

菠萝蜜 *WRKY* 基因家族注释及在低温胁迫下的表达模式分析

马湘玮^{1,2}, 朱鹏锦^{1,2*}, 杜英俊^{1,2}, 宋奇琦^{1,2}, 叶维雁^{1,2}, 唐秀观^{1,2},
何江^{1,2}, 钟云婕^{1,2}, 欧景莉^{1,2}, 庞新华^{1,2}

(1. 广西壮族自治区亚热带作物研究所, 南宁 530000; 2. 亚热带特色水果质量安全控制
重点实验室, 南宁 530000)

摘要: *WRKY* 转录因子家族在植物生物和非生物胁迫响应过程中发挥着重要作用, 该研究基于菠萝蜜全基因组, 共注释出 61 个菠萝蜜 (*Artocarpus heterophyllus*) *WRKY* 家族成员, 并利用生物信息学方法和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术分析 *WRKY* 家族成员在不同品种菠萝蜜低温胁迫下的表达特征。结果表明: (1) 进化树分析表明菠萝蜜、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和水稻 (*Oryza sativa*) *WRKY* 家族成员被分为 4 个亚族。(2) 染色体定位结果显示, 61 个菠萝蜜 *WRKY* 家族成员不均匀的分布在 23 条染色体上。(3) 保守基序和基因结构分析表明, 位于同一亚族的菠萝蜜 *WRKY* 家族成员具有相似的保守基序和基因结构。(4) 进化分析显示, 菠萝蜜 *WRKY* 家族成员在物种内存在 124 对片段复制基因对, 物种间分析表明, 菠萝蜜与拟南芥之间的同源基因对较多, 而与水稻和无花果 (*Ficus carica*) 之间的同源基因对较少且有 8 个基因在 3 个物种中形成同源基因对。(5) 低温胁迫下不同品种菠萝蜜转录组分析结果表明, 菠萝蜜 *WRKY* 家族成员在不同品种中的表达模式存在差异, qRT-PCR 分析进一步验证这一结果, 说明 *WRKY* 家族成员在不同品种菠萝蜜响应低温胁迫的过程中发挥功能。该研究为了解 *WRKY* 家族成员的进化和功能提供了新的见解, 为菠萝蜜 *WRKY* 家族成员的功能研究和利用奠定了基础。

关键词: 菠萝蜜, *WRKY* 基因家族, 低温胁迫, 表达模式, 生物信息学分析

中图分类号: Q943

文献标识码: A

Identification and expression pattern analysis of *WRKY* gene family in jackfruit under low temperature stress

MA Xiangwei^{1,2}, ZHU Pengjin^{1,2*}, DU Yingjun^{1,2}, SONG Qiqi^{1,2}, YE Weiyuan^{1,2},
TANG Xiuguan^{1,2}, HE Jiang^{1,2}, ZHONG Yunjie^{1,2}, OU Jingli^{1,2}, PANG Xinhua^{1,2}

(1. Guangxi Institute of Subtropical Crops, Nanning 530000, China; 2. Guangxi Key
Laboratory of Quality and Safety Control for Subtropical Fruits, Nanning 530000, China)

Abstract: The *WRKY* genes of transcription factors plays an important role in plant biological and abiotic stress responses, a total of 61 members of the *WRKY* genes of that jackfruit (*Artocarpus*

基金项目: 广西重点研发计划(桂科 AB21220003); 桂农科(2023YM15); 桂农科盟(202404)。

第一作者: 马湘玮(1997—), 硕士, 主要从事热带果树生物技术研究, (E-mail) www.11417@vip.qq.com。

***通信作者:** 朱鹏锦, 硕士, 高级农艺师, 主要从事热带果树种质资源创新与利用, (E-mail) zhupengjin04@163.com。

heterophyllus) were identified based on the whole genome of jackfruit and the expression profile of *WRKY* genes in jackfruit under low temperature stress were analyzed by bioinformatics method and real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The results were as follow: (1) Phylogenetic tree analysis showed that jackfruit, *Arabidopsis thaliana* and rice (*Oryza sativa*) *WRKY* genes were divided into four subfamilies. (2) Chromosome localization showed that 61 *AhWRKY* genes were unevenly distributed on 23 chromosomes. (3) Analyses of conserved motifs and gene structure showed that *AhWRKY* genes located in the same subfamily had similar conserved motifs and gene structure. (4) Phylogenetic analysis revealed 124 pairs of fragment duplicated genes within *AhWRKY* genes. Inter-species analysis showed jackfruit exhibits a greater number of homologous gene pairs with *Arabidopsis thaliana* than rice and fig (*Ficus carica*), and 8 genes formed homologous gene pairs in *Arabidopsis thaliana*, rice and fig. (5) Transcriptomic analysis of different varieties of jackfruit under low temperature stress showed that there the expression patterns of *WRKY* genes differed in different varieties. Moreover, qRT-PCR analysis further verified this result, indicating that *WRKY* genes play a role in response to low temperature stress in jackfruit of different varieties. This study provides new insights into the evolution and function of *WRKY* genes, and lays a foundation for functional research and utilization of *WRKY* genes in jackfruit.

Key word: jackfruit, *WRKY* gene family, low temperature stress, expression pattern, bioinformatics analysis

高等植物通过调控内部信号通路和网络来响应外界胁迫,而这些信号通路和网络由转录因子(transcriptional factors, TF)协调完成(Jiang et al., 2015)。*WRKY* 转录因子家族是植物中最大的转录因子家族之一,在生物和非生物胁迫响应过程中起着关键作用(Rushton et al., 2010)。*WRKY* 蛋白是包含特殊结构域的转录因子,由于其 N 末端结构域(N-terminal domain, NTD)具有保守的 WRKYGQK 氨基酸核心序列,因此被称为 WRKY 蛋白(Chen et al., 2012)。*WRKY* 蛋白通过结合启动子中的 W-box 基序(TTGACC/T)来调节下游基因的表达,根据 *WRKY* 蛋白的序列特征可将其分为三组:第 1 组含有 2 个 *WRKY* 结构域,第 2 组和第 3 组均含有 1 个 *WRKY* 结构域。然而,II 族蛋白的羧基末端(C-terminal)含有 C2H2 (C-X4-5-C-X22-23-H-X1-H)的锌指结构,III 族具有 C2HC (C-X7-C-X23-H-X1-C)的锌指结构。根据系统发育关系,II 族蛋白可进一步分为 5 个亚群:II a、II b、II c、II d 和 II e(Eulgem et al., 2000; Jiang et al., 2017)。

低温胁迫影响植物生长发育过程,前人研究表明,*WRKY* 家族成员通过不同的信号转导

途径参与低温胁迫反应，并在植物响应低温胁迫的过程中发挥重要作用(Ramamoorthy et al., 2008; Wang F et al., 2012; Li et al., 2013; Zhang et al., 2016; Wang et al., 2020)。在马鞭草 (*Verbena bonariensis*) 中, *VbWRKY32* 作为正调节因子, 上调低温胁迫相关基因的转录水平, 并提高马鞭草的抗氧化能力, 维持膜稳定性, 增强渗透调节能力, 从而提高马鞭草在低温胁迫下的生存能力(Wang et al., 2020)。紫菜薹 (*Brassica campestris*) *WRKY46* 基因同时响应低温胁迫和脱落酸 (abscisic acid, ABA) 的调节, 激活 ABA 信号通路中相关基因的表达, 并提高紫菜薹的低温耐受性(Wang F et al., 2012)。黄瓜(*Cucumis sativus*) *WRKY* 家族成员 *CsWRKY46* 在冷胁迫和 ABA 处理下表达上调且 *CsWRKY46* 仅在细胞核中表达, 与 ABI5 启动子中的 W-box 相互作用。同时, 过表达 *CsWRKY46* 在拟南芥冷冻处理后幼苗成活率高, 且活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 相关指标脯氨酸含量升高, 相对电解质含量降低, 丙二醛含量降低(Zhang et al., 2016)。在水稻 (*Oryza sativa*) *WRKY* 家族中大部分 (54/103) *OsWRKY* 基因在盐胁迫、干旱胁迫和低温胁迫处理后表达水平发生显著变化(Ramamoorthy et al., 2008)。玉米 (*Zea mays*) *ZmWRKY33* 响应高盐、脱水、低温和 ABA 等非生物胁迫, 且过表达 *ZmWRKY33* 增强拟南芥的耐盐性(Li et al., 2013)。此外, *WRKY* 基因家族成员在不同品种的三叶木通 (*Akebia trifoliata*) 中对炭疽病的响应程度不同, 在易感病品种中差异表达, 在抗性品种中差异表达(Wen et al., 2019)。目前, *WRKY* 基因家族成员的功能在许多植物中已被报道, 而在菠萝蜜中功能还有待发掘。

