833-839.

[45] HORI K,MARUYAMA F,FUJISAWA T,et al. Klebsormidium flaccidum genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation [J]. Nature Communications, 2014, 5:3978.

[46] RAMAMOORTHY R,JIANG S Y,KUMAR N,et al. A comprehensive transcriptional profiling of the *WRKY* gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments [J]. Plant & Cell Physiology,2008,49(6):865-879.

[47] XU H J,WATANABE K A,ZHANG L Y,et al. WRKY transcription factor genes in wild rice *Oryza nivara*[J]. DNA Research,2016,23(4):311-323.

[48] WU K L,GUO Z J,WANG H H,et al. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins [J]. DNA Research,2005,12(1):9-26.

[49] 张雪梨，陈英，黄敏仁，等. 杨树干旱胁迫响应转录因子的研究进展 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2023，51(3)：71-83.
ZHANG X L,CHEN Y,HUANG M R,et al. Research progress on drought-responsive transcription factors of *Populus* [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2023,51(3):71-83.

[50] 宰舟颖，王柳，丁卉芬，等. 桂花 *OfWRKY*120 基因鉴定及盐胁迫响应功能研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2024，52(5)：144-154.
ZAI Z Y,WANG L,DING H F,et al. Identification and salt stress response of *OfWRKY*120 gene in *Osmanthus fragrans* [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2024,52(5):144-154.

[51] 于永昂，睢晓淞，张蕾，等. 小麦转录因子 *TaWRKY*28 基因克隆与抗旱性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2022，50(4)：32-41.
YU Y A,SUI X T,ZHANG L,et al. Cloning and function against drought stress of *TaWRKY*28 transcription factor gene[J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed),2022,50(4):32-41.

[52] ZHOU C L,LIN Q B,LAN J,et al. WRKY transcription factor OsWRKY29 represses seed dormancy in rice by weakening abscisic acid response[J]. Frontiers in Plant Science, 2020,11:691.

[53] DENG G L,SUN H Q,HU Y L,et al. A transcription factor WRKY36 interacts with AFP2 to break primary seed dormancy by progressively silencing DOG1 in *Arabidopsis*[J]. New Phytologist,2023,238(2):688-704.

[54] 毕楚韵，黄小芳，王和寿，等. 甘薯全基因组 WRKY 转录因子的基因鉴定与逆境胁迫表达分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2021，49(9)：30-44.
BI C Y,HUANG X F,WANG H S,et al. Identification of WRKY transcription factor genes in *Ipomoea batatas* genome and expression analysis under stresses[J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed),2021,49(9):30-44.

[55] 杨敏，周陈平，杨护，等. 番木瓜 WRKY 转录因子家族基因鉴定及其响应短孢炭疽菌侵染的表达分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2022，50(5)：127-138，154.
YANG M,ZHOU C P,YANG H,et al. Identification of WRKY transcription factor genes in papaya and response of their expression to *Colletotrichum brevisporum* infection[J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed),2022,50(5):127-138,154.

[56] 毛培. 紫花苜蓿 *WRKY* 基因家族鉴定及 *MsWRKY*100 基因耐旱功能研究[D]. 兰州：兰州大学，2022.
MAO P. Identification of *WRKY* gene family in alfalfa and study on drought tolerance of *MsWRKY*100 gene [D]. Lanzhou: Lanzhou University,2022.

[57] LI S J,FU Q T,CHEN L G,et al. *Arabidopsis thaliana* WRKY25,WRKY26,and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance[J]. Planta,2011,233(6):1237-1252.

(责任编辑：窦春蕊)