

DOI:10.11931/guihaia.gxzw202404036

马尾松 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 基因生物信息学及表达分析

黄金龙^{1,2}, 陈虎², 陈颖豪², 杨章旗^{2*}

(1. 广西师范大学生命科学学院, 广西 桂林 541006; 2. 广西壮族自治区林业科学研究院, 国家林业和草原局马尾松工程技术研究中心, 广西马尾松工程技术研究中心, 广西优良用材林资源培育重点实验室, 南宁 530002)

摘要: WRKY 家族是高等植物中最大的转录因子家族之一。课题组前期研究发现 WRKY 家族基因在马尾松响应虫害、生长发育、干旱胁迫等方面发挥重要作用, 为进一步研究 WRKY 家族基因的生物学术功能和响应外源激素情况, 该研究对 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 基因生物信息学特征进行分析, 并利用 qPCR 技术对其在 ABA、SA、MeJA 和 GA 等外源激素和钙离子处理下的表达模式进行研究。结果表明: (1) *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 蛋白分别编码 667 和 575 个氨基酸, 亚细胞均定位于细胞核, 两个基因 N 端均含有高度保守的 WRKYGQK 七肽结构, C 端含有锌指结构, 属于 WRKY 转录因子家族。(2) 在进化关系上, *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 蛋白与同为裸子植物油松的 PtXG20020.1 和 Pt2G29990.1 蛋白关系最近。(3) 与 CK 相比, 四种激素处理和相应添加 Ca²⁺ 处理均能显著诱导 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 基因表达, 其表达量均在处理后期达到峰值; 在单独 Ca²⁺ 处理下, 两个基因均呈先下降后上升的表达趋势, 其中 Ca²⁺ 处理前期能显著诱导 *PmWRKY2* 基因表达, 处理后期与对照无显著差异, 而 *PmWRKY6* 基因的表达量在整个处理过程中均显著高于对照。上述结果表明, *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 基因均能响应不同外源信号物质, 但表达模式存在差异。

关键词: 马尾松, *PmWRKY2*, *PmWRKY6*, 生物信息学, 表达模式

中图分类号: Q943

文献标识码: A

Bioinformatics analysis and expression of *PmWRKY2* and *PmWRKY6* in *Pinus massoniana*

HUANG Jinlong^{1,2}, CHEN Hu², CHEN Yinghao², YANG Zhangqi^{2*}

(1. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541006, Guangxi, China; 2. Forestry Research Institute, Engineering Technology Research Center of Masson Pine of State Forestry and Grassland Administration, Engineering Technology Research Center of Masson Pine of Guangxi, Guangxi Key Laboratory of Superior Timber Trees Resource Cultivation, Nanning 530002, China)

Abstract: The WRKY family is one of the largest families of transcription factors in higher plants. Previous studies have found that WRKY family genes play an important role in the response of *Pinus massoniana* to insect pests, growth and development, and drought stress. In order to further study the biological function of WRKY family genes and the response to exogenous hormones, the bioinformatics characteristics of *PmWRKY2* and *PmWRKY6* genes were analyzed, and the expression patterns of *PmWRKY2* and *PmWRKY6* genes under exogenous hormones and calcium ion treatment such as ABA, SA, MeJA and GA were studied by qPCR. The results were as follows: (1) *PmWRKY2* and *PmWRKY6* proteins encoded 667 and 575 amino acids, respectively, and the subcells were located in the nucleus, and the N-terminus of the two genes contained a highly conserved WRKYGQK heptapeptide structure, and the C-terminus contained a zinc finger structure, which belonged to the WRKY transcription factor family. (2) In terms of evolutionary relationship, *PmWRKY2* protein and *PmWRKY6* protein were most closely related to PtXG20020.1 and Pt2G29990.1 proteins, which were also gymnosperm *Pinus tabuliformis*. (3) Compared with CK, the expression of *PmWRKY2* and *PmWRKY6* genes could be significantly

基金项目: 国家自然科学基金(32060348); 广西科技基地和人才专项(桂科 AD19254004); 八桂学者专项(2019A26); 广西自然科学基金(2019GXNSFDA245033)。

第一作者: 黄金龙(1998-), 硕士, 主要从事植物学研究, (E-mail) 339472182@qq.com

***通信作者:** 杨章旗(1964-), 博士, 教授级高级工程师, 主要从事林木遗传育种研究, (E-mail) Yangzhangqi@163.com

induced by the four hormone treatments and the corresponding Ca^{2+} treatment, and their expression levels reached the peak in the late treatment period. The expression of *PmWRKY2* gene was significantly induced in the early stage of Ca^{2+} treatment, and there was no significant difference between the expression of *PmWRKY2* gene in the late treatment and the control, while the expression level of *PmWRKY6* gene was significantly higher than that of the control during the whole treatment. These results show that both *PmWRKY2* and *PmWRKY6* genes can respond to different exogenous signaling substances, but the expression patterns are different.

Keywords: *Pinus massoniana*, *PmWRKY2*, *PmWRKY6*, bioinformatics analysis, expression analysis

转录因子 (transcription factor, TF) 又称为反式作用因子, 通过与下游目标基因顺式作用元件结合来激活或抑制基因表达, 在植物生长发育和响应外界环境中发挥重要作用 (Porto et al., 2014)。植物中含有多种转录因子家族, 其中 WRKY 家族是近年来发现植物中特有、最大且重要的转录因子家族之一。WRKY 基因家族保守结构域由 60 个氨基酸组成, 在 N 端含有 WRKYGQK 高度保守七肽结构, C 端含有锌指结构 (Rushton et al., 2010), 根据 WRKY 保守七肽结构域数目和锌指结构类型, 将 WRKY 转录因子家族分为 I、II 和 III 家族 (Eulgem et al., 2000)。Ishiguro 和 Nakamura (1994) 首次从甘薯 (*Ipomoea batatas*) 中分离到编码 WRKY 蛋白的 *SPF1* (Sweet-PotatoFactor-1) 基因。随着分子生物学技术的不断发展, 目前众多植物的 WRKY 家族基因陆续得到鉴定, 包括杨树 (*Populus trichocarpa*) 105 个 (He et al., 2012)、马尾松 (*Pinus massoniana*) 43 个 (Sun et al., 2022)、杉木 (*Cunninghamia lanceolata*) 44 个 (曾铭等, 2019)。

