

芥菜 *WOX* 基因家族的全基因组鉴定与分析

阳文龙^{1*}, 徐楚^{1,2}, 韩嘉琪^{1,2}, 张晓辉¹, 宋江萍¹, 贾会霞¹, 王海平^{1*}

1 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081

2 山西农业大学, 山西 太谷 030801

阳文龙, 徐楚, 韩嘉琪, 张晓辉, 宋江萍, 贾会霞, 王海平. 芥菜 *WOX* 基因家族的全基因组鉴定与分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 537-551.

YANG Wenlong, XU Chu, HAN Jiaqi, ZHANG Xiaohui, SONG Jiangping, JIA Huixia, WANG Haiping. Genome-wide identification and characterization of the *WOX* gene family in *Brassica juncea*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 537-551.

摘要: WUSCHEL 相关-同源盒(WUSCHEL related-homeobox, *WOX*)基因家族是一类植物特有的转录因子基因家族, 在植物的生长发育过程中发挥重要作用。本研究利用芥菜(*Brassica juncea*)基因组数据, 通过 HUMMER、Smart 等软件进行检索筛选, 共鉴定出 51 个 *WOX* 基因家族成员。利用 ExPasy 在线软件对这些家族成员的蛋白质分子量、氨基酸序列长度、等电点等进行分析, 并利用生物信息学软件对芥菜 *WOX* 基因家族进化关系、保守区域、基因结构等进行系统性分析, 将芥菜 *WOX* 基因家族分为古老支、中间支和 WUS 支/现代支 3 个亚家族。结构分析表明, 同一亚家族内的 *WOX* 转录因子家族成员的保守结构域的种类、组织形式以及基因结构具有高度的一致性, 而不同亚家族之间呈现一定的多样性。51 个 *WOX* 基因不均匀分布于芥菜 18 条染色体上, 这些基因的启动子大多含有响应光、激素和非生物逆境胁迫相关的顺式作用元件。利用转录组数据和实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 分析发现, 芥菜 *WOX* 基因的表达具有时空特异性, 其中 *BjuWOX25*、*BjuWOX33*、*BjuWOX49* 可能在角果的发育中发挥重要作用, *BjuWOX10*、*BjuWOX32* 和 *BjuWOX11*、*BjuWOX23* 分别在干旱和高温胁迫响应中具有重要功能。上述结果为芥菜 *WOX* 基因家族的功能研究奠定了基础。

关键词: 芥菜; *WOX* 基因家族; 生物信息学分析

资助项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目(CARS-24-A-01); 中国农业科学院创新工程项目(CAAS-ASTIP-2022-IVFCAAS); 国家园艺种质北京蔬菜分库运行服务项目(NHGRC2022-NH01)

This work was supported by the China Agriculture Research System of Ministry of Finance and Ministry of Agriculture and Rural Affairs (CARS-24-A-01), the Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-2022-IVFCAAS), and the National Horticultural Germplasm Centre Project (NHGRC2022-NH01).

*Corresponding authors. E-mail: YANG Wenlong, yangwenlong@caas.cn; WANG Haiping, wanghaiping@caas.cn

Received: 2022-09-26; Accepted: 2022-11-01; Published online: 2022-11-25

Genome-wide identification and characterization of the *WOX* gene family in *Brassica juncea*

YANG Wenlong^{1*}, XU Chu^{1,2}, HAN Jiaqi^{1,2}, ZHANG Xiaohui¹, SONG Jiangping¹, JIA Huixia¹, WANG Haiping^{1*}