菠萝蜜 (*Artocarpus heterophyllus*) 属于桑科, 最重要的常绿树木之一, 菠萝蜜树可以种植在贫瘠的土壤, 且因其种植和收获的灵活性, 菠萝蜜树已成为热带和亚热带地区生长最快且最常见的果树。然而, 低温是影响菠萝蜜生长发育的关键因素, 当温度低于 5~7 °C 时, 菠萝蜜不易开花结果(宋奇琦等, 2021)。近年来, 广西菠萝蜜种植规模不断扩大, 低温胁迫已成为制约广西菠萝蜜产业发展的重要因素(卢艳春等, 2021)。因此, 挖掘菠萝蜜抵御低温胁迫过程中的关键基因, 将有利于菠萝蜜抗寒种质资源的高效筛选。本研究以菠萝蜜全基因组(Lin et al., 2022)和低温胁迫下不同品种菠萝蜜中 *WRKY* 基因家族成员的 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Million base pairs sequenced) 值为材料, 采用生物信息学分析和荧光定量 PCR 技术 (Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR), 拟探讨以下问题:

(1) 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员的保守结构域等生物信息学特性分析; (2) 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员的系统发育分析; (3) 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员物种内和不同物种间的共线性分析; (4) 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员在低温胁迫下不同品种菠萝蜜中表达模式分析。以期通过分子生物学技术, 为培育菠萝蜜新品种提供新见解。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料采用广西亚热带作物研究所 (108° 20' 34.8" E、2° 53' 56.4" N) 菠萝蜜种质资源圃中保存的广西本地菠萝蜜品系 (GX) 和泰国引进菠萝蜜品系 (THA), 在自然条件下

(2022 年 2 月 19—24 日) 低温胁迫后, 南宁市持续低温, 日最低气温 3 °C, 日最高气温 15 °C。菠萝蜜树冠温度日最低温度为 3.5 °C, 日最高温度为 14 °C。采集两个品种的叶片(从上到下计数每枝上的第一片叶子)。收集到的材料保存于-80 °C 冰箱, 用于 RNA 提取。每个实验设置三次生物学重复。

1.2 方法

1.2.1 菠萝蜜 WRKY 基因家族的注释和理化性质分析

从 NCBI(Schoch et al., 2020) 数据库 (National Center for Biotechnology Information Sequence Read Archive database) 下载‘S10’菠萝蜜基因组(Lin et al., 2022) (登录号为: PRJNA788174 和 PRJNA791757)。从在线网站 TAIR(Swarbreck et al., 2007) (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>) 下载拟南芥 *WRKY* 基因家族序列信息, 作为 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 的探针序列 ($E < 0.001$)。从在线网站 Pfam(Bateman et al., 2004) (<http://pfam.xfam.org/>) 下载 *WRKY* 保守结构域 (PF03106), 用于进一步注释菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员。利用 TBtools(Chen et al., 2020) 的 Protein Paramter Calc 对菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员相关理化性质进行分析。

1.2.2 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族系统进化分析

利用在线网站 FTP Download (<http://plants.ensembl.org/info/data/ftp/index.html>) 下载水稻 *WRKY* 基因家族成员序列, 通过 MEGA X(Kumar et al., 2018) 软件邻近法和 1 000 次自展法系数(bootstrap) 构建菠萝蜜、拟南芥和水稻 *WRKY* 系统发育进化树, 在线网站 iTOL(Letunic & Bork, 2021) (<https://itol.embl.de>) 用于进化树美化。

1.2.3 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族保守基序和基因结构分析

采用在线网站 MEME(Bailey et al., 2015) (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 分析 *WRKY* 基因家族蛋白保守基序, 利用菠萝蜜基因组 gff3 文件, 通过 TBtools 软件的 Gene Structure Display Server 可视化分析, 参数默认。

1.2.4 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族染色体定位和共线性分析

利用菠萝蜜基因组 gff3 文件, 通过 TBtools 软件的 Gene Location Visualization from GTF/GFF 功能, 将菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员的位置信息可视化, 使用 TBtools 软件的 One Step MCScanX 分析 *AhWRKY* 物种内共线性基因对, 并使用 TBtools 软件的 Advanced Circos 将结果可视化。使用 TBtools 软件的 One Step MCScanX 功能分析菠萝蜜与拟南芥、水稻和无花果物种间的共线性基因对, 并使用 TBtools 软件的双系统图 for MCScanX 可视化结果。

1.2.5 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族在低温胁迫下的表达模式分析

从杜英俊已发表的低温胁迫下不同品种菠萝蜜转录组数据(杜英俊等, 2023)中, 提取 *AhWRKY* 基因家族成员在 GX 菠萝蜜和 THA 菠萝蜜中的 FPKM 值, 并利用 TBtools 软件的 HeatMap 功能绘制热图。

使用 HiScript Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒（诺维赞，南京）提取 GX 菠萝蜜和 THA 菠萝蜜的总 RNA，使用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 试剂盒（诺维赞，南京）进行 cDNA 合成，将其稀释 10 倍后作为扩增模板，于 QuantStudio 5 Real-Time PCR 仪器中进行 qRT-PCR（Quantitative Real-time PCR）验证（表 1），以 Tubulin 为低温胁迫下不同品种波罗蜜过程 qRT-PCR 的内参基因，反应程序：95 °C 预变性 30 s，95 °C 变性 10 s，60 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，共 50 个循环，重复 3 次。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *AhWRKY* 基因的相对表达量。采用 Duncan 检验的单向方差分析来确定显著差异。将数据导入 IBM SPSS Statistics 16.0 进行统计学分析(Student's *t* 检验，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ，**** $P<0.0001$)，并使用 GraphPad Prism 9 进行图形化显示。

1.2.6 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族在低温胁迫下的表达模式分析

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequence

引物 Primer	正向引物序列 Positive primer sequence (5'→3')	反向引物序列 Reverse primer sequence (5'→3')	产物大小 Product size (bp)
<i>AhWRKY1</i>	GCCGCTTTCCTCGACTAC	CCTCTGTTTCCTTTTCTTGGT	124
<i>AhWRKY2</i>	ACGGACAGAAACCCATCA	TTCGTAGGTCACCACAAGC	134
<i>AhWRKY3</i>	CGAGGTTGAAGAGGGTAGTT	TGATGGGTTTCTGTCCGT	102
<i>AhWRKY6</i>	GAGAAAGTGAATTGCGAGATAG	ATGGTTTGAGGTCCAGTGTT	151
<i>AhWRKY10</i>	TGGAAATAATTCGGAGGATAAC	TGTGAAACTGACTAAGCAAACC	122
<i>AhWRKY11</i>	GCCAACTCCAAAACCCTAA	TACTGACTCGCCGACAACT	242
<i>AhWRKY12</i>	GAAAACGAAAGATTAAAGGTGC	TCCAAGGCTGAGGGAAAC	186
<i>AhWRKY18</i>	AGCATTATCCCCATCATCA	TCCCCAAGAAAGTGTCGC	196
<i>AhWRKY31</i>	CATTATCCCCATCAGCAA	AGTAAAGCCATCTTACCCT	160
<i>AhWRKY37</i>	CCAGCGGTTGAAACAGGA	CCAGAGGCGAGACGAAGA	228
<i>AhWRKY39</i>	TAAGAAACCAAGGGAAGAACC	AAACGAGCATTTGAAGTAAGC	169
<i>AhWRKY47</i>	GAGACGAAGAAGACGAAAATC	TCCCGTGACAGACGACAAA	108
<i>AhWRKY54</i>	TGGCAATCCCCAAATAAT	TCCAGAAATGGCAGCAGA	133
<i>AhWRKY57</i>	AGAAAGAGTCAGGCAAAGAAG	CCAAGCCCAAAGATCAGA	99

2 结果与分析

2.1 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族的注释和理化性质分析

利用拟南芥 *WRKY* 蛋白（protein encoding sequence，PEP）序列与菠萝蜜基因组进行 BLAST 获得候选基因序列，并利用 Pfam 在线网站对 *WRKY* 基因家族保守结构域进行鉴定（PF03106）。在菠萝蜜中注释出 61 个 *WRKY* 基因家族成员（表 2），根据其在染色体上的