WRKY 转录因子家族在植物生长发育调控和生物或非生物胁迫响应过程中发挥重要作用 (Eulgem & Somssich, 2007; Chen et al., 2021)。如 *GmWRKY54* 基因通过激活脱落酸 (ABA) 和 Ca^{2+} 信号通路增强气孔关闭以减少水分流失, 从而增强大豆 (*Glycine max*) 的抗旱性 (Wei et al., 2019); *AcWRKY40* 可通过调节乙烯 (ethylene, ET) 生物合成相关基因的表达来调控猕猴桃 (*Actinidia chinensis*) 果实成熟过程 (Gan et al., 2021); *OsWRKY53* 和 *OsWRKY70* 均能正调控水稻 (*Oryza sativa*) 体内胰蛋白酶抑制剂含量, 从而增强水稻对二化螟 (*Chilo suppressalis*) 的抗性 (Hu et al., 2015; Li et al., 2015)。在松树中, WRKY 家族基因在马尾松侧芽发育 (Chen et al., 2021a)、萜类化合物和类黄酮生物合成 (Mao et al., 2021) 中发挥重要作用; WRKY 基因也参与了松树非生物逆境胁迫响应过程, 如长白落叶松 (*Larix olgensis*) *LoWRKY1* 受干旱和外源 ABA 显著诱导表达 (王乃锐等, 2022); 分别过表达马尾松 *PmWRKY30* 和 *PmWRKY164* 能增强转基因烟草的耐旱性和耐磷性 (王庆竹等, 2019; Sun et al., 2022)。在生物胁迫方面, 赤松 (*Pinus densiflora*) 在感染松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 后 WRKY 基因显著上调表达, 表明 WRKY 基因可能参与松材线虫胁迫响应 (Lee et al., 2024)。Chen 等 (2021b) 发现 *PmWRKY31* 基因通过促进萜类挥发性物质含量来提高植株抗虫性。此外, JA、SA、ABA 和 Ca^{2+} 等信号通路被证明在植物抗虫防御中发挥重要作用 (Walling, 2000), 如外源 ABA 处理能显著增强水稻对褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*; BPH) 的抗性 (Liu et al., 2017)。*WRKY2* 和 *WRKY6* 基因可通过参与上述信号通路进而调控植物抗虫性, 如渐狭叶烟草 (*Nicotiana attenuate*) *WRKY3* 和 *WRKY6* 基因在昆虫连续攻击过程中能通过增强或维持 JA 水平来提高植株抗虫性 (Skibbe et al., 2008); *NtWRKY6* 基因受水杨酸 (SA) 显著诱导表达, 过表达该基因能提高烟草对粉虱 (*Bemisia tabaci*) 的抵抗能力 (Yao et al., 2021); 金丝雀棕榈树 *WRKY2*、*WRKY14*、*WRKY28*、*WRKY51* 4 个 WRKY 基因在红棕榈象虫 (*Rhynchophorus ferrugineus*) 侵染后被显著诱导表达, 表明这些基因可能在抗虫响应中具有重要作用 (Verde et al., 2019)。

马尾松是我国南方的典型针叶乡土树种, 具有适应性强、生长迅速等特点, 是可综合利用的重要用材树种 (杨章旗, 2015)。马尾松生长过程中容易受到生物或非生物逆境威胁, 对木材产量和生态环境造成影响, 其中病虫害和季节性干旱等是影响林业生产的重要因素 (吴敏娟等, 2019)。课题组前期研究中发现 WRKY、AP2/ERF 等转录因子家族响应马尾松抗虫过程 (Yang et al., 2016), 随后发现 WRKY 转录因子家族中的 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 在马尾松抗虫品种中显著高表达 (Chen et al., 2021b), 但其是否受到激素和 Ca^{2+} 信号调控还不清楚。本研究通过对 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 基因的蛋白理化性质、系统进化等生物信息学特征及在不同外源信号物质处理下的表达模式进行分析, 以期探索马尾松 WRKY 基因

参与激素调控机制提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验以半年生马尾松全同胞幼苗（家系号：17-243）为材料，种植于广西林科院松树良种繁育苗圃。挑选颗粒饱满的马尾松种子播种于黄心土中发芽，待芽长至 5 cm 后，移栽至无纺纤维布育苗杯（12~15 cm）育苗，采用的轻基质由 45%~60%草炭或椰糠、20%~30%碳化谷壳、8%~9.5%珍珠岩、1%过磷酸钙、10%~15%泥炭土组成。待苗木培育至 6 个月时，选择长势基本一致、健康的马尾松幼苗作为实验材料。

1.2 实验处理

设计 10 个处理，包括 9 个处理组和 1 个对照组。其中，4 个处理组为单独喷施 75 mg·L⁻¹ 脱落酸 (abscisic acid, ABA)、50 mg·L⁻¹ 水杨酸 (salicylic acid, SA)、100 mg·L⁻¹ 茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 和 150 mg·L⁻¹ 赤霉素 (gibberellin acid, GA)，4 个处理为激素中分别加入 100 mg·L⁻¹ CaCl₂ 溶液（配制各溶液时分别加入 1% 吐温-20），1 个处理单独喷施 100 mg·L⁻¹ CaCl₂ 溶液，对照组 (CK) 喷施等量蒸馏水，每处理 6 株幼苗，每处理进行 3 次重复，于每天上午 9 点喷施上述各溶液和蒸馏水，每处理喷施 200 mL，连续喷施 5 d。在停止处理后的第 1 天、第 3 天和第 5 天分别采集各处理马尾松幼苗同部位针叶，同一处理样品等量混合后于液氮中速冻保存（陈虎等，2021）。

1.3 RNA 提取及逆转录

利用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 [PD441，天根生化科技（北京）有限公司] 提取马尾松幼苗针叶 RNA，利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性，并用紫外分光光度计检测 RNA 浓度。得到质量合格的样品后，再采用 M-MLV 逆转录酶 (D2639A，宝生物公司) 将所得的 RNA 逆转录成 cDNA，具体操作按说明书进行，最后将所得样品浓度稀释至 50 ng·μL⁻¹。

1.4 生物信息学分析

利用 ExPASy 在线网站 (<https://web.expasy.org/>) 分析蛋白分子质量、等电点等理化性质 (Séverine et al, 2021)；利用 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 预测蛋白跨膜结构域 (Moller et al., 2001)；利用 WoLF PSORT Prediction (<http://psort1.hgc.jp/form.html>) 进行亚细胞定位预测 (Horton et al., 2007)；利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html) 预测蛋白质二级结构 (Geourjon & Deleage, 1995)；利用 NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 分析蛋白质磷酸化位点 (Blom et al., 1999)；利用 NCBI 的 Blastp 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 对 *PmWRKY2*、*PmWRKY6* 基因进行同源蛋白序列查找，下载拟南芥、杨树等物种的 WRKY 基因，利用 ClustalW 进行蛋白序列比对，利用 MEGA 7 软件的 Neighbor-Joining (NJ) 法构建系统进化树，其中选择 P-distance 模型，Bootstrap 进行 1 000 次重复。

1.5 实时荧光定量 PCR

以 *PmCYP* 基因为内参基因，利用 Primer Premier 5 软件设计 *PmWRKY2*、*PmWRKY6* 和 *PmCYP* 基因的荧光定量 PCR 引物 (表 1)。参照 SYBR Premix Ex Taq II 荧光试剂盒 (TaKaRa, 大连) 的说明书进行实时定量 PCR 反应，对马尾松 *PmWRKY2*、*PmWRKY6* 和 *PmCYP* 基因在 ABA、SA、MeJA 和 GA 等激素处理及相应激素和钙离子共同处理下的表达量进行检测，每个处理进行 3 次生物学重复。用 2^{-ΔΔCt} 法 (Livak & Schmittgen, 2001) 进行目的基因相对表达量分析，利用 SPSS 软件进行方差分析，利用 Origin 软件进行表达分析柱状图绘制。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列设计

Table 1 qRT-PCR primer sequences of the genes

基因名 Gene name	正向引物 (5'-3') Forward sequence (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse sequence (5'-3')
<i>PmWRKY2</i>	GGTTCAGGATGATGCTCGGATGTG	AGTGCCAGTCGTTGTTGGTTTCAG
<i>PmWRKY6</i>	CACCATGTCACCGTGCTGTCC	GCTGCTGCTGTAGTGGATGCC
<i>PmCYP</i>	GGCAAACCTTCTCGCCGTA	GCCAATGCCATCAATGAAGCTCTG