1 Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

2 Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

Abstract: The WUSCHEL related-homeobox (WOX) family is one of the plant-specific transcription factor families, playing important roles in plant growth and development. In this study, 51 *WOX* gene family members were identified from the genome data of *Brassica juncea* by searching and screening with HUMMER, Smart and other software. Their protein molecular weight, amino acids numbers, and isoelectric point were analyzed by using ExPasy online software. Furthermore, bioinformatics software was used to systematically analyze the evolutionary relationship, conservative region, and gene structure of the *WOX* gene family. The mustard *WOX* gene family was divided into three subfamilies: ancient clade, intermediate clade, and WUS clade/modern clade. Structural analysis showed that the type, organization form and gene structure of the conservative domain of WOX transcription factor family members in the same subfamily were highly consistent, while there was a certain diversity among different subfamilies. 51 *WOX* genes are distributed unevenly on 18 chromosomes of mustard. Most of the promoters of these genes contain *cis* acting elements related to light, hormone and abiotic stress. Using transcriptome data and real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) analysis, it was found that the expression of mustard *WOX* gene was spatio-temporal specific, among which *BjuWOX25*, *BjuWOX33*, and *BjuWOX49* might play an important role in the development of silique, and *BjuWOX10*, *BjuWOX32*, and *BjuWOX11*, *BjuWOX23* respectively might play an important role in the response to drought and high temperature stresses. The above results may facilitate the functional study of mustard *WOX* gene family.

Keywords: *Brassica juncea*; *WOX* gene family; bioinformatics analysis

WUSCHEL 相关 - 同源盒 (WUSCHEL related-homeobox, WOX)蛋白家族是真核生物转录因子同源异型结构域(homeodomain, HD)蛋白homeobox (HOX)大家族中植物特有的1个亚支, 在植物胚胎发生、干细胞维护和根的形成等关键发育过程中起着重要作用^[1-2]。典型的HD包括60-66个氨基酸残基,组成helix1-loop-helix2-turn-helix3的空间结构,起到与特异

DNA序列结合的作用^[3]。系统发育分析发现,WOX家族可分为3支:WUS支/现代支、中间支和古老支^[4-5]。Lian等和Ikeda等通过对50种植物中350个WOX基因的生物信息学分析发现,低等植物中的WOX成员仅来自古老支;现代支的WOX成员仅存在于高等植物中;中间支在维管植物中开始出现,暗示中间支和现代支可能是经过古老支成员复制和分化形成的^[6-7]。

自1996年Laux等^[2]克隆得到了 *WUS* 基因以来,很多物种如拟南芥、水稻、小麦、玉米、油菜、棉花、大豆、菜豆、番茄、黄瓜、大蒜等都已克隆到 *WOX* 家族基因^[8-18]。拟南芥中共有 15 个 *WOX* 基因,其中 *WUS* 和 *WOX1-WOX7* 属于 *WUS* 支/现代支,中间支包括 *WOX8*、*WOX9*、*WOX11* 和 *WOX12*,古老支包括 *WOX10*、*WOX13* 和 *WOX14*^[5]。功能分析发现, *WUS* 和 *WOX5* 分别在茎尖分生组织(shoot apical meristem, SAM)和根尖分生组织(root apical meristem, RAM)的中心细胞中表达,具有维持干细胞分裂的功能^[3,19-20]。*WOX2* 和 *WOX8*、*WOX9* 均在合子中表达,与胚胎早期顶—基部的形成相关^[21]。*WOX3* 主要在分生组织的外围表达,对营养时期和生殖时期干细胞的表达调控有重要作用^[22]。*WOX4* 参与 SAM 和 RAM 中维管束的形成与发育^[23]。*WOX6* 主要在胚珠中表达并调节胚珠的发育,在珠被和卵细胞的形成过程中防止细胞的提前分化^[24], *WOX6* 也参与冷胁迫的应答^[25]。*WOX13*、*WOX14* 在根部及花药表达,并且受到严格调控,具有防止提前分化的功能^[26]。其他植物中的研究也表明, *WOX* 家族基因在植物生长发育过程中发挥着重要作用,且具有时空表达特异性,此外还参与激素、生物和非生物逆境胁迫的响应^[27-28]。

芥菜(*Brassica juncea*)是我国重要的加工蔬菜作物,常年种植面积达 100 万 hm^2 ,在人们生活和国民经济中占有重要地位。芥菜按食用器官可分为叶用、茎用、根用、薹用芥菜和籽芥,不同类型的芥菜生长发育特性存在较大差异,因此研究对其生长发育起重要调控作用的 *WOX* 基因是至关重要的。但由于芥菜是异源四倍体(AABB),基因组比较复杂,给芥菜 *WOX* 基因的研究带来了挑战,目前还未见芥菜 *WOX* 基因相关的研究报道。鉴于此,本研究利用芥

