

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.07.008

杨教童, 李鹏飞, 肖巧巧. 金银花 *WRKY* 基因家族的鉴定与功能分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(7): 87-96.

金银花 *WRKY* 基因家族的鉴定与功能分析

杨教童, 李鹏飞, 肖巧巧

贵州中医药大学 中药民族药资源研究院, 贵阳 550025

摘要: *WRKY* 转录因子参与调控植物的生长发育、激素应答及逆境应答等过程. 基于金银花的基因组数据信息鉴定了 *WRKY* 基因家族成员, 并分析了 *WRKY* 转录因子序列的保守结构域、启动子特点、进化特征、基因重复情况以及在两组不同转录组中的表达情况. 结果表明: 金银花共有 46 个 *WRKY* 基因, 从进化特点上可分为 3 个亚家族, 基因数量分别为 16, 13, 17 个. *WRKY* 家族成员的蛋白分子量在 15 963.55~80 967.23 Da 之间, 氨基酸数量在 149~748 之间, 等电点在 4.75~9.71 之间, 不稳定系数在 40.97~67.76 之间. 参与生长发育、激素应答的元件出现在金银花 *WRKY* 基因的启动子区域. 通过分析两组不同的表达谱数据发现, *WRKY* 转录因子可能参与了调控金银花的开花过程. 研究为进一步开展金银花 *WRKY* 家族基因的功能研究奠定了基础.

关键词: 金银花; *WRKY* 基因; 功能分析

中图分类号: S567.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)07-0087-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification and Functional Analysis of *WRKY* Gene Family of *Lonicera japonica* Thunb.

YANG Jiaotong, LI Pengfei, XIAO Qiaoqiao

Resource Institute for Chinese & Ethnic Materia Medica of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: *WRKY* transcription factors play an important role in plants, and they participate in the regulation of plant growth and development, hormone and stress response. In this study, the *WRKY* gene family was identified based on the genomic information of *Lonicera japonica*, and the conserved domain, promoter characteristics, evolutionary characteristics, gene duplication and expression of *WRKY* transcription factors in two different transcriptomes were analyzed. Finally, 46 *WRKY* genes were identified from *Loni-*

收稿日期: 2021-10-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(32260140, 32160139); 贵州中医药大学博士启动基金项目([2019]141, [2020]32).

作者简介: 杨教童, 博士, 讲师, 主要从事药用植物生物信息与分子生物学研究.

通信作者: 肖巧巧, 博士, 讲师.

cera japonica, which could be divided into three subfamilies: I (16), II (13), and III (17) by evolutionary analysis. The molecular weight of *WRKY* proteins ranged from 15 963.55 to 80 967.23 Da, the number of amino acids ranged from 149 to 748, the isoelectric point ranged from 4.75 to 9.71, and the instability coefficient ranged from 40.97 to 67.76. Many elements involved in growth and development, and hormone response present in the promoter region of *WRKY* in *Lonicera japonica*. By analyzing two different expression profiles, we found that *WRKY* transcription factors might regulate the flowering process. Our research will lay a foundation for further functional studies of *WRKY* genes in *Lonicera japonica*.

Key words: *Lonicera japonica*; *WRKY* gene; functional analysis

金银花是我国常用的药用植物之一,在世界各地均有种植,主要分布在东亚的中国、韩国和日本等国家,在中国常使用金银花的花蕾和花入药,而日本常使用金银花的茎和叶入药^[1].金银花具有清热解毒、疏散风热等功效,在国内分布广,品种多,使用量大.现已鉴定出金银花具有多种活性成分,包括挥发油、黄酮类、有机酸类和三萜类化合物等^[2],可用于治疗肺结核、肺炎、急性细菌性痢疾等疾病^[3].金银花除了在医学方面有重要的应用外,在化妆品、食品和健康饮料方面也有广泛的应用价值^[4-5].此外,金银花还经常作为观赏植物呈现在大众面前^[1].金银花的药用、养生和观赏价值决定了其具有较大的市场开发利用前景.

WRKY 转录因子是植物特有的一类转录因子,因其具有高度保守的 *WRKYGQK* 氨基酸序列而得名^[6].*WRKY* 基因最初在甘薯中被发现^[7],后期的研究中发现 *WRKY* 基因家族包含 3 个亚家族^[8],并且第 2 个亚家族又可进一步细分为 5 个次亚家族^[9].有研究表明 *WRKY* 转录因子能识别靶基因的 W-box [(T)TGAC(C/T)] 序列并进行特异性结合,进而调控靶基因的功能^[10].高等植物的 *WRKY* 转录因子在不同组织中发挥着重要作用.*WRKY* 基因可以调节植物的生长发育,如拟南芥的 *WRKY46*,*WRKY54* 和 *WRKY70* 可以通过油菜素内酯调控其生长发育过程^[11].此外,*WRKY* 转录因子还参与非生物胁迫反应,如干旱、损伤、水分和盐胁迫等^[12-14].在拟南芥中过表达 *WRKY30* 可增强盐胁迫的抗性,在水稻中过表达 *WRKY47* 可以显著增强水稻对干旱的耐受性.*WRKY* 蛋白在应答生物胁迫(包括细菌、真菌和病毒病原体)方面也发挥重要作用^[15-16],如拟南芥的 *WRKY22* 能够通过水杨酸和茉莉酸信号调控其对蚜虫的易感性^[17].综上所述,*WRKY* 基因在植物的生长发育、逆境应答方面发挥了重要的作用.