2 结果与分析

2.1 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 基因生物信息学分析

2.1.1 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 基因理化性质分析

对 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 蛋白分子质量、等电点和疏水性等理化性质预测结果显示, *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 蛋白分别编码 667、575 个氨基酸, 蛋白分子量分别为 72.97、62.60 kDa, 理论等电点分别为 6.02、6.64, 均属于酸性蛋白, 平均疏水值分别为 -0.795、-0.684, 不稳定系数分别为 50.75、51.0, 均属于不稳定的疏水蛋白; 亚细胞均定位于细胞核, 没有跨膜结构, 说明这两个基因可能在细胞核内发挥其调控等作用; 磷酸化位点分析结果显示这两个基因均存在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸位点, 其中以丝氨酸位点最多, 苏氨酸次之, *PmWRKY2* 酪氨酸位点较多, *PmWRKY6* 只有 1 个; 蛋白质二级结构预测显示, 这两个蛋白均以无规则卷曲为主, 占比分别为 76.50%、60.24%, *PmWRKY2* 中 β 转角占比最小, *PmWRKY6* 中延伸链占比最小 (表 2)。

表 2 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 蛋白生物信息学分析Table 2 Bioinformatics analysis of *PmWRKY2* and *PmWRKY6* proteins

基因名 Gene name	核酸数 Nucleic acid number	氨基酸数 Amino acid number	蛋白分子质量 Protein mass (kDa)	等电点 Isoelectric point	亚细胞定位 Subcellular localization	跨膜结构 Trans membrane	二级结构 Secondary structure (%)				磷酸化磷结合位点 Kinise phosphorylation		
							α 螺旋 Alpha helix	β 转角 Beta turn	延伸链 Extended strand	无规则卷曲 Random coil	丝氨酸 Ser	苏氨酸 Thr	酪氨酸 Tyr
<i>PmWRKY2</i>	2 004	668	72.97	6.02	细胞核 Nucleus	无 No	9.58	3.29	10.63	76.50	62	20	5
<i>PmWRKY6</i>	1 728	576	62.60	6.64	细胞核 Nucleus	无 No	28.30	8.68	2.78	60.24	39	13	1

2.1.2 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 系统进化与多序列比对

利用 NCBI 的 BlastP 工具分别查找 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 蛋白的同源氨基酸序列, 得到红豆杉 (*Taxus chinensis*)、日本柳杉 (*Cryptomeria japonica*)、银叶五叶松 (*Pinus monticola*) 等 14 个与 *PmWRKY2* 蛋白同源性较高的序列, 火炬松 (*P. taeda*)、挪威云杉 (*Picea abies*) 等 15 个与 *PmWRKY6* 蛋白同源性较高的序列, 进行蛋白多序列比对并构建系统进化树。结果表明, 马尾松与油松 (*Pinus tabuliformis*) 等裸子植物聚为一类, 亲缘关系较其他物种近, *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 均与油松的序列相似性最高, 分别为 93% 和 99.83% (图 1)。多序列比对结果显示, 在 *PmWRKY2* 蛋白中, 银杏、挪威云杉和澳洲坚果只在 C 端含有 1 个 WRKY 保守结构域, 属于 IIc 家族成员 (图 2); 马尾松与其余物种的蛋白序列在 C、N 端各含有 1 个 WRKY 保守结构域, 锌指结构为 C2H2 (C-X4-C-X23-H-X-H) 型, 属于 IC 家族成员; *PmWRKY6* 蛋白与其他 15 条序列 N 端均含有 1 个高度保守的 WRKYGQK 七肽结构域, 在 C 端含有一个 C2H2 型锌指结构序列, 其配体模式为 C-X5-C-X23-H-X-H, 属于 WRKY 家族的 IIb 亚家族成员 (图 3)。

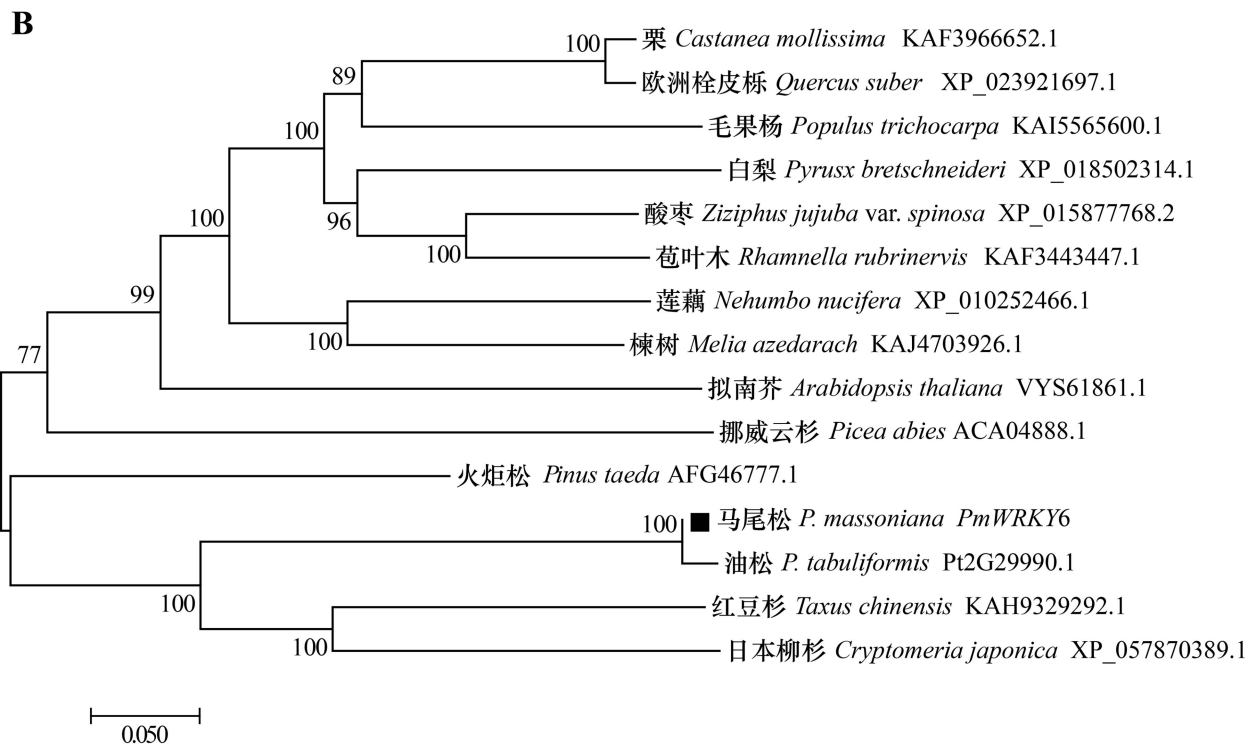
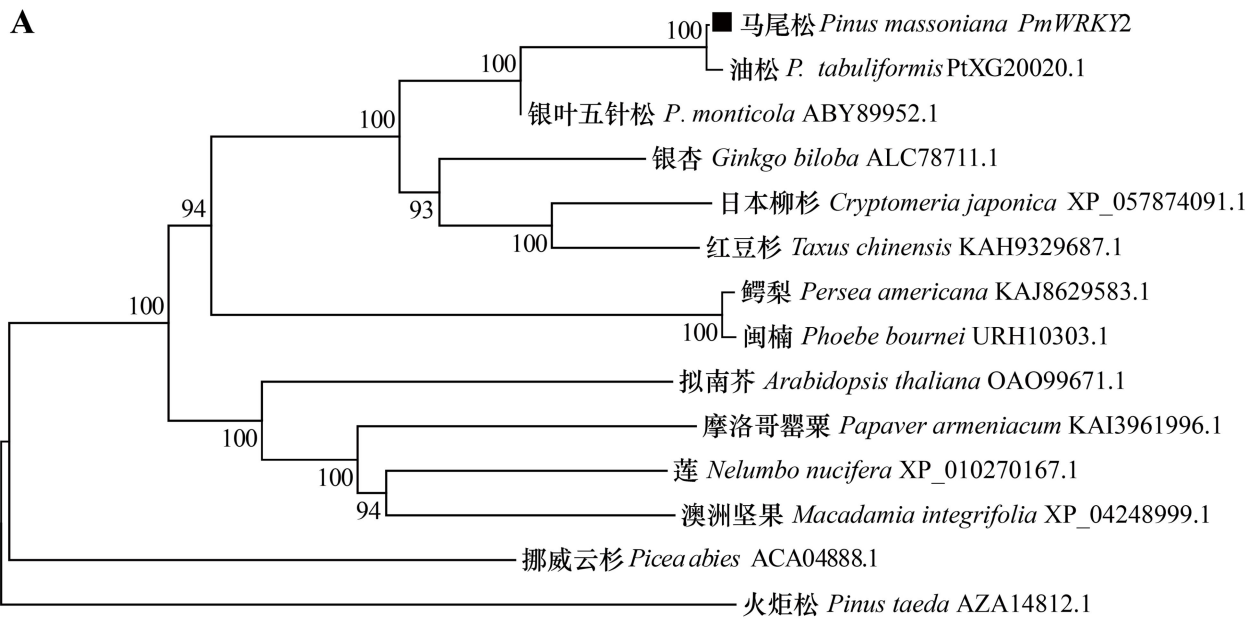