菜基因组信息通过生物信息学方法对芥菜 *WOX* 基因家族的组成在全基因组水平进行鉴定,并进一步对基因结构、染色体分布、启动子顺式作用元件、表达谱进行分析,以期为后续芥菜 *WOX* 基因的功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 芥菜 *WOX* 基因的全基因组鉴定

从 TAIR 网站(<https://www.arabidopsis.org/>)下载拟南芥蛋白质氨基酸序列数据,从 BRAD 网站(<http://brassicadb.cn/#/>)下载芥菜蛋白质氨基酸序列数据。用 TBTools 软件(<https://github.com/CJ-Chen/TBtools/releases>)提取已报道的拟南芥 15 个 *WOX* 蛋白质氨基酸序列。将拟南芥的 *WOX* 蛋白质氨基酸序列作为 query 序列 BLASTP 比对(e^{-} value $<1e^{-5}$)芥菜蛋白数据,获得这些序列的同源序列并删除其中的重复序列。同时,在 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)下载 *WOX* 保守结构域(PF00046)作为模板序列,利用 HMM3.0 比对得到含有保守结构域的蛋白质氨基酸序列。将上述 2 种比对方法获得的候选蛋白质氨基酸序列合并,去除重复序列。进一步利用 Pfam 序列搜索(<http://pfam.xfam.org/>)、Batch CD-Search 分析(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)和 HMMER 序列分析(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>)验证候选蛋白是否含有 *WOX* 保守结构域,删除不完整或者缺失 *WOX* 结构域的候选基因,最终获得芥菜 *WOX* 基因。

1.2 系统发育进化树的构建和基因结构分析

利用 Clustal_W 工具将拟南芥和芥菜的 *WOX* 蛋白质氨基酸序列进行多重比对,将比对结果放入 MEGA 7.0 软件,在 p-distance 模型、bootstrap 参数 1 000 和成对删除选项下采用邻接法(neighbor-joining method, NJ)构建系统发育进

化树。从 BRAD 数据库(<http://brassicadb.cn/#/>)下载的芥菜基因组数据提取芥菜 *WOX* 基因的 DNA query 和 CDS query, 利用 TBTools 进行基因结构展示。

1.3 芥菜 *WOX* 基因编码蛋白的理化性质分析、二级结构分析和亚细胞定位

利用 ExPasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件预测芥菜 *WOX* 蛋白的氨基酸长度、分子量和等电点。利用 SOPMA 在线软件 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测分析 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲。利用 cello 软件^[19]对芥菜 *WOX* 基因或蛋白进行亚细胞定位预测。

1.4 芥菜 *WOX* 基因染色体定位和顺式作用元件分析

利用 TBTools 软件分析获得芥菜 *WOX* 基因在染色体上的物理位置, 并绘制 *WOX* 基因在染色体上的分布图。用 TBTools 软件截取芥菜各 *WOX* 基因上游 2 kb 序列, 并将其提交至 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和 NEWPLACE 在线软件 (<https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?sid=&lang=en&pj=640&action=page&page=newplace>) 进行启动子顺式作用元件的预测并手动整理。

1.5 芥菜 *WOX* 基因的表达分析

从芥菜转录组数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE64242>) 下载芥菜干旱和高温胁迫的转录组数据 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) 值^[29], 标准化后作为表达分析数据。用 TBtools 软件构建基因表达热图。

分别在叶芥 A960 (安徽叶芥) 的盛花期取成长叶、花和花茎, 盛果期取灌浆角果, 立即液氮速冻, 存放于 -80°C 冰箱。使用 Trizol 试剂(天根生化科技有限公司)提取芥菜叶、花、花茎和角果的总 RNA, 使用 FASTKING 一步法除