目前,越来越多植物的 *WRKY* 家族基因被鉴定且相关功能被报道,如刺梨^[18]、玉米^[19]、茄子^[6]、菠萝^[20]和番茄^[21]等,但金银花的 *WRKY* 基因家族鉴定还未见报道.本研究基于 *WRKY* 家族的种子序列对金银花 *WRKY* 家族基因进行鉴定,并基于公共转录组数据对其功能进行预测,为将来开展金银花 *WRKY* 基因的功能研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 金银花 *WRKY* 基因家族成员鉴定

从中国国家生物信息中心(CNCB)收集金银花的全蛋白序列,从 Pfam 网站^[22]上下载 *WRKY* 蛋白的结构域序列,利用 HMMER 软件^[23]对金银花全蛋白序列进行评估以鉴定 *WRKY* 基因,进一步使用保守域预测软件 CDD^[24]确保候选基因含有 *WRKY* 保守域.

1.2 理化性质分析

使用 ExPASy 在线软件(<https://web.expasy.org/protparam/>)对候选 *WRKY* 基因的理化性质进行分析,指标包括分子量(Da)、氨基酸数量、等电点、不稳定指数、脂肪系数和平均亲疏水性.

1.3 进化分析

提取金银花和拟南芥 *WRKY* 蛋白的 *WRKY* 结构域序列, 使用进化树分析软件 Mega7^[25] 内置 Clustalx 进行多序列比对, 然后根据 NJ 方法进行进化树的构建与分析, 执行参数: Poission correction, pairwise deletion 和 bootstrap(1 000 次重复).

1.4 共线性分析

使用 MCscanX 软件^[26], 在默认参数下分析家族成员的复制事件. 结合家族成员的染色体位置信息, 使用 TBtools 软件绘制基因共线性图.

1.5 启动子顺式作用元件分析

以全基因组数据库为基础, 利用 TBtools^[27] 获取基因上游 2 000 bp 的基因组序列, 然后递交至 PlantCARE 网站进行启动子顺式作用元件分析^[28], 最后通过 TBtools^[27] 对启动子功能元件进行可视化操作.

1.6 蛋白结构域分析

根据 *WRKY* 蛋白的长度信息及结构域的定位信息, 使用 TBtools 软件^[27] 可视化金银花 *WRKY* 蛋白的结构域.

1.7 热图分析

从金银花功能基因组数据库(LjaFGD)^[29] 中获取两组不同转录组数据的表达量, 用 TBtools 的 heatmap 工具绘制 *WRKY* 基因家族表达热图, 分析基因表达与金银花表型的关系.

2 结果与分析

2.1 金银花 *WRKY* 基因家族鉴定与理化性质预测

本研究采用 *WRKY* 家族固有的结构域来鉴定金银花的 *WRKY* 家族基因, 在金银花全基因组水平上共鉴定了 46 个 *WRKY* 基因. 结果表明 *WRKY* 基因的编码蛋白分子量在 15 963.55~80 967.23 Da 之间, 氨基酸数量在 149~748 之间, 等电点在 4.75~9.71 之间, 不稳定系数在 40.97~67.76 之间, 脂肪系数在 41.00~71.05 之间, 平均亲疏水性在 -1.147~-0.463 之间(表 1).

表 1 金银花 *WRKY* 基因家族及理化性质的预测

基因名称	分子量/Da	氨基酸数量	等电点	不稳定指数	脂肪系数	平均亲疏水性
<i>LjWRKY1</i>	27 900.57	243	5.38	54.55	41.69	-1.147
<i>LjWRKY2</i>	38 009.93	340	9.54	54.80	65.65	-0.764
<i>LjWRKY3</i>	49 174.20	439	8.15	61.94	52.85	-0.917
<i>LjWRKY4</i>	64 394.07	589	6.56	40.97	64.48	-0.765
<i>LjWRKY5</i>	54 869.73	491	8.36	43.26	69.16	-0.697
<i>LjWRKY6</i>	64 764.46	593	6.62	54.01	55.83	-0.793
<i>LjWRKY7</i>	61 331.69	564	5.11	65.24	59.52	-0.698
<i>LjWRKY8</i>	47 826.57	439	4.96	50.98	58.91	-0.738
<i>LjWRKY9</i>	30 631.95	267	5.24	67.16	55.17	-0.960
<i>LjWRKY10</i>	53 895.25	492	7.26	48.69	61.59	-0.550
<i>LjWRKY11</i>	24 131.10	212	8.88	46.55	55.19	-0.897
<i>LjWRKY12</i>	57 302.67	511	7.23	60.59	44.99	-1.054
<i>LjWRKY13</i>	71 865.53	653	8.83	43.60	64.18	-0.782
<i>LjWRKY14</i>	36 578.36	325	5.39	48.14	58.83	-0.699
<i>LjWRKY15</i>	33 584.41	303	4.85	54.99	67.00	-0.547