图 1 PmWRKY2 (A) 和 PmWRKY6 (B) 系统进化树分析
 Fig.1 Phylogenetic analysis of PmWRKY2 (A) and PmWRKY6 (B)

```

FmWRKY2      : ----DFNETAIVPPTGIEKPSDDGNNRRKYGQRVYKGESEPPSYKCTHESPTPKKIERLDCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE-----6 : 352
PtXG20020.1 : ----DFNETAIVPVPAGIEKPSDDGNNRRKYGQRVYKGESEPPSYKCTHESPTPKKIERLDCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE-----6 : 406
CAO99671.1   : IGTSCNDSRGSTPSILA----DDGNRRKYGQRVYKGESEPPSYKCTHESPTPKKIERLDCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE-----6 : 283
XP_057874091.1 : NGLSEVNCNTLVPHVIERRDDGNNRRKYGQRVYKGESEPPSYKCTHESPTPKKIERLDCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE-----6 : 359
KAH9329687.1 : NQFSEVNR----TVHVIERRDDGNNRRKYGQRVYKGESEPPSYKCTHESPTPKKIERLDCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE-----6 : 330
ABY89952.1   : -----WRKYGQRVYKGESEPPSYKCTHESPTPKKIERLDCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE-----6 : 76
XP_010270167.1 : FQPSQSDORGNSPNSVAEKTADDGNNRRKYGQRVYKGESEPPSYKCTHESPTPKKIERLDCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE-----6 : 353
KAJ3629583.1 : REEGVGDQREHPSVAATGMSBEDGNNRRKYGQRVYKGESEPPSYKCTHESPTPKKIERLDCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE-----6 : 410
URH10303.1   : REEGVGDQREHPSVAATGMSBEDGNNRRKYGQRVYKGESEPPSYKCTHESPTPKKIERLDCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE-----6 : 410
XP_042489990.1 : IQALGSDHDKDNLNLSMATRLSDGNNRRKYGQRVYKGESEPPSYKCTHESPTPKKIERLDCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE-----6 : 352
KAI3961996.1 : IQPMEDCDRGAISVVTAERSSEDDGNNRRKYGQRVYKGESEPPSYKCTHESPTPKKIERLDCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE-----6 : 370
ACA04888.1   : IQPMEDCDRGAISVVTAERSSEDDGNNRRKYGQRVYKGESEPPSYKCTHESPTPKKIERLDCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE-----6 : 43
ALC78711.1   : -----SNGVASEDD----VMDCHERGWEREKNGFLP-----GGLISNKTMTN-----NCVG-----AARATHEA-----6 : 13
AZA14812.1   : PVASDFSLNSSKFPVSSIKPAKDLTEGLTGAGTCLKPMCELEKRGKISCGGSKPITDFSMALTNVAATLTYGHRKKSVCSSPPLSN-----6 : 286
    
```

```

FmWRKY2      : STEGCGAIVKVE-----DPSSPPRRGNSNHIESCGTPECSASEED--DARTGVDFKFSGDELLIEEESD : 417
PtXG20020.1 : NTEGCGAIVKVEGGFSWKNKTLGLMKVNDVSSYSCGGRSGLERSLLASVVTDLSDPSSPPRRGNSNHIESCGTPECSASEED--DARTGVDFKFSGDELLIEEESD : 513
CAO99671.1   : RLKDYPSSTGRD-----EKGGVYNSL-NPNECTGNPEVFP--SASDD--GGEAAANRNKDEP--LEDDP : 345
XP_057874091.1 : TVGSAATIKVE-----DPSSPPG-UTSHTSADTPEKESASEED--DARTGADKILG-DAEEDSD : 423
KAH9329687.1 : NAEGSAATIKVEGGSSWGNL--LKVNDSDNYSGGWKEGLERSSSASVVTLSDPSSPPG-UTSHTSADTPEKESASEED--DARTGADKILG-DAEEDSD : 423
ABY89952.1   : STEGCGAIVKVE-----DPSSPPRRGNSNHIESCGTPECSASEED--DARTGVDFKFSGDELLIEEESD : 142
XP_010270167.1 : KSRDFSSITNLE-----DKLNHVHGQTHHHPNGTPEELFV--SASDDI--EGVGVYNSKFSGDDVMDDEDE : 419
KAJ3629583.1 : TAWASTCHGAVDTRSN-----WRHDDMETESSASAATELCNPSATLV--NGFPHRSGDAIDV--STVSNND--EDDQGTGHSVSLG--YEEGDESE : 499
URH10303.1   : TAWASTCHGAVDTRSN-----WRHDDMETESSASAATELCNPSATLV--NGFPHRSGDAIDV--STVSNND--EDDQGTGHSVSLG--YEEGDESE : 499
XP_042489990.1 : RPRDFSSITNLE-----DKSNHAGGTHHHPNGTPEELFV--SASDDI--EGVGVYNSKFSGDDVMDDEDE : 431
KAI3961996.1 : RSRDFSSITNLE-----DK--THGMPSHHPNGTPEELFV--SASDDI--EN--AQLNRNDELDLDDDEDE : 431
ACA04888.1   : -----YMS-----ACIENRINSSID--SHCCY : 65
ALC78711.1   : RAEGCGAIVKVE-----DPSSPPR--NSCR--SSGTPPEKESASEED--DARTGADKILG-DEVEEDSV : 77
AZA14812.1   : --TNSFLSSITGD-----GSVSTDKRPSMLASFPSSSRPFLSSSKKCKHGKSLD--DTGG : 340
    
```

```

FmWRKY2      : KRKRKEVNTD LGATREPRRVVYGTSE DLIDGQWRKYGQRVYKGNPSRYKCTHESGVRKHVERSHDLCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE : 526
PtXG20020.1 : KRKRKEVNTD LGATREPRRVVYGTSE DLIDGQWRKYGQRVYKGNPSRYKCTHESGVRKHVERSHDLCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE : 522
CAO99671.1   : KRKRMEG-ALGTPFVREPRRVVYGTSE DLIDGQWRKYGQRVYKGNPSRYKCTHESGVRKHVERSHDLCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE : 462
XP_057874091.1 : KRKRKEQASD LGATREPRRVVYGTSE DLIDGQWRKYGQRVYKGNPSRYKCTHESGVRKHVERSHDLCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE : 532
KAH9329687.1 : KRKRKEQASD LGATREPRRVVYGTSE DLIDGQWRKYGQRVYKGNPSRYKCTHESGVRKHVERSHDLCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE : 532
ABY89952.1   : KRKRKEVNTD LGATREPRRVVYGTSE DLIDGQWRKYGQRVYKGNPSRYKCTHESGVRKHVERSHDLCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE : 234
XP_010270167.1 : KRKRKEIDC LTPMGKREPRRVVYGTSE DLIDGQWRKYGQRVYKGNPSRYKCTHESGVRKHVERSHDLCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE : 528
KAJ3629583.1 : KRKRVDASV EAGATREPRRVVYGTSE DLIDGQWRKYGQRVYKGNPSRYKCTHESGVRKHVERSHDLCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE : 607
URH10303.1   : KRKRVDASV EAGATREPRRVVYGTSE DLIDGQWRKYGQRVYKGNPSRYKCTHESGVRKHVERSHDLCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE : 607
XP_042489990.1 : KRKRVDASV EAGATREPRRVVYGTSE DLIDGQWRKYGQRVYKGNPSRYKCTHESGVRKHVERSHDLCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE : 527
KAI3961996.1 : KRKRVDASV EAGATREPRRVVYGTSE DLIDGQWRKYGQRVYKGNPSRYKCTHESGVRKHVERSHDLCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE : 540
ACA04888.1   : KRKRVDASV EAGATREPRRVVYGTSE DLIDGQWRKYGQRVYKGNPSRYKCTHESGVRKHVERSHDLCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE : 161
ALC78711.1   : KRKRKEVNTD LGATREPRRVVYGTSE DLIDGQWRKYGQRVYKGNPSRYKCTHESGVRKHVERSHDLCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE : 186
AZA14812.1   : KHCGPSGRCHSKRRKRVYVTTKAPAKMAKDPAPALGWRKYGQRVYKGNPSRYKCTHESGVRKHVERSHDLCGHWELVYKGLHNKFCPSRRMGAAAAAARHRE : 448
    
```