基因组 cDNA 第一链合成预混试剂(KR118) (天根生化科技有限公司)按说明书进行 cDNA 合成。以 cDNA 的 5 倍稀释液为模板进行扩增, 于荧光定量 PCR 仪(ABI QuantStudio 6 Flex)中进行实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)检测芥菜 *BjuWOX* 基因的表达情况, 所用引物见表 1, 每个样品进行 3 次生物学重复实验。以芥菜的 *GADPH* 基因为内参基因, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算 *BjuWOX* 基因的相对表达量, 将数据导入 SPSS 22.0 软件分析差异显著性, 利用 Excel2007 和 Origin8.5 制作图表。

2 结果与分析

2.1 芥菜 *WOX* 基因全基因组鉴定

根据拟南芥 15 个 *WOX* 基因的蛋白质氨基酸序列, 利用 BLASTP 和 HMM 比对搜索, 在 BRAD 芥菜基因组数据库中鉴定出 57 个 *WOX* 候选基因。进一步利用 Pfam、Batch CD-Search、HMMER 结构域搜索检验 *WOX* 候选基因是否含有完整结构域, 发现其中的 6 个 *WOX* 基因结构域不完整。例如芥菜 *WOX* 候选基因 *BjuA035902* 结构域片段仅含有 32 个氨基酸残基, *BjuB031427* 结构域只含有 17 个氨基酸残基, 推测这些 *WOX* 结构域不完整的候选基因可能是假基因。最后, 在芥菜基因组中鉴定出 51 个 *WOX* 基因, 并根据基因在染色体上的位置命名(表 2)。

2.2 系统发育进化树的构建和基因结构分析

为了构建芥菜 *WOX* 基因家族的进化树, 分别利用拟南芥 15 个和芥菜 51 个 *WOX* 基因编码的蛋白质氨基酸序列进行系统发育进化分析。结果发现(图 1), 根据进化树拓扑结构可将 *WOX* 蛋白分为 3 个亚家族, 分别为: WUS 支/现代支、中间支和古老支。在 3 个亚家族中均包含拟南芥和芥菜的 *WOX* 基因, 同时在进化树

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for real time fluorescence quantitative PCR

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>BjuWOX01</i>	GTGGTGGTGTGGTGGTTCTTCTAA	TCAGCCTGACATGCCATACTCCT
<i>BjuWOX04</i>	GGACTAAGTGTGGACGGTGAATC	ACACGTTCTTGCTCTCGATCTTACC
<i>BjuWOX08</i>	GCAACTTCACCAACAACAACCTCAA	AGCAGCAAGCGAAAGACGAATGA
<i>BjuWOX09</i>	GCCTGTCTCAATAGCGATGGTAGC	CTCTGTGTTCCCTTGCTCCTCTTGTC
<i>BjuWOX10</i>	GGCTCAGGCTCAGGAGGAATGTA	TTGATCTTCTGCTTGCTCGGTGTC
<i>BjuWOX14</i>	GGTGAATGCGGACTCCTAACG	GGTTGTTCCCTCTTCTGCTTCTGTCT
<i>BjuWOX17</i>	GCTCGCTCTCCTCCACAACCTCT	TGTCTCCGTTATCTGTCCGTGTTCA
<i>BjuWOX19</i>	AAGAAGAGATTCAACGGCACAGTCA	ACGCATTAAGAGCACCACATTCACT
<i>BjuWOX22</i>	ACTACAACAACGGAGTTCGGTCAC	GGTGCTGAAGAAGAGGATGATGGTT
<i>BjuWOX25</i>	ACCGAGCACCGATCAGATTCAGA	TGCAACGTCTCTATCACCTTCTCCT
<i>BjuWOX26</i>	ACTCGCTAAGCAACTTCACCAACAA	ACAGATGGGAGAAGGCTGAGAACA
<i>BjuWOX27</i>	GCCTGTCTCAATAGCGATGGTAGC	TCCTGTGTTCCGTTGCTGCTCTTG
<i>BjuWOX32</i>	GACACCGAGCAAGCAGAAGATCAA	CTCCACCTCAGACTCACCATTGTTG
<i>BjuWOX33</i>	GCATAGGAACACCGAGCAAGCAA	CGACCTCAGACTCACCATTGTTGTT
<i>BjuWOX36</i>	AATCACGGCTCCAGTGTGCAATG	TCGGCTTCTTCTTCTTGCTCAACAT
<i>BjuWOX48</i>	AGTCAATCTTCAACAGCGGTATGGT	GGTCTGGTCACAAGTATTGGTGGTT
<i>BjuWOX49</i>	GCATAGGAACACCGAGCAAGCAA	CGACCTCAGACTCACCATTGTTGTT
<i>BjuWOX51</i>	GAGCCACCGCAACATCATCATCA	TGACTGTGCCGTTGAATCTCTTCTT
<i>GAPDH</i>	ACCACTAACTGCCTTGCTCC	AGCTCTTCCACCTCTCCAGT