续表 1

基因名称	分子量/Da	氨基酸数量	等电点	不稳定指数	脂肪系数	平均亲疏水性
<i>LjWRKY16</i>	59 613.03	549	6.57	47.78	61.04	-0.691
<i>LjWRKY17</i>	36 950.09	333	7.59	67.76	48.92	-0.876
<i>LjWRKY18</i>	38 901.82	349	5.34	48.55	59.20	-0.709
<i>LjWRKY19</i>	38 774.78	350	9.63	51.03	63.51	-0.706
<i>LjWRKY20</i>	35 297.41	320	8.42	50.53	67.66	-0.699
<i>LjWRKY21</i>	58 334.62	530	6.29	53.19	58.19	-0.783
<i>LjWRKY22</i>	52 491.36	473	6.55	46.36	60.87	-0.689
<i>LjWRKY23</i>	32 772.24	293	6.01	57.22	55.19	-0.859
<i>LjWRKY24</i>	38 549.84	358	5.08	59.66	44.72	-0.912
<i>LjWRKY25</i>	61 061.56	562	6.81	47.97	62.88	-0.678
<i>LjWRKY26</i>	35 745.53	325	9.59	44.64	67.51	-0.599
<i>LjWRKY27</i>	32 006.41	291	9.59	43.22	68.69	-0.542
<i>LjWRKY28</i>	52 099.74	477	6.00	52.74	62.81	-0.703
<i>LjWRKY29</i>	42 251.08	378	9.45	48.48	66.80	-0.705
<i>LjWRKY30</i>	39 656.05	355	4.90	51.82	68.68	-0.648
<i>LjWRKY31</i>	17 683.53	164	5.08	42.93	48.84	-0.573
<i>LjWRKY32</i>	30 114.10	266	9.19	51.63	71.05	-0.811
<i>LjWRKY33</i>	33 376.28	298	5.93	50.36	67.99	-0.642
<i>LjWRKY34</i>	35 598.65	321	5.82	52.72	62.27	-0.685
<i>LjWRKY35</i>	26 887.96	248	4.86	48.48	58.15	-0.463
<i>LjWRKY36</i>	61 996.34	569	6.58	50.19	60.97	-0.771
<i>LjWRKY37</i>	46 551.79	413	7.63	55.49	69.13	-0.956
<i>LjWRKY38</i>	80 967.23	748	6.02	55.11	53.48	-0.791
<i>LjWRKY39</i>	23 767.73	224	9.71	47.66	56.21	-0.623
<i>LjWRKY40</i>	23 767.73	224	9.71	47.66	56.21	-0.623
<i>LjWRKY41</i>	37 579.77	336	7.12	53.72	65.24	-0.858
<i>LjWRKY42</i>	21 931.29	200	6.13	51.04	41.00	-0.876
<i>LjWRKY43</i>	35 182.18	305	5.52	47.68	63.61	-0.738
<i>LjWRKY44</i>	56 411.12	514	7.04	56.12	62.78	-0.730
<i>LjWRKY45</i>	18 324.90	167	4.75	60.82	54.31	-0.906
<i>LjWRKY46</i>	15 963.55	149	9.58	63.78	59.60	-0.786

2.2 进化及共线性分析

本研究对金银花和拟南芥 WRKY 保守结构域序列进行了多序列比对, 然后使用 Mega7 软件对 WRKY 基因家族进行进化树构建, 并使用在线工具 iTOL^[30] 进行展示(图 1)。结果表明金银花的 WRKY 家族可分为 3 个亚家族, 其中亚家族的基因数量分别是 16, 13, 17 个。另外, 本研究对基因的旁系同源关系进行预测, 并对 WRKY 基因在金银花中的共线性进行分析, 发现 WRKY 家族有明显的重复现象, 这表明在金银花的进化过程中可能发生过加倍(图 2)。