横线表示 WRKY 保守七肽结构域; ▼表示 C₂H₂ 锌指结构。下同。

Transverse line indicates conserved WRKY amino domains; ▼ indicates the C₂H₂ zinc finger structure. The same below.

图 2 PmWRKY2 与同源蛋白多序列比对分析

Fig.2 Multiple sequences alignment of PmWRKY2 and homological proteins

```

wrky6      : GTIAHEDSHTETRRTLTHAENDQEESKALMAFN--HIDNK--HARDHDSHGLTSKGHSDPDRTP--NPSPTHEN--VGTQREGSLDRSSPGWVFNKMCIVDCT--D : 268
Pt2G29990.1 : GTIAHEDSHTETRRTLTHAENDQEESKALMAFN--HIDNK--HARDHDSHGLTSKGHSDPDRTP--NPSPTHEN--VGTQREGSLDRSSPGWVFNKMCIVDCT--D : 384
VY861861.1 : PHSDVEV--EE--RTTVRSQSPSLEK-----SSRQNGKRVLVRESEPTESNGWNRNKV--KHHASSICGGNGSENAE--VIECAAE : 272
KAI565600.1 : GDTDENSSVSS--EG--RDRERSGSPNGNGLASKKVI--KDGISEERLVFDENKKEYGRGDNREES--AGCTSQGWGNKVPVRFNSP--NVDTCT--E : 331
KAH9329292.1 : SDAHEDSHAQ--STRTRATGDEHEEASKPLRTVN--HTDNK--KPKDHNHSHSLKGDPTDRTAS--DHSLSNHEHENVHTRFSEEDRRPS--GWAANKMCKIVDCT--E : 334
XP_05787003.1 : TDHEDSHT--FEHDDEEAPKLEMLN--HIDNMRKFSYMKHIESSLRGNTEVDCSAS--DHSLSNHEHENVHTRFSEEDRRPS--GWAANKMCKIVDCT--E : 341
XP_0158777.1 : GDTDENSSVSS--EER--RSGSAGNNKKN-----GHGD--DQGF--LDGE--KKEFDGIG--REDG--DGSNSHGWGNKVPVRFNSP--NVDTCT--E : 336
KAF3966652.1 : GDTDENSSVSS--EG--RDRERSGSPNGNGLASKKVI--KDGISEERLVFDENKKEYGRGDNREES--AGCTSQGWGNKVPVRFNSP--NVDTCT--E : 328
XP_0239216.1 : GDTDENSSVSS--EG--RDRERSGSPNGNGLASKKVI--KDGISEERLVFDENKKEYGRGDNREES--AGCTSQGWGNKVPVRFNSP--NVDTCT--E : 324
KAF3443447.1 : GDTDENSSVSS--EER--RSGSAGNNKKN-----GHGGDDGQGLFDGE--KKEFDGIG--REDG--DGSNSHGWGNKVPVRFNSP--NVDTCT--E : 326
XP_0102524.1 : ADTDEPSSQSS--EG--RDRERSGSPNGNGLASKKVI--KDGISEERLVFDENKKEYGRGDNREES--AGCTSQGWGNKVPVRFNSP--NVDTCT--E : 314
KAJ4703926.1 : AETDEASNS--E--ERTLSGTFPNMNVVASKEY--VKCNKGMVETDCAEN--SNKRGIREES--E--EGE--QGWGNKVPVRFNSP--NVDTCT--E : 263
XP_0185023.1 : GDADENSQSS--DERSRGRSGSLGDNV--AAGHSDDQGITDHE--KKDFGKRIG--REES--DGP--SCGWGNKVPVRFNSP--NVDTCT--E : 347
ACA04888.1 : -----KRSN-----RKHHALSRG-----S : 80
AFG46777.1 : -----S : -
    
```

```

wrky6      : ATMRKARVSVRARSEAMMSDCCGWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 378
Pt2G29990.1 : ATMRKARVSVRARSEAMMSDCCGWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 494
VY861861.1 : ATMRKARVSVRARSEAMMSDCCGWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 382
KAI565600.1 : ATMRKARVSVRARSEAMMSDCCGWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 440
KAH9329292.1 : GSRKARVSVRARSEAMMSDCCGWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 444
XP_05787003.1 : ATMRKARVSVRARSEAMMSDCCGWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 451
XP_0158777.1 : ATMRKARVSVRARSEAMMSDCCGWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 445
KAF3966652.1 : ATMRKARVSVRARSEAMMSDCCGWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 437
XP_0239216.1 : ATMRKARVSVRARSEAMMSDCCGWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 433
KAF3443447.1 : ATMRKARVSVRARSEAMMSDCCGWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 435
XP_0102524.1 : ATMRKARVSVRARSEAMMSDCCGWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 423
KAJ4703926.1 : ATMRKARVSVRARSEAMMSDCCGWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 372
XP_0185023.1 : ATMRKARVSVRARSEAMMSDCCGWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 456
ACA04888.1 : AAAPRRTVETRESEVGGDCCGWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 181
AFG46777.1 : NPAISAKMLIPAEYSWRKYGQKMAKNCPPRYYRCTAAACVPRKRVQRCADRTILLITYCGHNNHLPDPAAMAMASTTSAAMNLLSCLM--SAGGLN : 69
    
```

```

wrky6      : ---ASFAGALGHCPCNTSASISASAPFFTLDLTHNCPANAPGHMAASNFRALAGLPAHAMFVG---MPHGFPNTPCGALHCCSYAP---SMAP : 475
Pt2G29990.1 : ---ASFAGALGHCPCNTSASISASAPFFTLDLTHNCPANAPGHMAASNFRALAGLPAHAMFVG---MPHGFPNTPCGALHCCSYAP---SMAP : 591
VY861861.1 : NPNLARTLLECCSSN--ATISASAPFFTLDLTHNCPANAPGHMAASNFRALAGLPAHAMFVG---MPHGFPNTPCGALHCCSYAP---SMAP : 464
KAI565600.1 : NPNLARTLLECCSSN--ATISASAPFFTLDLTHNCPANAPGHMAASNFRALAGLPAHAMFVG---MPHGFPNTPCGALHCCSYAP---SMAP : 524
KAH9329292.1 : NPNLARTLLECCSSN--ATISASAPFFTLDLTHNCPANAPGHMAASNFRALAGLPAHAMFVG---MPHGFPNTPCGALHCCSYAP---SMAP : 548
XP_05787003.1 : NPNLARTLLECCSSN--ATISASAPFFTLDLTHNCPANAPGHMAASNFRALAGLPAHAMFVG---MPHGFPNTPCGALHCCSYAP---SMAP : 528
XP_0158777.1 : NPNLARTLLECCSSN--ATISASAPFFTLDLTHNCPANAPGHMAASNFRALAGLPAHAMFVG---MPHGFPNTPCGALHCCSYAP---SMAP : 520
KAF3966652.1 : NPNLARTLLECCSSN--ATISASAPFFTLDLTHNCPANAPGHMAASNFRALAGLPAHAMFVG---MPHGFPNTPCGALHCCSYAP---SMAP : 516
XP_0239216.1 : NPNLARTLLECCSSN--ATISASAPFFTLDLTHNCPANAPGHMAASNFRALAGLPAHAMFVG---MPHGFPNTPCGALHCCSYAP---SMAP : 519
KAF3443447.1 : NPNLARTLLECCSSN--ATISASAPFFTLDLTHNCPANAPGHMAASNFRALAGLPAHAMFVG---MPHGFPNTPCGALHCCSYAP---SMAP : 506
XP_0102524.1 : NPNLARTLLECCSSN--ATISASAPFFTLDLTHNCPANAPGHMAASNFRALAGLPAHAMFVG---MPHGFPNTPCGALHCCSYAP---SMAP : 456
KAJ4703926.1 : NPNLARTLLECCSSN--ATISASAPFFTLDLTHNCPANAPGHMAASNFRALAGLPAHAMFVG---MPHGFPNTPCGALHCCSYAP---SMAP : 540
XP_0185023.1 : NPNLARTLLECCSSN--ATISASAPFFTLDLTHNCPANAPGHMAASNFRALAGLPAHAMFVG---MPHGFPNTPCGALHCCSYAP---SMAP : 540
ACA04888.1 : TE--NFVAANCFMECT--ATISASAPFFTLDLTHNCPANAPGHMAASNFRALAGLPAHAMFVG---MPHGFPNTPCGALHCCSYAP---SMAP : 206
AFG46777.1 : -----S : -
    
```