位置分布情况，将菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员命名为 *AhWRKY1-61*。其蛋白理化性质分析显示菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员氨基酸数目在 227~763 aa 之间，分子质量在 2.56~8.24 kD 之间，理论等电点在 5.08~9.8 之间，不稳定系数都在 40 以上，亚细胞定位预测显示，菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员都定位在细胞核中，这一结果可能和 *WRKY* 基因家族成员的功能相关。

表 2 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员信息

Table 2 Information of *WRKY* gene family member in jackfruit

基因名称 Gene name	基因 ID 号 Gene ID	氨基酸数 目 Number of amino acids	分子量 Molecular weight (kD)	理论等电 点 Theoretical pI	不稳定系 数 Instability index	脂溶指 数 Aliphatic index	亲水性 Grand average of hydropathicity	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>AhWRKY1</i>	AHE.Chr01.874	318	34 510.00	9.75	52.30	65.03	-0.602	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY2</i>	AHE.Chr02.677	335	36 083.83	9.63	53.38	61.19	-0.656	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY3</i>	AHE.Chr02.686	331	35 582.34	9.74	50.77	63.99	-0.588	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY4</i>	AHE.Chr03.1156	363	39 123.91	6.37	51.69	53.58	-0.693	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY5</i>	AHE.Chr04.1330	364	39 116.04	6.5	50.36	58.27	-0.558	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY6</i>	AHE.Chr05.147	291	31 827.22	9.54	47.38	62.03	-0.589	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY7</i>	AHE.Chr05.1479	552	59 950.37	5.99	42.47	67.17	-0.684	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY8</i>	AHE.Chr05.1556	566	61 226.54	6.42	52.3	60.8	-0.722	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY9</i>	AHE.Chr05.1745	739	79 524.98	6.07	52.8	62.84	-0.649	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY10</i>	AHE.Chr05.715	497	54 825.10	6.43	49.83	60.06	-0.960	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY11</i>	AHE.Chr06.1119	557	60 782.20	5.93	44.26	65.17	-0.719	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY12</i>	AHE.Chr06.116	289	31 558.91	9.8	44.82	63.88	-0.563	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY13</i>	AHE.Chr06.1239	573	62 393.73	6.2	51.89	61.92	-0.738	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY14</i>	AHE.Chr06.1534	763	82 438.06	5.77	54.27	63.34	-0.650	细胞核 Nucleus

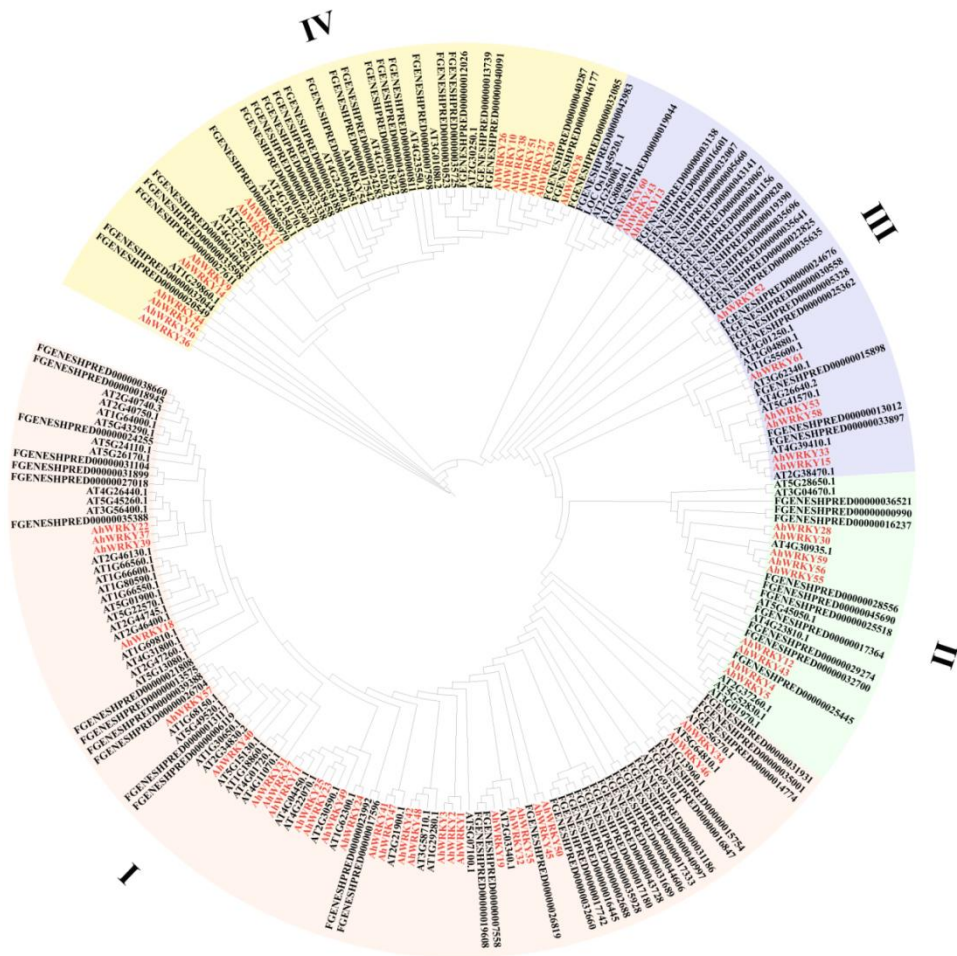
<i>AhWRKY15</i>	AHE.Chr06.438	500	55 787.81	5.53	59.63	59.48	-1.031	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY16</i>	AHE.Chr07.1835	232	26 214.74	6.7	50.24	50.43	-0.911	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY17</i>	AHE.Chr07.2561	369	39 220.38	9.59	48.39	63.28	-0.431	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY18</i>	AHE.Chr07.609	312	34 590.11	6.2	50.14	76.51	-0.526	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY19</i>	AHE.Chr07.746	378	41 359.5	9.48	54.19	63.76	-0.703	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY20</i>	AHE.Chr08.1114	227	25 581.13	7.16	53.27	48.11	-0.907	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY21</i>	AHE.Chr08.2277	359	38 315.29	9.73	51.15	61.17	-0.538	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY22</i>	AHE.Chr08.680	382	41 852.09	9.46	47.75	64.37	-0.664	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY23</i>	AHE.Chr09.517	365	40 730.87	9.73	57.6	67.86	-0.807	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY24</i>	AHE.Chr10.1618	549	60 612.25	5.28	48.65	65.39	-0.817	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY25</i>	AHE.Chr10.43	359	39 916.26	6.71	49.32	53.57	-0.863	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY26</i>	AHE.Chr10.434	359	39 969.23	9.76	55.84	68.72	-0.742	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY27</i>	AHE.Chr11.1245	579	63 298.80	6.98	60.96	48.38	-0.956	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY28</i>	AHE.Chr11.495	587	64 453.80	5.74	56.36	65.3	-0.652	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY29</i>	AHE.Chr12.1163	572	62 519.04	6.93	66.44	48.09	-0.938	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY30</i>	AHE.Chr12.280. 1	593	65 284.76	6.45	53.73	61.15	-0.695	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY31</i>	AHE.Chr13.1015	568	62 050.49	6.08	49.25	66.83	-0.722	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY32</i>	AHE.Chr13.854	496	53 332.34	6.41	56.33	50.2	-0.837	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY33</i>	AHE.Chr13.884	312	33 774.29	5.73	58.67	58.14	-0.683	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY34</i>	AHE.Chr14.482	595	64 583.99	5.69	47.99	61.83	-0.769	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY35</i>	AHE.Chr14.615	513	55 516.81	6.1	60.78	53.29	-0.861	细胞核 Nucleus