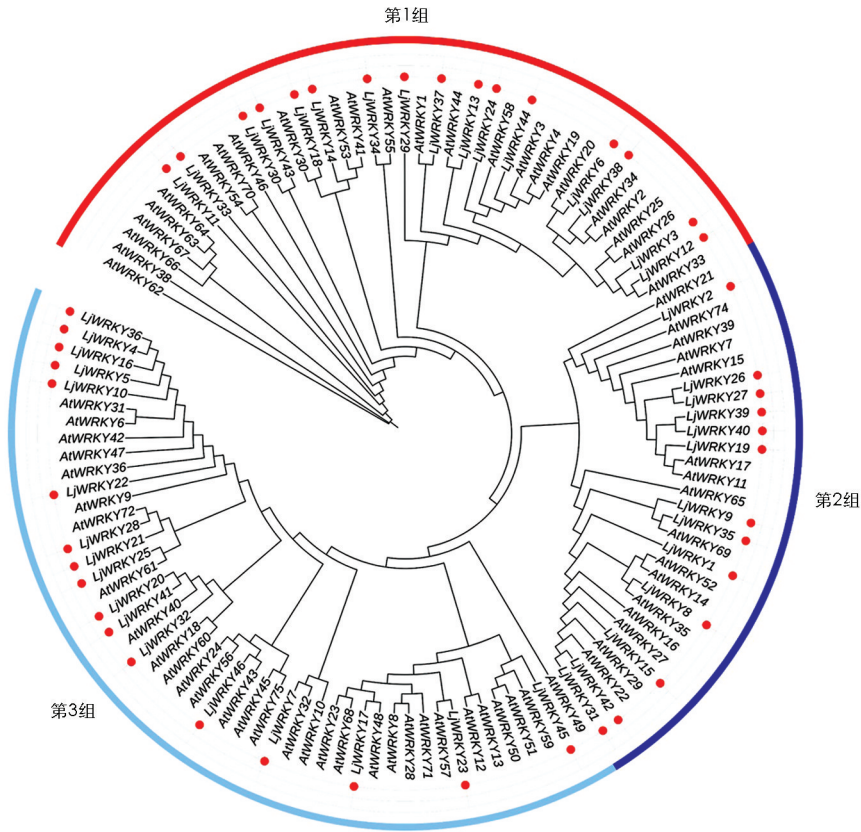


图 1 金银花 WRKY 基因家族的系统发育分析

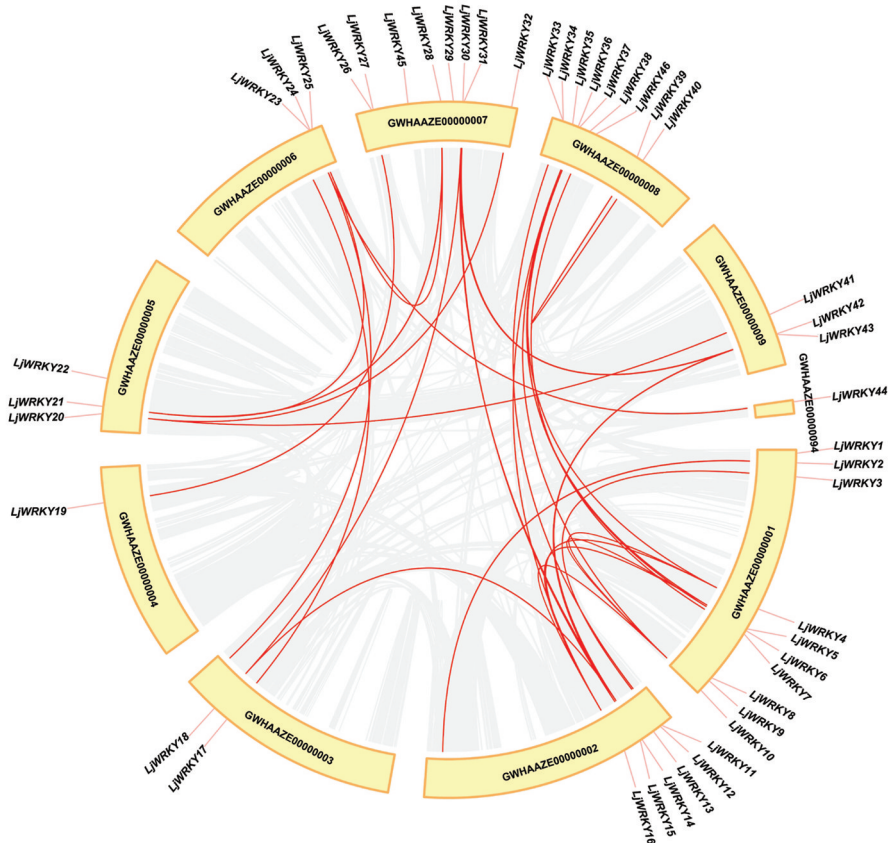


图 2 金银花 WRKY 基因家族在染色体上的加倍情况

2.3 启动子作用元件分析

对 *WRKY* 基因家族的启动子区域的功能元件进行分析, 结果表明许多与光应答(如 part of a light response element)、激素应答(如 auxin-response element)和逆境应答(如 wound-response element)相关的功能元件出现在金银花 *WRKY* 家族基因的启动子区域(图 3), 说明金银花的 *WRKY* 基因可能参与了光应答、激素应答和逆境应答等过程。