图 3 PmWRKY6 与同源蛋白序列比对分析

Fig.3 Multiple sequences alignment of PmWRKY6 and homological proteins

2.2 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 基因表达分析

利用荧光定量 PCR 技术分析 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 在不同外源激素及相应 Ca^{2+} 添加处理下表达模式。结果表明，在 ABA 处理下，*PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 的表达均随着处理时间的增加而上调且显著高于对照处理，表明 ABA 能诱导这两个基因表达；在 $\text{CK}+\text{Ca}^{2+}$ 下处理，*PmWRKY2* 在第 1 天显著高于对照组，第 3 天和第 5 天与对照无明显差异，*PmWRKY6* 呈先下降后上升的趋势，整个过程均显著高于对照，说明 Ca^{2+} 对这两个基因的表达具有一定的诱导作用；ABA 和 $\text{ABA}+\text{Ca}^{2+}$ 处理下，*PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 呈上调表达趋势，在第 5 天表达量最高且显著高于对照组（图 4：A）。以上结果表明 ABA 和 $\text{ABA}+\text{Ca}^{2+}$ 处理可能正向调控 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 的表达。

在 SA 处理下，*PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 随着处理时间的增加而上调，均在处理第 5 天表达量最高；在 $\text{CK}+\text{Ca}^{2+}$ 处理下，*PmWRKY2* 的表达量在第 1 天显著高于对照，在第 3 天和第 5 天无显著差异，推测 Ca^{2+} 处理早期能诱导 *PmWRKY2* 表达；*PmWRKY6* 的表达呈先下降后上升的趋势，在整个过程中，表达量均显著高于对照组，说明 Ca^{2+} 能诱导 *PmWRKY6* 的表达。在 $\text{AS}+\text{Ca}^{2+}$ 处理中，*PmWRKY2* 在整个过程中呈上调表达趋势且在第 3 天和第 5 天显著高于 $\text{CK}+\text{Ca}^{2+}$ 处理，在第 3 天显著高于 SA 处理，但在第 5 天其表达量显著低于 SA 处理；*PmWRKY6* 呈先下降后上升趋势，在第 5 天显著高于对照和 AS 处理（图 4：B）。以上结果说明 AS 和 Ca^{2+} 可能正向调控这两个基因的表达，其中 Ca^{2+} 处理前期能显著诱导 *PmWRKY2* 表达。

在 MeJA 处理下，*PmWRKY6* 与 *PmWRKY2* 的表达量随处理时间的增加而上调，在处理第 1 天 *PmWRKY2* 基因与对照组相比无显著变化，而 *PmWRKY6* 基因显著低于对照，随着处理时间延长至第 3 天和第 5 天，这两个基因的表达量均显著高于对照，说明 MeJA 的积累能够诱导 *PmWRKY2* 与 *PmWRKY6* 的表达。在 $\text{CK}+\text{Ca}^{2+}$ 处理下，*PmWRKY2* 的表达量在处理第 1 天显著高于对照组，在第 3 天和第 5 天该基因的表达与对照组无显著差异，说明 Ca^{2+} 处理前期能够诱导 *PmWRKY2* 的表达，其诱导效应可能随着时间延长而减弱；而 *PmWRKY6* 呈先下降后上升的表达趋势，其表达量在整个处理过程均显著高于对照组，（图 4：C）。以上结果说明，MeJA 和 $\text{MeJA}+\text{Ca}^{2+}$ 处理均能显著诱导 *PmWRKY2* 与 *PmWRKY6* 的表达。

在 GA 处理下，*PmWRKY2* 与 *PmWRKY6* 的表达在处理第 1 天与对照组相比没有显著差异，在第 3 天和第 5 天均显著高于对照； $\text{CK}+\text{Ca}^{2+}$ 处理下，*PmWRKY2* 在第 1 天显著高于对照和其他处理，在第 3 天和第 5 天与对照组无显著差异，而 *PmWRKY6* 的表达在整个过程中均显著高于对照组，说明 Ca^{2+} 处理能诱导这两个基因的表达。在 $\text{GA}+\text{Ca}^{2+}$ 处理下，*PmWRKY2* 与 *PmWRKY6* 表达量均高于对照组，呈现上调表达趋势（图 4：D）。以上结果说明，GA 和 $\text{GA}+\text{Ca}^{2+}$ 处理均能诱导 *PmWRKY2* 与 *PmWRKY6* 的表达。