AhWRKY36	AHE.Chr14.648	309	33 529.97	5.46	55.55	55.24	-0.713	细胞核 Nucleus
AhWRKY37	AHE.Chr17.1201	361	40 416.76	5.24	52.71	64.02	-0.671	细胞核 Nucleus
AhWRKY38	AHE.Chr17.311	381	42 623.00	9.33	60.25	43.46	-1.134	细胞核 Nucleus
AhWRKY39	AHE.Chr18.451	357	40 012.32	5.35	51.35	62.8	-0.71	细胞核 Nucleus
AhWRKY40	AHE.Chr19.808	653	70 868.74	6.23	51.76	56.54	-0.771	细胞核 Nucleus
AhWRKY41	AHE.Chr21.1023	590	64 371.79	7.03	50.48	66.39	-0.659	细胞核 Nucleus
AhWRKY42	AHE.Chr21.1388	269	29 160.18	5.08	59.93	62.71	-0.595	细胞核 Nucleus
AhWRKY43	AHE.Chr21.1618	372	41 610.71	8.69	45.05	65.86	-0.905	细胞核 Nucleus
AhWRKY44	AHE.Chr21.333	454	49 066.64	7.27	54.77	71.37	-0.516	细胞核 Nucleus
AhWRKY45	AHE.Chr21.787	497	53 889.26	7.02	55.71	54.43	-0.835	细胞核 Nucleus
AhWRKY46	AHE.Chr22.1375	329	36 799.00	8.74	44.73	62.37	-0.926	细胞核 Nucleus
AhWRKY47	AHE.Chr22.1797	596	64 842.12	7.31	49.23	63.24	-0.677	细胞核 Nucleus
AhWRKY48	AHE.Chr22.2153	265	28 897.02	5.35	64.12	60.00	-0.678	细胞核 Nucleus
AhWRKY49	AHE.Chr22.527	469	50 975.04	7.29	55.44	70.3	-0.598	细胞核 Nucleus
AhWRKY50	AHE.Chr22.672	497	53 974.10	7.32	58.85	54.43	-0.855	细胞核 Nucleus
AhWRKY51	AHE.Chr22.722	559	62 193.78	6.01	59.06	44.11	-0.999	细胞核 Nucleus
AhWRKY52	AHE.Chr23.1081	355	39 695.57	7.57	42.65	66.48	-0.710	细胞核 Nucleus
AhWRKY53	AHE.Chr23.1552	287	32 051.41	5.67	63.63	55.05	-0.914	细胞核 Nucleus
AhWRKY54	AHE.Chr23.1898	535	58 240.71	6.06	49.57	56.19	-0.835	细胞核 Nucleus
AhWRKY55	AHE.Chr23.196	636	68 411.74	6.53	45.32	63.79	-0.661	细胞核 Nucleus
AhWRKY56	AHE.Chr23.226	636	68 412.73	6.42	45.53	63.79	-0.661	细胞核 Nucleus

<i>AhWRKY57</i>	AHE.Chr24.1044	239	26 408.58	9.2	45.17	57.15	-0.814	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY58</i>	AHE.Chr24.1582	284	31 714.00	5.96	60.99	51.13	-0.893	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY59</i>	AHE.Chr24.184	632	67 978.79	6.26	46.35	62.63	-0.698	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY60</i>	AHE.Chr25.124. 1	491	55 048.84	9.2	52.37	48.43	-1.085	细胞核 Nucleus
<i>AhWRKY61</i>	AHE.Chr26.132. 1	435	48 647.81	9.37	50.11	47.03	-1.134	细胞核 Nucleus

2.2 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族系统进化分析

为探究菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员的系统进化关系，对 61 个菠萝蜜 *AhWRKY* 蛋白、72 个拟南芥 *AtWRKY* 蛋白和 93 个水稻 *OsWRKY* 蛋白的系统进化关系进行分析，并利用 MEGA X 构建系统发育进化树（图 1）。结果显示，3 个物种中的 *WRKY* 基因家族成员被分为 I、II、III、IV 亚族，*AhWRKY* 基因家族成员在每个亚族中分别有 27 个、9 个、9 个、22 个成员，与水稻相比，菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员与拟南芥 *WRKY* 基因家族成员密切相关，说明其与双子叶植物的亲缘关系更近。



肉粉色为 I 亚族、薄荷绿为 II 亚族、浅紫色为 III 亚族和黄色为 IV 亚族。
Meat pink for subgroup I, mint green for subgroup II, light purple for subgroup III, and yellow for subgroup IV.

图 1 菠萝蜜、拟南芥和水稻的 *WRKY* 基因家族成员系统进化分析

Fig.1 Phylogenetic tree of *WRKY* gene family member in jackfruit, *Arabidopsis thaliana* and rice

2.3 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族染色体定位

通过 TBtools 对菠萝蜜 61 个 *WRKY* 基因家族成员进行染色体定位分析（图 2），结果表明,61 个 *WRKY* 基因分别定位于 28 条染色体中的 23 条。其中 22 号染色体上有 6 个 *AhWRKY* 基因，1 号、3 号、4 号、9 号、18 号、19 号、25 号和 26 号染色上都只有一个 *AhWRKY* 基因。此外，*AhWRKY* 基因家族成员在每条染色体上不均匀分布且没有出现小型的基因簇，推测各基因之间的功能有差异。