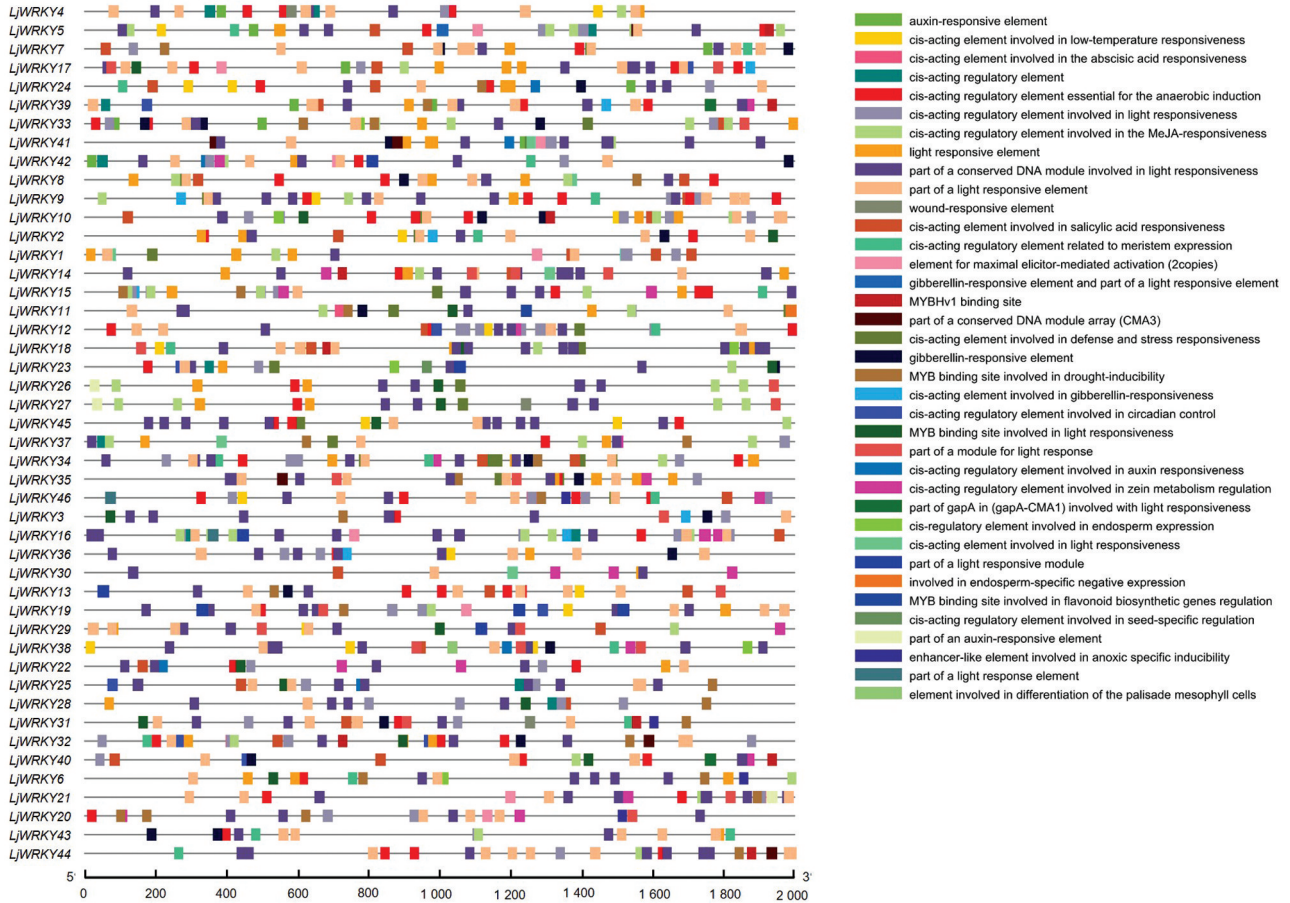


图 3 金银花 *WRKY* 基因家族的启动子区域功能元件分布情况

2.4 蛋白结构分析

本研究通过 Pfam 网站提供的在线工具预测金银花 *WRKY* 家族蛋白可能含有的功能结构域(图 4), 发现所有的 *WRKY* 基因均含有 *WRKY* 结构域, 部分 *WRKY* 基因含有 2 个 *WRKY* 结构域, 主要集中在第 1 组中. 一些 *WRKY* 基因家族还含有其他的结构域, 如 *LjWRKY13* 除了含有 2 个 *WRKY* 结构域外, 还含有 PK_Tyr_Ser-Thr 结构域, 第 2 组中的 5 个成员含有 Plant_zn_clust 结构域, 这些结构的差异可能是导致 *WRKY* 家族蛋白发生功能分化的原因之一。

2.5 表达谱分析

本研究从 LjaFGD 金银花功能基因组数据库^[29]中收集了两组金银花转录组数据的表达值, 构建了金银花 *WRKY* 基因的表达矩阵, 根据矩阵进一步构建了基因表达热图(图 5). 第 1 组数据包括了幼芽期、第 3 绿期、全白期、银花期和金花期(图 5a), 第 1 组数据的第 1 簇、第 2 簇的 *WRKY* 基因在幼芽期的表达高于开花期的表达, 因此可能在花的发育过程中发挥了作用. 第 1 组数据的第 3 簇在金花期表达显著高于其他期, 因此可能在银花期转变为金花期的过程中发挥了作用. 第 2 组数据包括对照, 50%光照和 20%光照(图 5b), 第 2 组数据的第 2 簇、第 4 簇中的 *WRKY* 基因在低光强度下表达分别高于和低于对照, 因此可能参与了光的应答过程. 以上分析结果表明许多 *WRKY* 基因可能参与了金银花的开花和光应答过程。