3 讨论与结论

WRKY 转录因子是植物特有的转录因子家族之一，该家族基因可通过激活或抑制靶基因的表达从而在植物生长发育、逆境胁迫响应等多个关键生物学过程中发挥重要调控作用 (Gao et al., 2020)。目前在多种植物中已经鉴定出与抗虫性相关的 WRKY 转录因子，但针对马尾松的 WRKY 抗虫基因研究还相对较少。挖掘和研究马尾松中的 WRKY 抗虫基因对提高其抗虫性具有重要意义。本研究对前期课题组获得的 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 基因进行生物信息学特征和外源信号处理表达模式进行分析。多序列比对结果显示，*PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 基因均含有 WRKY 基因家族的核心结构域，在结构域末端均含有 C2H2 锌指结构，这与桃 (Chen et al., 2016)、辣椒 (刁玄章等, 2019) 等物种的研究结果相同，说明 WRKY 家族成员蛋白结构在不同物种间存在保守性。进化分析结果表明，这两个基因与油松的序列相似度最高，分别为 93% 和 99.83%，说明在进化上马尾松 WRKY 基因与裸子针叶树的亲缘关系最近。

Ca²⁺ 作为细胞信号转导的第二信使，在植物响应激素信号和抗虫防御等生命过程中发挥重要作用。激素在植物响应害虫胁迫中也起着重要作用，如 JA、SA、ABA 等多种激素和 Ca²⁺ 信号途径在植物抗虫防御过程中具有重要调控作用 (Walling, 2000)。本研究发现，外源喷施 ABA、GA、SA、MeJA 和 Ca²⁺ 处理均能显著提高马尾松 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 的表达，说明 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 可能通过参与调节马尾松体内 ABA、GA 等信号途径来抵御外界胁迫。外源 ABA 处理能显著诱导茶 (*Camellia sinensis*) *CsWRKY2* 基因的表达 (Wang et al., 2016)；水稻 *OsWRKY50* 的表达随着 ABA 处理时间的增长呈先上调后下调的表达趋势，说明外源 ABA 处理能诱导 WRKY 基因的表达 (Huang et al., 2021)，与本研究结果一致。外源喷施 MeJA 能通过抑制舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) 幼虫的生长速度来降低食叶害虫对兴安落叶松 (*Larix gmelinii*) 的损害程度 (李媛媛等, 2014)，同时该处理也提高了长白落叶松抗虫性 (孟昭军等, 2018)。刘苗苗等 (2021) 发现 *CsWRKY17* 基因受外源 ABA、JA 等防御相关信号分子和尺蠖 (*Ectropis oblique*) 幼虫啃食显著诱导表达，表明该基因可能通过参与 ABA 和 JA 信号途径来调控茶树对尺蠖虫的抗性。因此推测本研究 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 可能通过参与 ABA 和 JA 信号途径调控马尾松抗性。而外源 JA 处理能显著降低 *FaWRKY25* 的表达，该基因可能负调控草莓对灰芽孢杆菌的抗性 (Jia et al., 2021)，推测推测 JA 处理对 WRKY 基因的表达调控可能在不同物种和不同胁迫条件下存在差异。SA 和 GA 处理能诱导 WRKY 基因表达，如 *GhWRKY70* 基因在 SA 处理下呈先下后上升的表达趋势，表明该基因参与棉花 SA 信号通路调控 (Xiong et al., 2019)；与对照相比，SA 处理显著提高番茄 *ShWRKY81* 的表达量 (Wang et al., 2023)。GA 处理能显著诱导谷子 (*Foxtail millet*) *SiWRKY36* 基因和茶树 *CsWRKY17* 的表达，其中 *SiWRKY36* 的表达量较对照上调 2.5 倍 (祖倩丽等, 2015；刘苗苗, 2021)。本研究发现 SA 和 GA 能显著诱导 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 表达，与以上研究结果一致。此外，Chen 等 (2021b) 研究发现，*PmWRKY31* 能调控 JA、GA、SA 合成相关基因表达，进而促进萜类合成酶基因表达，提高植株萜类物质的含量从而提高马尾松对松毛虫的抵抗能力。因此推测 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 基因可能在马尾松抗逆防御过程中发挥重要作用。

综上所述，*PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 基因属于 WRKY 家族，亚细胞均定位于细胞核，进化关系上与裸子植物油松的亲缘关系最近。外源 ABA、SA、MeJA 和 GA 激素及 Ca²⁺ 处理均能诱导 *PmWRKY2* 和 *PmWRKY6* 基因表达，表明这两个基因可能通过参与激素和钙离子信号通路来调控马尾松抗逆性，但具体的调控机理还有待进一步研究。

参考文献:

- BLOM N, GAMMELTOFT S, BRUNAK S, 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites[J]. *Journal of Molecular Biology*, 294(5): 1351-1362.
- CHEN YY, JING X, WANG SS, et al., 2021. Genome-wide analysis of WRKY transcription factor family in melon (*Cucumis Melo* L.) and their response to powdery mildew[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 39(4): 686-699.
- CHEN H, Tan JH, LIANG XX, et al., 2021a. Molecular mechanism of lateral bud differentiation of *Pinus massoniana* based on high-throughput sequencing[J]. *Scientific Reports*, 11(1):9033.
- CHEN H, HU Y, LIANG XX, et al., 2021b. Roles of hormones, calcium and *PmWRKY31* in the defense of *Pinus massoniana* Lamb. against *Dendrolimus punctatus* Walker[J]. *Forestry Research*, 1(1): 1-14.
- CHEN H, XIE JK, LU JY, et al., 2021. Molecular characteristics and expression of *PmFPP* and *PmGGPP* genes in *Pinus massoniana*[J]. *Guangxi Forestry Science*, 50(6): 665-673. [陈虎, 谢俊康, 陆晶宇, 等, 2021. 马尾松 *PmFPP* 和 *PmGGPP* 基因分子特征与表达分析[J]. *广西林业科学*, 50(6): 665-673.]
- CHEN M, TAN QP, SUN MY, et al., 2016. Genome-wide identification of WRKY family genes in peach and analysis of WRKY expression during bud dormancy[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(3): 1319-1332.
- DIAO XZ, WANG SB, DIAO WP, et al., 2018. Cloning and expression analysis of *CaWRKY8* gene in pepper under stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 39(2): 210-217. [刁玄章, 王述彬, 刁卫平, 等, 2018. 辣椒 *CaWRKY8* 基因克隆及胁迫下的表达分析[J]. *西北植物学报*, 39(2): 210-217.]
- 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.
- EULGEM T, SOMSSICH IE, 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4): 366-371.
- GAN Z, XIN Y, NAN S, et al., 2021. *AcWRKY40* mediates ethylene biosynthesis during postharvest ripening in kiwifruit[J]. *Plant Science*, 309:110948.
- GEOURJON C, DELEAGE G, 1995. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. *Computer Applications in the Biosciences*, 11(6): 681-684.
- GAO YF, LIU JK, YANG FM, et al., 2020. The WRKY transcription factor *WRKY8* promotes resistance to pathogen infection and mediates drought and salt stress tolerance in *Solanum lycopersicum*[J]. *Physiologia Plantarum*, 168(1): 98-117.
- HE HS, DONG Q, SHAO YH, et al., 2012. Genome-wide survey and characterization of the WRKY gene family in *Populus trichocarpa*[J]. *Plant Cell Reports*, 31(7): 1199-1217.
- HORTON P, PARKKJ, OBAYASHI T, et al., 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor[J]. *Nucleic Acids Research*, 35: 585-587.
- HU LF, YE M, LI R, et al., 2015. The rice transcription factor *WRKY53* suppresses herbivore-induced defenses by acting as a negative feedback modulator of mitogen-activated protein kinase activity[J]. *Plant Physiology*, 169(4): 2907-2921.
- HUANG SZ, HU LJ, ZHANG SH, et al., 2021. Rice *OsWRKY50* mediates ABA-Dependent seed germination and seedling growth, and ABA-Independent salt stress tolerance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16): 8625.
- ISHIGURO S, NAKAMURA K, 1994. 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 beta-amylase from sweet potato[J]. *Molecular and General Genetics*, 244(6): 563-571.
- JIA SZ, WANG YH, ZHANG G, et al., 2021. Strawberry *FaWRKY25* transcription factor negatively regulated the resistance of strawberry fruits to *Botrytis cinerea*[J]. *Genes*, 12(1): 56.
- LIU JJ, EKRAMODDOULLAH AKM, 2009. Identification and characterization of the WRKY transcription

factor family in *Pinus monticola*[J]. *Genome*, 52(1): 77-88.