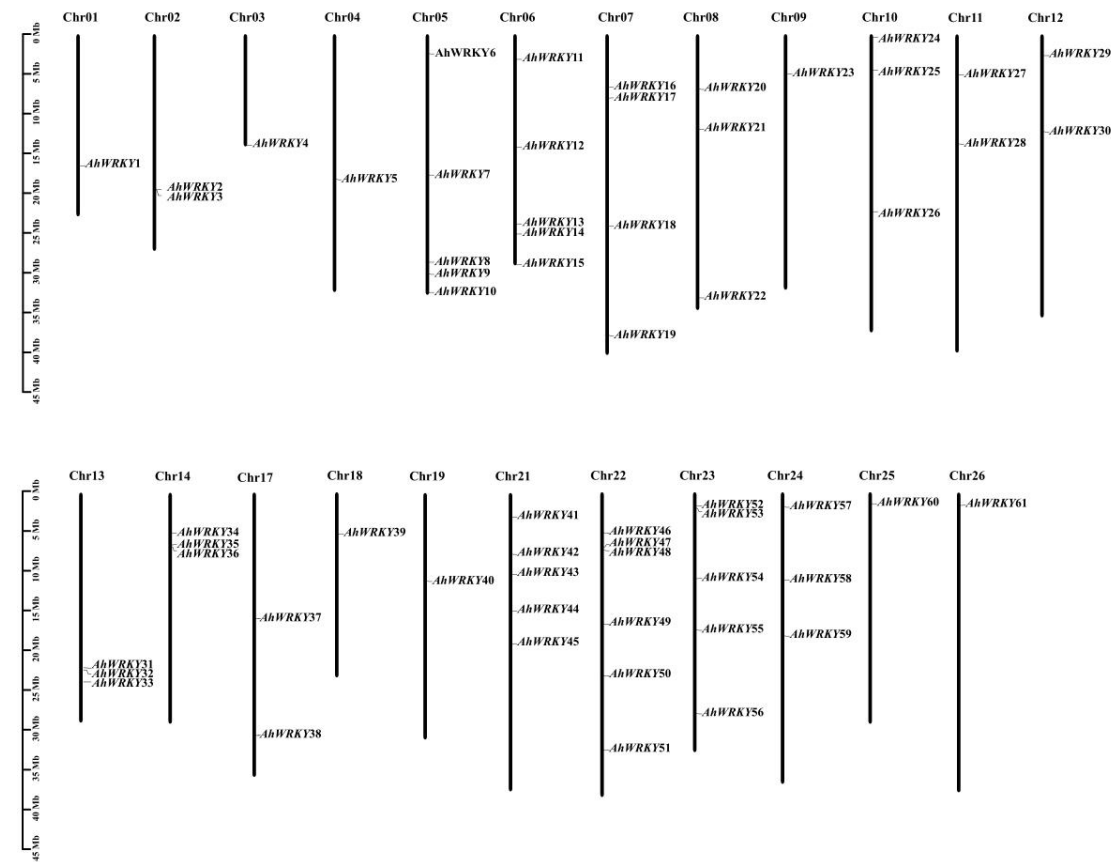


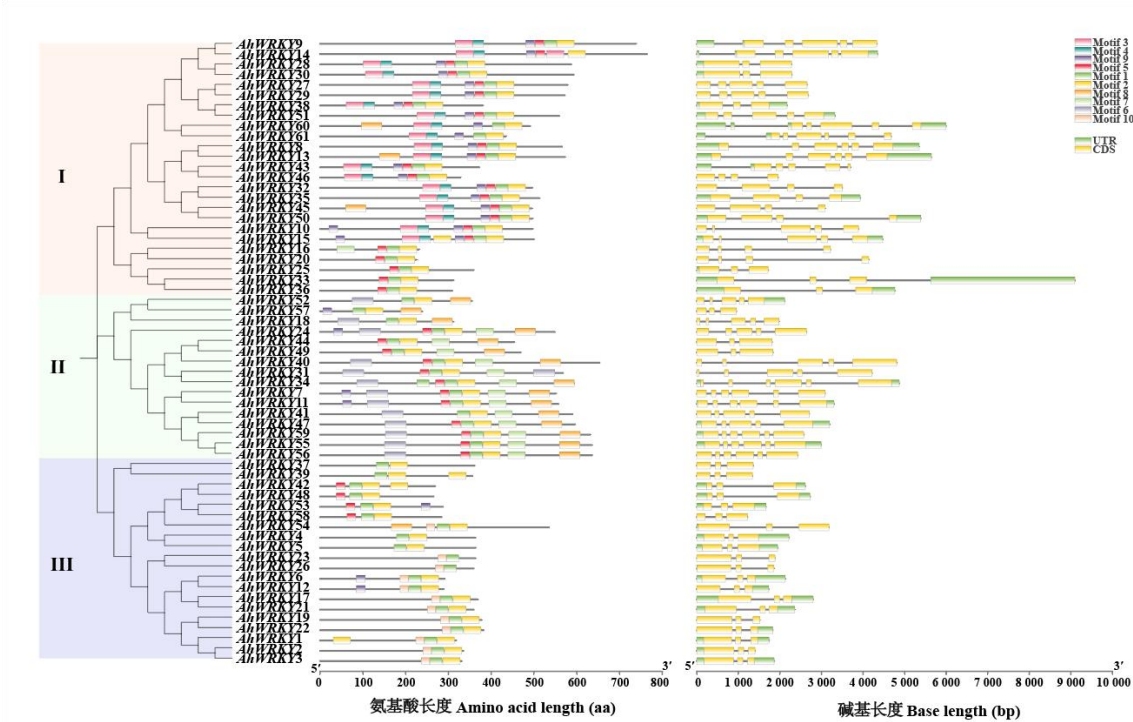
图 2 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员染色体定位分析

Fig. 2 Chromosomal localization of *WRKY* gene family member in jackfruit

2.3 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族保守基序和基因结构分析

为进一步探究菠萝蜜 *WRKY* 基因家族的结构特征,利用 MEME 在线网站分析和 TBtools 可视化菠萝蜜 *WRKY* 基因的保守基序 Motif。由图 3 可知，位于同一亚族 *AhWRKY* 基因家族成员基本含有相同的 Motif，如 I 亚族中的 *AhWRKY*16、20、25、33、36 不含有 Motif 3、6 和 9，II 亚族中的 *AhWRKY*7、11、57、24 含有 Motif 9，而 *AhWRKY*55 和 *AhWRKY*56 不含有 Motif 9，III 亚族中 *AhWRKY*42、48、53、58 含有 Motif 5，而 *AhWRKY*6 和 *AhWRKY*12 含有 Motif 9，说明同一亚族中 *AhWRKY* 基因的功能可能有差异。

基因结构分析表明，菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员的内含子数量在 2~6 之间，第 I 亚族和第 II 亚族成员的内含子普遍都在 2~5 之间，而第 III 亚族中 *AhWRKY* 都只含有 2 个内含子，这一结果表明 *AhWRKY* 基因家族不同成员功能存在差异。此外，*AhWRKY* 基因家族所有成员的 CDS 区域被至少两个内含子分割，说明该家族在进化过程中存在功能分化。



肉粉色为 I 亚族、薄荷绿为 II 亚族和浅紫色为 III 亚族。

Meat pink for subgroup I, mint green for subgroup II, and light purple for subgroup III.

图 3 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员保守基序和基因结构分析

Fig. 3 Conserved motif and gene structure of *WRKY* gene family member in jackfruit

2.4 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族共线性关系

在植物基因组中，串联重复事件是促使植物进化的主要因素，在物种多样性方面起着重要作用(Wang Y et al., 2012)。利用 TBtool 软件的 One Step MCScanX 功能对 *AhWRKY* 基因家族成员物种内的基因片段复制事件进行分析，由图 4 可知，菠萝蜜 *WRKY* 基因间存在 124 对共线性基因对。值得注意的是，菠萝蜜 *WRKY* 基因间存在大量的共线性基因对，说明片段串联重复事件可能在 *WRKY* 家族进化过程中发挥重要作用。

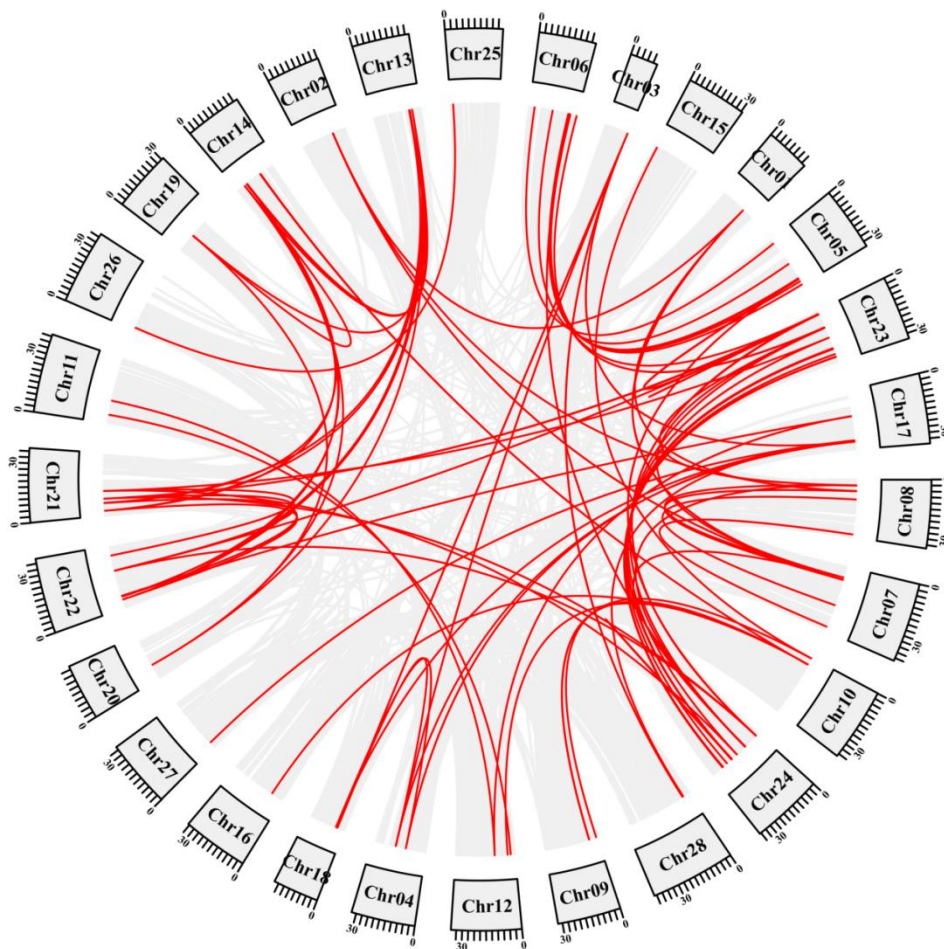


图 4 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员共线性关系

Fig. 4 The syntenic relationship of *WRKY* gene family member in jackfruit

2.5 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族物种间共线性分析

为探究菠萝蜜 *WRKY* 基因家族在物种间的进化关系，对菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员物种间的基因片段复制事件进行分析。由图 5 可知，菠萝蜜与拟南芥之间有 25 个同源基因对，分布在 5 号、7 号、13 号、14 号、19 号、21 号、22 号和 23 号染色体上；菠萝蜜与水稻之间有 4 个同源基因对，分布在 12 号、23 号和 24 号染色体上；菠萝蜜与无花果之间有 8 个同源基因对，分布在 7 号、21 号、22 号、23 号和 24 号染色体上。值得注意的是，菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员中有 8 个基因在 3 个物种中形成同源基因对，分别为 *AhWRKK53* 和 *AhWRKK58* 与拟南芥和水稻形成同源基因对；*AhWRKK18*、*AhWRKK52*、*AhWRKK54*、*AhWRKK55*、*AhWRKK56* 和 *AhWRKK59* 与拟南芥和无花果形成同源基因对。说明上述 8 个基因可能在高等植物演化过程中起到重要作用。