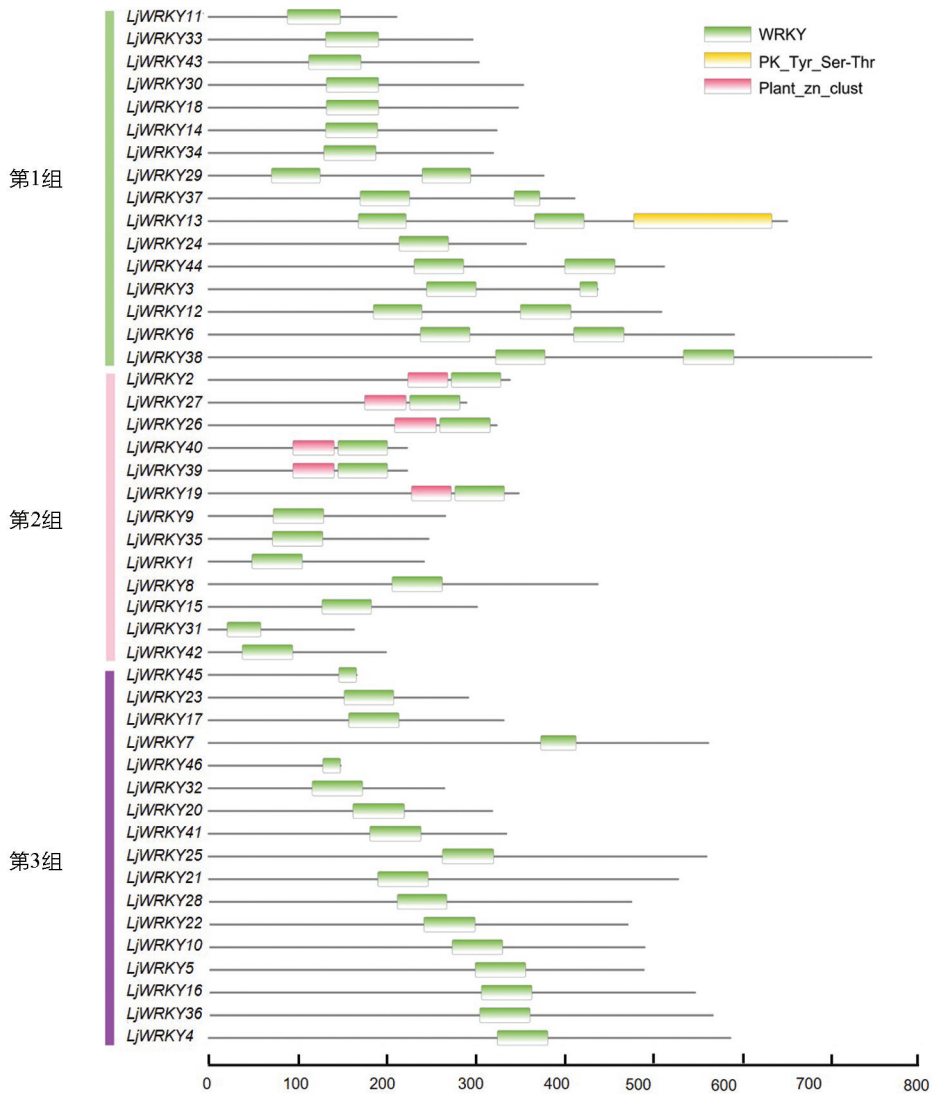


图 4 金银花 WRKY 家族蛋白的结构域分析

3 讨论与结论

本研究在全基因组范围内对金银花的 WRKY 家族基因进行了鉴定并分析, 发现其 WRKY 基因家族可能在生长发育、逆境应答过程中发挥着重要作用, 如调控金银花花色变化、干旱和水分胁迫应答等。WRKY 基因参与金银花花色调控虽然没有报道, 但是在杜鹃花的研究中表明 WRKY 在开花后期可能参与了花色的形成^[31]; 在番茄的研究中表明 WRKY8 参与了干旱和盐胁迫的耐受性^[32]; 在大豆的研究中表明 *GmWRKY* 基因在脱水和盐胁迫下可能发挥作用^[33]。这些分析将为更深入研究金银花的 WRKY 基因功能奠定重要的基础。

大量的研究已经表明高等植物的 WRKY 基因家族在其生长发育、逆境应答等过程中起着重要作用。本研究根据金银花 WRKY 基因的序列特点将 WRKY 基因分成了 3 个不同的亚家族。不同分支上的亚家族之间可能由于序列的差异导致功能存在一定的分化, 进而产生 WRKY 基因功能的多样性。有研究表明金银花在全基因组水平上发生了染色体加倍事件^[34], 本研究对 WRKY 基因在不同染色体上的重复性分布进行了分析, 发现 WRKY 基因存在显著的基因组加倍情况, 这种加倍情况可能是染色体加倍所致。以上分析结果为将来开展 WRKY 基因功能分析提供了思路。