- LI R, ZHANG J, LI JC, et al., 2015. Prioritizing plant defence over growth through WRKY regulation facilitates infestation by non-target herbivores[J]. *eLife Sciences*, 4: e04805.
- LEE IH, CHOI BY, KIM DS, et al., 2024. Temporal transcriptome profiling of *Pinus densiflora* infected with pine wood nematode reveals genetically programmed changes upon pine wilt disease[J]. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-23-0397-KC>.
- LIU JL, DU HT, DING X, et al., 2017. Mechanisms of callose deposition in rice regulated by exogenous abscisic acid and its involvement in rice resistance to *Nilaparvata lugens* Stal (Hemiptera: Delphacidae)[J]. *Pest Management Science*, 73(12): 2559-2568.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method[J]. *Methods*, 25(4): 402-408.
- LIU MM, ZANG LS, SUN XL, et al., 2021. Cloning and expression analysis of *CsWRKY17* transcription factor in tea plants[J]. *Journal of Tea Science*, 41(5): 631-641. [刘苗苗, 臧连生, 孙晓玲, 等, 2021. 茶树 WRKY 转录因子 *CsWRKY17* 的克隆与表达分析[J]. *茶叶科学*, 41(5): 631-642.]
- LI YY, WANG Q, MENG SJ, et al., 2014. Effects of exogenous methyl jasmonate spray on carbon sequestration capacity of *Larix gmelinii* and *Populus* sp. and their resistance to insect pests[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 42(5): 97-100. [李媛媛, 王琪, 孟昭军, 等, 2014. 喷施外源茉莉酸甲酯对兴安落叶松和杨树固碳及其抗虫能力的影响[J]. *东北林业大学学报*, 42(5): 97-100.]
- MAO JP, HUANG LW, CHEN MY, et al., 2021. Integrated analysis of the transcriptome and metabolome reveals genes involved in terpenoid and flavonoid biosynthesis in the loblolly pine (*Pinus taeda* L.) [J]. *Frontiers In Plant Science*, 12: 729161.
- MOLLER S, CRONING M, APWEILER R, 2001. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions[J]. *Bioinformatics*, 17(7): 646-653.
- PORTO MS, PINHEIRO MPN, BATISTA VGL, et al., 2014. Plant promoters: an approach of structure and function[J]. *Molecular Biotechnology*, 56(1): 38-49.
- RUSHTON PJ, IMRE ES, PATRICIA R, et al., 2010. WRKY transcription factors[J]. *Trends in Plant Science*, 15(5): 247-258.
- SUN S, CHEN H, YANG ZQ, et al., 2022. 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*, 22(1): 424.
- SKIBBE M, QU N, GALIS I, et al., 2008. Induced plant defenses in the natural environment: *Nicotiana attenuata* *WRKY3* and *WRKY6* coordinate responses to herbivory[J]. *The Plant Cell*, 20(7): 1984-2000.
- SÉVERINE D, CHIARA G, FREDERIQUE L, et al., 2021. ExPasy, the swiss bioinformatics resource portal, as designed by its users[J]. *Nucleic Acids Research*, 49(1): 216-227.
- VERDE G, FELEXIA V, ROB P, et al., 2019. Members of the WRKY gene family are upregulated in canary palms attacked by red palm weevils[J]. *Arthropod-Plant Interactions*, 13(1): 109-116.
- WEI W, LIANG DW, BIAN XH, et al., 2019. *GmWRKY54* improves drought tolerance through activating genes in abscisic acid and Ca²⁺ signaling pathways in transgenic soybean[J]. *Plant Journal*, 100(2): 384-398.
- WANG NR, ZHAO WN, HOU H, et al., 2022. Cloning and expression analysis of transcription factor (*LoWRKY1*) from *Larix olgensis* [J]. *Molecular Plant Breeding*: 1-9[2024-05-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220228.2052.012.html>. [王乃锐, 赵文娜, 侯慧, 等, 2022. 长白落叶松转录因子 *LoWRKY1* 克隆及表达分析[J]. *分子植物育种*: 1-9[2024-05-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220228.2052.012.html>.]
- WANG QZ, SHANG XW, TANG WW, et al., 2019. Cloning and low phosphorus tolerance function analysis of

PmWRKY164 from *Pinus massoniana*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 27(6): 1016-1024.[王庆竹, 尚先文, 汤纬玮, 等, 2019. 马尾松 *PmWRKY164* 基因的克隆及耐低磷功能分析[J]. 农业生物技术学报, 27(6): 1016-1024.]

WALLING, 2000. The myriad plant responses to herbivores[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 19(2): 195-216.

WANG Y, SHU Z, WANG W, et al., 2016. *CsWRKY2*, a novel WRKY gene from *Camellia sinensis*, is involved in cold and drought stress responses[J]. Biologia Plantarum, 60(3): 443-451.

WANG H, GONG WF, WANG Y, et al., 2023. Contribution of a WRKY transcription factor, *ShWRKY81*, to powdery mildew resistance in wild tomato[J]. International Journal of Molecular Sciences, 24(3): 2583.

WU MJ, YOU YJ, ZHANG XH, et al., 2019. Effects of different disturbance patterns on stand structure of infected pure *Pinus massoniana* plantation[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 30(1): 58-66. [吴敏娟, 尤誉杰, 张晓红, 等, 2019. 不同干扰模式对受害马尾松人工纯林林分结构的影响[J]. 应用生态学报, 30(1): 58-66.]

XIONG XP, SUN SC, LI YJ, et al., 2019. The cotton WRKY transcription factor *GhWRKY70* negatively regulates the defense response against *Verticillium dahliae*[J]. Crop Journal, 7(3): 393-402.

YAO DM, ZOU C, SHU YN, et al., 2021. WRKY transcription factors in *Nicotiana tabacum* modulate plant immunity against whitefly via interacting with MAPK cascade pathways[J]. Insects, 12(1):16.

YANG ZQ, 2015. Research progress of high rosin genetic improvement and breeding strategy of *Pinus massoniana*[J]. Guangxi Forestry Research Institute, 44(4): 317-324. [杨章旗, 2015. 马尾松高产脂遗传改良研究进展及育种策略[J]. 广西林业科学, 44(4): 317-324.]

YANG ZQ, CHEN H, JIA J, et al., 2016. De novo assembly and discovery of metabolic pathways and genes that are involved in defense against pests in Songyun *Pinus massoniana* Lamb[J]. Bangladesh Journal of Botany, 45: 855-863.

ZENG M, GAO WJ, SHUAI P, et al., 2019. Identification of WRKY gene family members in Chinese fir and its expression analysis under low phosphorus stress[J]. Journal of Northeast Forestry University, 47(4): 12-20.[曾铭, 高文杰, 帅鹏, 等, 2019. 杉木 WRKY 基因家族成员鉴定及在低磷胁迫下的表达[J]. 47(4): 12-20.]

ZU QL, YIN LJ, XU ZS, et al., 2015. Molecular characteristics and functional identification of foxtail millet transcription factor *WRKY36*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 48(5): 851-860. [祖倩丽, 尹丽娟, 徐兆师, 等, 2015. 谷子 *WRKY36* 转录因子的分子特性及功能鉴定[J]. 中国农业科学, 48(5): 851-860.]