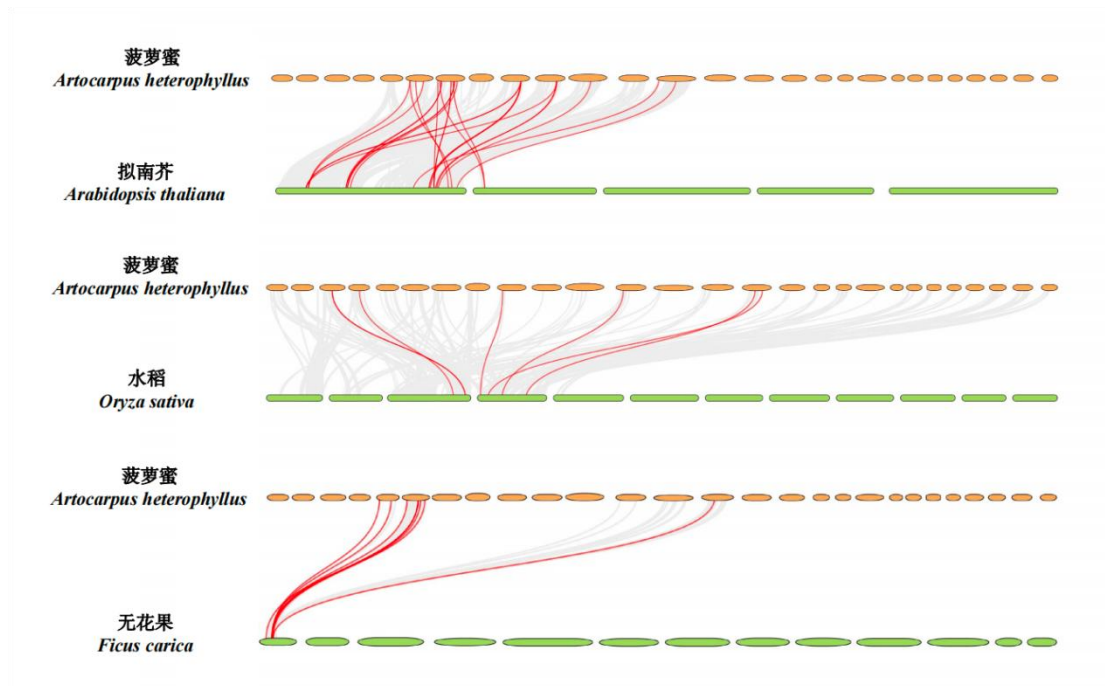
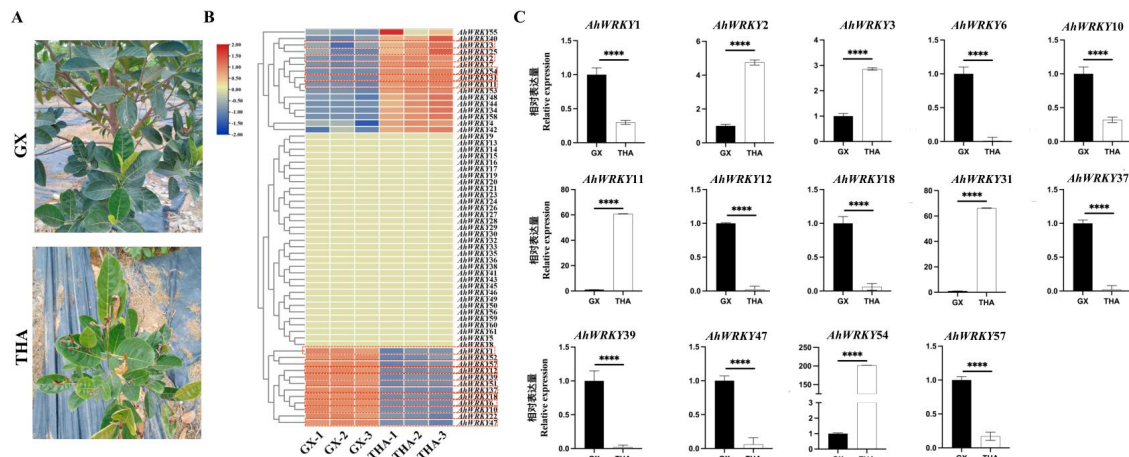


图 5 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员物种间共线性分析

Fig. 5 The syntenic relationship of *AhWRKY* gene family member between different species
2.6 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族在低温胁迫下的表达模式分析

RNA 测序 (RNA sequencing, RNA-Seq) 手段是研究转录组学的主要方法之一, 通过分析转录物的结构和表达水平, 来发现未知和罕见的转录物, 并准确识别可变剪切位点和编码序列单核苷酸多态性, 从而提供最全面的转录组信息(Marguerat & Bähler, 2010)。利用已发表的低温胁迫下不同品种菠萝蜜转录组数据, 分析 *WRKY* 基因家族成员在不同品种中的表达模式。由图 6: B 可知, *WRKY* 基因在不同品种中的表达量差异较大, 说明其在不同品种菠萝蜜中的功能可能有所不同, 其中 *AhWRKY55*、*AhWRKY40*、*AhWRKY3*、*AhWRKY25*、*AhWRKY2*、*AhWRKY7*、*AhWRKY54*、*AhWRKY31*、*AhWRKY11*、*AhWRKY53*、*AhWRKY48*、*AhWRKY44*、*AhWRKY34*、*AhWRKY58*、*AhWRKY4* 和 *AhWRKY42* 在 THA 菠萝蜜中高表达, *AhWRKY1*、*AhWRKY52*、*AhWRKY57*、*AhWRKY12*、*AhWRKY39*、*AhWRKY51*、*AhWRKY37*、*AhWRKY18*、*AhWRKY6*、*AhWRKY10*、*AhWRKY22* 和 *AhWRKY47* 在 GX 菠萝蜜中高表达。

为进一步验证转录组数据的准确性, 筛选出差异表达基因进行 qRT-PCR 分析, 由图 6: C 可知, *AhWRKY1*、*AhWRKY6*、*AhWRKY10*、*AhWRKY12*、*AhWRKY18*、*AhWRKY37*、*AhWRKY39*、*AhWRKY47* 和 *AhWRKY57* 的表达量在 THA 菠萝蜜中显著下调, *AhWRKY2*、*AhWRKY3*、*AhWRKY11*、*AhWRKY31* 和 *AhWRKY54* 的表达量在 THA 菠萝蜜中显著上调, 这一结果与低温胁迫下不同品种菠萝蜜转录组数据一致。值得注意的是, *AhWRKY6*、*AhWRKY11*、*AhWRKY12*、*AhWRKY31*、*AhWRKY37*、*AhWRKY39* 和 *AhWRKY54* 在低温胁迫下不同品种菠萝蜜的表达量上调或下调倍数大, 推测这几个基因在不同品种菠萝蜜的抗寒过程中发挥重要作用。



A. 低温胁迫后 ‘GX’ 和 ‘TAH’ 表型；B. 菠萝蜜不同品种 *WRKY* 基因家族成员在低温胁迫下的热图分析；C. 低温胁迫下差异表达基因的 qRT-PCR 表达模式。****表示显著水平为 $P < 0.0001$ 。

A. ‘GX’ and ‘TAH’ phenotypes after low temperature stress; B. Heat map analysis of *WRKY* gene family member in different jackfruit cultivars under low temperature stress; C. Expression patterns of differentially expressed gene under cold stress by qRT-PCR. **** indicates significant level is $P < 0.0001$.