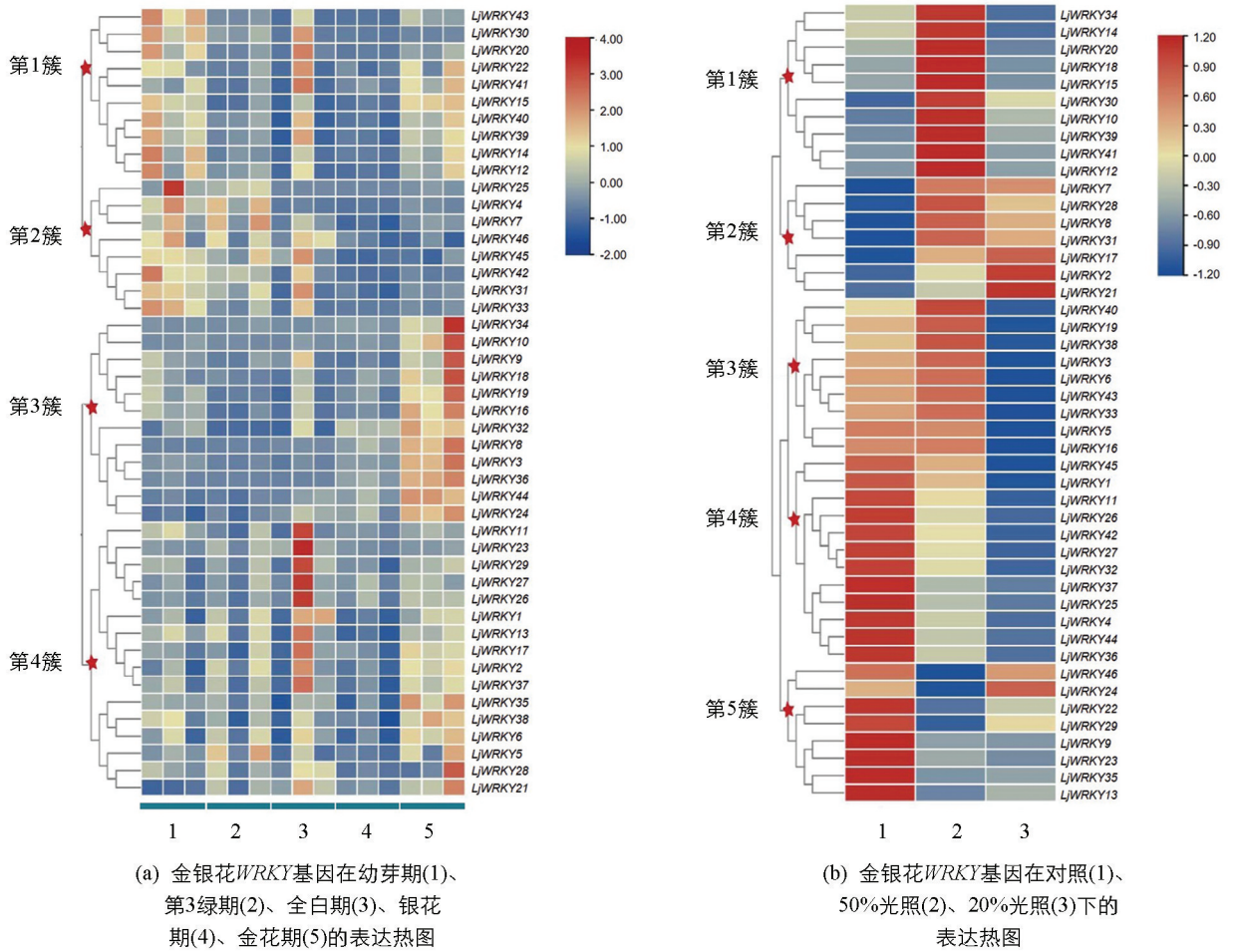


图 5 金银花WRKY基因在两组不同转录组中的表达热图

为了进一步分析金银花WRKY基因的潜在功能,本研究选用顺式作用元件分析与基因表达分析共同探索金银花WRKY基因存在的功能.通过顺式作用元件分析发现许多与光应答、激素应答和生长发育相关的功能元件出现在WRKY基因家族的启动子区域,而通过分析不同光照强度的转录组数据发现了一些存在显著差异表达的WRKY基因,这些差异表达基因很可能参与了光应答过程.此外,WRKY基因参与激素应答、生长发育等过程在植物中也有报道^[35-38],表明该分析结果具有一定的可信度.通过表达分析发现许多WRKY基因的表达与金银花生长发育阶段的趋势相一致,表明WRKY基因很有可能参与了金银花的生长发育过程.

本研究对全基因组范围内的金银花WRKY家族基因进行鉴定,并利用不同类型的转录组数据进行表达分析,发现WRKY基因家族可能在光应答、花发育和花色调控过程中发挥着重要作用,结果为深入开展金银花WRKY基因的功能研究奠定了基础.

参考文献:

- [1] LI Y K, LI W, FU C M, et al. *Lonicerae japonicae* Flos and *Lonicerae* Flos: a Systematic Review of Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology [J]. *Phytochemistry Reviews*, 2020, 19(1): 1-61.
- [2] 郑敏, 彭敬东, 王丽峰. 金银花和金银花露中绿原酸和4种黄酮含量的测定 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2009, 31(1): 45-48.
- [3] 付国芳, 章德胜, 吴迪. 浅金银花的化学成分以及功效研究 [J]. *药物与人*, 2014, 27(3): 36, 38.
- [4] FANG H L, QI X W, LI Y M, et al. De Novo Transcriptomic Analysis of Light-induced Flavonoid Pathway, Transcrip-