图 6 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员在低温胁迫下的表达模式分析

Fig. 6 Expression pattern analysis of *WRKY* gene family member in jackfruit under low temperature stress

3 讨论与结论

3.1 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族具有进化保守性

WRKY 基因家族广泛存在于植物基因组中，并参与调节多种生物过程，随着越来越多基因组的公布，*WRKY* 基因家族在植物界被广泛鉴定(Huang et al., 2012; Huang et al., 2015)。本研究基于‘S10’菠萝蜜基因组，共注释到 61 个 *WRKY* 基因家族成员，多于黄瓜（55 个）(Ling et al., 2011)和栀子（47 个）(陈啸等, 2024)，少于棉花（116 个）(Dou et al., 2014)、芝麻（65 个）(Li et al., 2017)和木薯（85 个）(Wei et al., 2016)。蛋白理化性质结果表明，AhWRKY 基因家族成员蛋白的氨基酸数目、分子质量、理论等电点和不稳定系数具有差异，说明 AhWRKY 基因家族成员需要在不同的环境中发挥功能(何浩等, 2023)。为了分析菠萝蜜与其他物种 *WRKY* 基因家族成员间的进化关系，利用菠萝蜜、拟南芥和水稻 *WRKY* 基因家族成员的蛋白序列构建系统发育进化树，将进化树分为四个亚族，其中 I 族中的成员最多（27 个），该族成员都含有一个 WRKY 结构域和 C₂H₂ 基序，说明 I 族成员可能是在植物在应对各种胁迫条件下进化而来，且 I 族成员与其他物种大多数 *WRKY* 转录因子结构相同(Villano et al., 2020)。都与值得注意的是，在各亚族中菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员与拟南芥 *WRKY* 基因家族成员分布更紧密，说明其与双子叶植物的亲缘关系更近。先前的研究表明，基因结构和保守基序分析可以为基因家族的进化关系提供重要依据(Hu et al., 2015)。通过分析菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员的基因结构和保守基序发现，基因结构和保守基序在同亚族中高度保守。第 III 亚族中，所有 AhWRKY 基因只含有两个内含子，与鹰嘴豆(39/69)(Waqas et al., 2019)和梨(59/103)(Huang et al., 2015)一致。值得注意的是，同一亚族中内含子的数量和位置相似，

第 I 亚族和第 II 亚族成员的内含子普遍都在 2~5 之前, 而第 III 亚族中 *AhWRKY* 都只含有 2 个内含子。此外, 在菠萝蜜 *WRKY* 基因家族中鉴定到 10 个保守基序, 同一亚族蛋白的保守基序分布具有系统发育类群特异性, 说明同一亚族蛋白的分子结构在进化过程中具有保守性。

基因的串联重复事件, 在植物进化过程中时有发生, 通常被认为是基因家族扩张和进化的关键机制(Liu et al., 2011)。本研究在 61 个 *AhWRKY* 基因中, 鉴定出 124 对参与片段复制事件的基因对。这一结果表明, 片段复制事件在菠萝蜜 *WRKY* 基因家族的扩增中起着至关重要的作用。无花果和波罗蜜同属桑科(Crisosto et al., 2011), 水稻和拟南芥分别是最重要的单子叶和双子叶模式植物(Meyerowitz, 1987; Shimamoto & Kyozyuka, 2002), 波罗蜜、无花果、拟南芥和水稻物种间共线性结果显示, 61 个 *AhWRKY* 基因在无花果中有 8 个同源基因对, 在拟南芥中有 25 个同源基因对, 在水稻中有 8 个同源基因对。说明其与单子叶植物的亲缘关系更近, 这一结果与之前系统发育进化树的结果一致。值得注意的是, 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族成员中有 8 个基因在 3 个物种中形成同源基因对, 这些基因可能出现在单子叶和双子叶植物分化之前。

3.2 菠萝蜜 *WRKY* 基因家族可能参与菠萝蜜响应低温胁迫过程

WRKY 基因家族是植物中特异的转录因子家族, 在多种非生物胁迫(干旱、盐、碱、温度和紫外线等)的不同响应途径中发挥重要作用(Schluttenhofer & Yuan, 2015; Khoso et al., 2022)。近年来, 非生物胁迫对植物的生长发育影响日益严重, *WRKY* 基因家族成员的作用和机制在模式植物、农作物和其他物种中的研究也被广泛报导(Pandey & Somssich, 2009)。Dong 等(2019)发现在中粒咖啡 (*Coffea canephora*) *WRKY* 基因家族成员中, 14 个 *CcWRKY* 在冷驯化阶段被诱导, 17 个 *CcWRKY* 在低温处理下表达量上升, 12 个 *CcWRKY* 在冷胁迫表达量下降, 全基因组分析结果显示, 235 个 *CcWRKY* 调控的靶基因在响应低温胁迫的过程中差异表达, 并且 qRT-PCR 和相关分析表明, *CcWRKY* 可能调控这些基因对冷胁迫的应答靶点。在元宝槭 (*Acer truncatum*) *WRKY* 基因家族中, *WRKY* 基因在冷胁迫下叶片中的表达量在 0、6 和 12 h 下的表达量显著增加(Li et al., 2021)。Bao 等(2019)为研究梅 (*Prunus mume*) *PmWRKY* 基因家族成员在低温下的功能, 对梅进行低温处理, 结果表明, 12 个 *PmWRKY* 在茎中表达量显著变化, 经 ABA 处理后, *PmWRKY18* 的表达水平显著上调。Kim 等(2016)利用 DNA 微阵列技术和 RNA 印记技术验证水稻 *OsWRKY71* 在冷胁迫下高度上调, 过表达 *OsWRKY71* 在低温处理后的成活率、光合能力、鲜重和干重都相比于对照株恢复得更好, 并且 qRT-PCR 分析结果显示, 下游基因在冷胁迫下过表达 *OsWRKY71* 中的表达量上调, 说明 *OsWRKY71* 通过调节下游靶基因在水稻耐寒性过程中发挥积极作用。为探究 *WRKY* 基因家族成员在低温胁迫下不同品种波罗蜜中的表达模式, 本研究利用已发表的低温胁迫下不同品种菠萝蜜转录组数据, 结果表明, 除不表达的基因外, *AhWRKY* 基因的表达模式主要分为 GX 菠萝蜜中高表达和 THA 菠萝蜜中高表达, 为进一步验证这一结果, 从中挑选出差异表达基因, 并利用 qRT-PCR 技术验证其在低温胁迫下不同品种菠萝蜜中的表达模式, 结果表明所筛选的差异表达基因的表达模式与转录组一致, 说明 *AhWRKY* 基因在不同品系菠萝蜜抵御低温胁迫的过程中可能发挥不同功能, *WRKY* 基因在三个品种的三叶木通中对炭疽病的

响应程度有差异, *AktWRKY* 基因在两个易感品种之间表达模式相似, 而在抗性品种差异表达。同时, 在两个易感品种之间真菌感染期间, 超过 64% 的 *AktWRKY* 基因差异表达(Wen et al., 2019), 这一结果与 *AhWRKY* 基因在不同品系菠萝蜜中差异表达相似。此外, *WRKY* 基因可以与顺式作用元件 W-box 序列[(T)(T) TGAC (C/T)]进行特异性结合, 其中 TGAC 是 W-box 序列的核心序列, 且该序列是关乎 *WRKY* 蛋白的结合和功能的重要因素。研究表明, 与胁迫有关的基因启动子都含有 1 个或若干个 W-box 序列(Grzechowiak et al., 2022), 在本研究中, 某些基因的差异表达倍数大, 推测这些基因与 W-box 序列特异结合并在不同品种菠萝蜜的抗寒过程中发挥重要作用, 然而这些基因的具体生物学功能仍需进一步研究。

参考文献:

- BAILEY TL, JOHNSON J, GRANT CE, et al., 2015. The MEME suite[J]. Nucleic Acids Research, 43(W1): W39-W49.
- BAO F, DING A, CHENG T, et al., 2019. Genome-wide analysis of members of the *WRKY* gene family and their cold stress response in *Prunus mume*[J]. Genes, 10(11): 911.
- BATEMAN A, COIN L, DURBIN R, et al., 2004. The Pfam protein families database[J]. Nucleic Acids Research, 32(Suppl_1): D138-D141.
- CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, et al., 2020. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 13(8): 1194-1202.
- CHEN L, SONG Y, LI S, et al., 2012. The role of *WRKY* transcription factors in plant abiotic stresses[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 1819(2): 120-128.
- CHEN X, CHEN SY, ZHU YM, et al., 2024. Identification of *WRKY* gene family in *Gardenia jasminoides* and its expression patterns in response to salt stress[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 37 (3) : 503-512. [陈啸, 陈淑颖, 朱渊铭, 等, 2024. 梔子 *WRKY* 基因家族鉴定及其响应盐胁迫的表达模式[J]. 西南农业学报, 37 (3) : 503-512.]
- CRISOSTO H, FERGUSON L, BREMER V, et al., 2011. Fig (*Ficus carica* L.) [M]// YAHIA EM. Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Amsterdam: Elsevier: 134-160.
- DONG X, YANG Y, ZHANG Z, et al., 2019. Genome-wide identification of *WRKY* genes and their response to cold stress in *Coffea canephora*[J]. Forests, 10(4): 335.
- DOU L, ZHANG X, PANG C, et al., 2014. Genome-wide analysis of the *WRKY* gene family in cotton[J]. Molecular Genetics and Genomics, 289: 1103-1121.
- DU YJ, ZHU PJ, ZHONG YJ, et al., 2023. Transcription analysis of jackfruit under low temperature stress[J]. Fruit Trees of Southern China, 52(4): 37-44. [杜英俊, 朱鹏锦, 钟云婕, 等, 2023. 菠萝蜜响应低温胁迫的转录组分析[J]. 中国南方果树, 52(4): 37-44.]
- EULGEM T, RUSHTON PJ, ROBATZEK S, et al., 2000. The *WRKY* superfamily of plant transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 5(5): 199-206.
- GRZECHOWIAK M, RUSZKOWSKA A, SLIWIAK J, et al., 2022. New aspects of DNA recognition by group II *WRKY* transcription factor revealed by structural and functional study of *AtWRKY18* DNA binding domain[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 213: 589-601.
- HE H, WANG ZM, ZHANG LQ, et al., 2023. Identification and expression analysis of PDR gene

- family in Wheat (*Triticum aestivum*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 31(3): 445-459.
- [何浩, 王志明, 张立强, 等, 2023. 小麦 PDR 基因家族的鉴定与表达分析[J]. 农业生物技术学报, 31(3): 445-459.]
- HU B, JIN J, GUO A, et al., 2015. GSDS 2.0: An Upgraded Gene Feature Visualization Server[J]. Bioinformatics, 31: 1296-1297.
- HUANG S, GAO Y, LIU J, et al., 2012. Genome-wide analysis of *WRKY* transcription factors in *Solanum lycopersicum*[J]. Molecular Genetics and Genomics, 287: 495-513.
- HUANG X, LI K, XU X, et al., 2015. Genome-wide analysis of *WRKY* transcription factors in white pear (*Pyrus bretschneideri*) reveals evolution and patterns under drought stress[J]. BMC Genomics, 16: 1-14.
- JIANG J, MA S, YE N, et al., 2017. *WRKY* transcription factors in plant responses to stresses[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 59(2): 86-101.
- JIANG W, WU J, ZHANG Y, et al., 2015. Isolation of a *WRKY30* gene from *Muscadinia rotundifolia* (Michx) and validation of its function under biotic and abiotic stresses[J]. Protoplasma, 252: 1361-1374.
- KHOSO MA, HUSSAIN A, RITONGA FN, et al., 2022. *WRKY* transcription factors (TFs): Molecular switches to regulate drought, temperature, and salinity stresses in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 13: 1039329.
- KIM CY, VO KTX, NGUYEN CD, et al., 2016. Functional analysis of a cold-responsive rice *WRKY* gene, *OsWRKY71*[J]. Plant Biotechnology Reports, 10: 13-23.
- KUMAR S, STECHER G, LI M, et al., 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular biology and evolution, 35(6): 1547.
- LETUNIC I, BORK P, 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. Nucleic Acids Research, 49(W1):W293-W296.
- LI D, LIU P, YU J, et al., 2017. Genome-wide analysis of *WRKY* gene family in the *sesame* genome and identification of the *WRKY* genes involved in responses to abiotic stresses[J]. BMC Plant Biology, 17: 1-19.
- LI H, GAO Y, XU H, et al., 2013. *ZmWRKY33*, a *WRKY* maize transcription factor conferring enhanced salt stress tolerances in *Arabidopsis*[J]. Plant Growth Regulation, 70: 207-216.
- LI Y, LI X, WEI J, et al., 2021. Genome-wide identification and analysis of the *WRKY* gene family and cold stress response in *Acer truncatum*[J]. Genes, 12(12): 1867.
- LIN X, FENG C, LIN T, et al., 2022. Jackfruit genome and population genomics provide insights into fruit evolution and domestication history in China[J]. Horticulture Research, 9: uhac173.
- LING J, JIANG W, ZHANG Y, et al., 2011. Genome-wide analysis of *WRKY* gene family in *Cucumis sativus*[J]. BMC Genomics, 12: 1-20.
- LIU H, YANG W, LIU D, et al., 2011. Ectopic expression of a grapevine transcription factor *VvWRKY11* contributes to osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. Molecular Biology Reports, 38: 417-427.
- LU YC, ZHOU J, HUANG LJ, et al., 2021. Preliminary report of 4 jackfruit varieties introduced and tested in Guangxi[J]. Fruit Trees of Southern China, 50(5): 86-88. [卢艳春, 周婧, 黄丽君, 等, 2021. 4 个菠萝蜜品种在广西引种试种初报[J]. 中国南方果树, 50(5): 86-88.]
- MARGUERAT S, BÄHLER J, 2010. RNA-seq: from technology to biology[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 67: 569-579.
- MEYEROWITZ EM, 1987. *Arabidopsis thaliana*[J]. Annual Review of Genetics, 21: 93-111.

- PANDEY SP, SOMSSICH IE, 2009. The role of *WRKY* transcription factors in plant immunity[J]. *Plant Physiology*, 150(4): 1648-1655.
- RAMAMOORTHY R, JIANG S-Y, KUMAR N, et al, 2008. A comprehensive transcriptional profiling of the *WRKY* gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments[J]. *Plant and Cell Physiology*, 49(6): 865-879.
- RUSHTON PJ, SOMSSICH IE, RINGLER P, et al., 2010. *WRKY* transcription factors[J]. *Trends in Plant Science*, 15(5): 247-258.
- SCHLUTTENHOFER C, YUAN L, 2015. Regulation of specialized metabolism by *WRKY* transcription factors[J]. *Plant Physiology*, 167(2): 295-306.
- SCHOCH CL, CIUFO S, DOMRACHEV M, et al., 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools[J]. *Database*, 2020: baaa062.
- SHIMAMOTO K, KYOZUKA J, 2002. Rice as a model for comparative genomics of plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1): 399-419.
- SONG QQ, ZHU PJ, HE J, et al., 2021. Effect of low temperature on photosynthetic physiological characteristics of different *Artocarpus heterophyllus* Lam. germplasm resources[J]. *Agricultural Research and Application*, 34(6): 7-13. [宋奇琦, 朱鹏锦, 何江, 等, 2021. 低温对不同菠萝蜜种质资源光合生理特性的影响[J]. *农业研究与应用*, 34(6): 7-13.]
- SWARBRECK D, WILKS C, LAMESCH P, et al., 2007. The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 36(Suppl_1): D1009-D1014.
- VILLANO C, ESPOSITO S, D'AMELIA V, et al., 2020. *WRKY* genes family study reveals tissue-specific and stress-responsive TFs in wild potato species[J]. *Scientific Reports*, 10(1): 7196.
- WANG F, HOU X, TANG J, et al., 2012. A novel cold-inducible gene from Pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*), BcWRKY46, enhances the cold, salt and dehydration stress tolerance in transgenic tobacco[J]. *Molecular Biology Reports*, 39: 4553-4564.
- WANG MQ, HUANG QX, LIN P, et al., 2020. The overexpression of a transcription factor gene *VbWRKY32* enhances the cold tolerance in *Verbena bonariensis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1746.
- WANG Y, TANG H, DEBARRY JD, et al., 2012. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene syteny and collinearity[J]. *Nucleic Acids Research*, 40(7): e49-e49.
- WAQAS M, AZHAR MT, RANA IA, et al., 2019. Genome-wide identification and expression analyses of *WRKY* transcription factor family members from chickpea (*Cicer arietinum* L.) reveal their role in abiotic stress-responses[J]. *Genes & Genomics*, 41: 467-481.
- WEI Y, SHI H, XIA Z, et al., 2016. Genome-wide identification and expression analysis of the *WRKY* gene family in cassava[J]. *Frontiers in Plant Science*, 7: 25.
- WEN F, WU X, LI T, et al., 2022. Characterization of the *WRKY* gene family in *Akebia trifoliata* and their response to *Colletotrichum acutatum*[J]. *BMC Plant Biology*, 22(1): 115.
- ZHANG Y, YU H, YANG X, et al., 2016. *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 Physiology and Biochemistry*, 108: 478-487.