- tion Factors in the Flower Buds of *Lonicera japonica* [J]. *Trees* (Berlin, Germany: West), 2020, 34(1): 267-283.
- [5] SHANG X F, PAN H, LI M X, et al. *Lonicera japonica* Thunb.: Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of an Important Traditional Chinese Medicine [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 138(1): 1-21.
- [6] YANG Y, LIU J, ZHOU X H, et al. Identification of *WRKY* Gene Family and Characterization of Cold Stress-Responsive *WRKY* Genes in Eggplant [J]. *Peer J*, 2020(8): e8777.
- [7] ISHIGURO S, NAKAMURA K. Characterization of a cDNA Encoding a Novel DNA-binding Protein, SPF1, that Recognizes SP8 Sequences in the 5' Upstream Regions of Genes Coding for Sporamin and Beta-amylase from Sweet Potato [J]. *Molecular & General Genetics: MGG*, 1994, 244(6): 563-571.
- [8] EULGEM T, RUSHTONP J, ROBATZEK S, et al. The *WRKY* Superfamily of Plant Transcription Factors [J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(5): 199-206.
- [9] RUSHTONP J, SOMSSICH I E, RINGLER P, et al. *WRKY* Transcription Factors [J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(5): 247-258.
- [10] YU D, CHEN C, CHEN Z. Evidence for an Important Role of *WRKY* DNA Binding Proteins in the Regulation of NPR1 Gene Expression [J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(7): 1527-1540.
- [11] CHEN J N, NOLAN T M, YE H X, et al. Arabidopsis *WRKY46*, *WRKY54*, and *WRKY70* Transcription Factors are Involved in Brassinosteroid-regulated Plant Growth and Drought Responses [J]. *The Plant Cell*, 2017, 29(6): 1425-1439.
- [12] YOOS J, KIM S H, KIM M J, et al. Involvement of the *OsMKK4-OsMPK1* Cascade and Its Downstream Transcription Factor *OsWRKY53* in the Wounding Response in Rice [J]. *The Plant Pathology Journal*, 2014, 30(2): 168-177.
- [13] DIAOW P, SNYDER J C, WANG S B, et al. Genome-wide Identification and Expression Analysis of *WRKY* Gene Family in *Capsicum annuum* L [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016(7): 211.
- [14] JUNTAWONG P, SIRIKHACHORNKIT A, PIMJAN R, et al. Elucidation of the Molecular Responses to Waterlogging in *Jatropha* Roots by Transcriptome Profiling [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5(1): 658.
- [15] LEVÉE V, MAJOR I, LEVASSEUR C, et al. Expression Profiling and Functional Analysis of *Populus WRKY23* Reveals a Regulatory Role in Defense [J]. *New Phytologist*, 2009, 184(1): 48-70.
- [16] PANDEYS P, SOMSSICH I E. The Role of *WRKY* Transcription Factors in Plant Immunity [J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(4): 1648-1655.
- [17] KLOTHK J, WIEGERS G L, BUSSCHER-LANGE J, et al. *AtWRKY22* Promotes Susceptibility to Aphids and Modulates Salicylic Acid and Jasmonic Acid Signalling [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(11): 3383-3396.
- [18] 田媛, 郑锦城. 刺梨 *WRKY* 基因家族鉴定及其在不同组织中的表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2021-08-03.
- [19] HU W J, REN Q Y, CHEN Y L, et al. Genome-wide Identification and Analysis of *WRKY* Gene Family in Maize Provide Insights into Regulatory Network in Response to Abiotic Stresses [J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 427.
- [20] 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.
- [21] 魏娟娟, 杨伟, 潘宇, 等. 番茄 *WRKY41* 基因的克隆、表达分析与转基因植株的获得 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2017, 39(1): 46-54.
- [22] EL-GEBALI S, MISTRY J, BATEMAN A, et al. The Pfam Protein Families Database in 2019 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 47(D1): 427-432.
- [23] POTTERS C, LUCIANI A, EDDY S R, et al. HMMER Web Server: 2018 Update [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): 200-204.
- [24] LU S N, WANG J Y, CHITSAZ F, et al. CDD/SPARCLE: The Conserved Domain Database in 2020 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): 265-268.

- [25] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7. 0 for Bigger Datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [26] WANG Y P, TANG H B, DEBARRY J D, et al. MCScanX: a Toolkit for Detection and Evolutionary Analysis of Gene Synteny and Collinearity [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(7): e49.
- [27] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [28] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, et al. PlantCARE, a Database of Plant Cis-Acting Regulatory Elements and a Portal to Tools for in Silico Analysis of Promoter Sequences [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1): 325-327.
- [29] XIAO Q Q, LI Z Q, QU M M, et al. LjaFGD: *Lonicera japonica* Functional Genomics Database [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(8): 1422-1436.
- [30] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree of Life (iTOL) V5: an Online Tool for Phylogenetic Tree Display and Annotation [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): 293-296.
- [31] YANG F S, NIE S, LIU H, et al. Chromosome-Level Genome Assembly of a Parent Species of Widely Cultivated Azaleas [J]. *Nature Communications*, 2020(11): 5269.
- [32] GAO Y F, LIU J K, YANG F M, et al. The *WRKY* Transcription Factor *WRKY8* Promotes Resistance to Pathogen Infection and Mediates Drought and Salt Stress Tolerance in *Solanum lycopersicum* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2020, 168(1): 98-117.
- [33] SONG H, WANG P F, HOU L, et al. Global Analysis of *WRKY* Genes and Their Response to Dehydration and Salt Stress in Soybean [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016(7): 9.
- [34] PU X D, LI Z, TIAN Y, et al. The Honeysuckle Genome Provides Insight into the Molecular Mechanism of Carotenoid Metabolism Underlying Dynamic Flower Coloration [J]. *New Phytologist*, 2020, 227(3): 930-943.
- [35] NURUZZAMAN M, CAO H Z, XIU H, et al. Transcriptomics-Based Identification of *WRKY* Genes and Characterization of a Salt and Hormone-responsive *PgWRKY1* Gene in *Panax ginseng* [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2015, 48(2): 117-131.
- [36] NAN H, GAOL Z. Genome-Wide Analysis of *WRKY* Genes and Their Response to Hormone and Mechanic Stresses in Carrot [J]. *Frontiers in Genetics*, 2019(10): 363.
- [37] FAN C J, YAO H R, QIU Z F, et al. Genome-wide Analysis of *Eucalyptus Grandis* *WRKY* Genes Family and Their Expression Profiling in Response to Hormone and Abiotic Stress Treatment [J]. *Gene*, 2018, 678: 38-48.
- [38] SUN W J, MA Z T, CHEN H, et al. Genome-wide Investigation of *WRKY* Transcription Factors in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) and Their Potential Roles in Regulating Growth and Development [J]. *Peer J*, 2020(8): e8727.

责任编辑 周仁惠