拓扑结构中发现,芥菜 *WOX* 基因在亚家族中分布不均匀, WUS 支/现代支中包含 29 个 *WOX* 基因, 中间支具有 13 个, 而古老支只含有 9 个 *WOX* 基因。为了研究芥菜 *WOX* 基因结构的多样性和系统发生情况, 我们仅对来自芥菜的 51 个 *WOX* 基因的蛋白质氨基酸序列构建系统发育进化树, 结果也分为 3 个亚家族(图 2)。对这些蛋白质的保守基序分析发现, 所有 51 个 *WOX* 蛋白都含有 motif 1 和 motif 3, 而 motif 4 和 motif 6 为古老支特有基序, motif 2 为中间支特有基序。通过比较芥菜 *WOX* 基因结构, 发现除 *BjuWOX38* 没有内含子外, 其余 *WOX* 基因均含有 1-7 个内含子, 同一亚家族的芥菜 *WOX* 基因具有相似的基因结构。

2.3 芥菜 *WOX* 基因编码蛋白的理化性质、二级结构分析和亚细胞定位

蛋白质氨基酸序列一级结构理化性质分析

显示(表 2), 芥菜 51 个 *WOX* 基因编码区长度在 348-1 401 bp 之间, 编码长度为 115-466 个氨基酸残基的蛋白质, 分子量为 13.4-52.4 kDa, 等电点范围为 4.84-10.00。不同 *BjuWOX* 蛋白氨基酸数目和理化性质存在一定的差异, 如 *BjuWOX23* 氨基酸残基数目最多为 466 个, *BjuWOX38* 的氨基酸残基数目最少为 115 个。其中有 22 个 *WOX* 基因的氨基酸序列理论等电点在碱性范围内, 其余 29 个 *WOX* 基因的氨基酸序列理论等电点都在酸性范围内。SOPMA 预测蛋白质二级结构显示(表 3), 芥菜 51 个 *WOX* 基因的氨基酸序列均含有 α -螺旋、随机卷曲、扩展链和 β -转角, 各 *WOX* 基因编码蛋白质二级结构中 α -螺旋含量在 12.58%-45.82%之间、随机卷曲含量在 36.91%-68.88%之间、扩展链含量在 5.22%-21.70%之间以及 β -转角含量在 2.33%-9.57%之间, 表明 51 个 *WOX* 基因氨基

表 2 *BjuWOX* 基因家族成员信息Table 2 The characteristics of *BjuWOX* gene family members

Gene name	Gene ID	Chromosome	Chromosome position	Strand	Coding region (bp)	Amino acids (aa)	Molecular weight (Da)	Theoretical isoelectric point
<i>BjuWOX01</i>	BjuA002999	A01	1 587 679–1 589 000	+	768	255	25 171.32	5.72
<i>BjuWOX02</i>	BjuA006339	A01	39 454 734–39 456 108	+	792	263	28 874.85	5.97
<i>BjuWOX03</i>	BjuA006340	A01	39 461 309–39 462 686	+	795	264	28 988.01	5.97
<i>BjuWOX04</i>	BjuA040937	A02	1 069 012–1 069 673	+	576	191	21 816.30	6.66
<i>BjuWOX05</i>	BjuA008004	A02	24 034 244–24 035 803	+	957	318	35 431.00	6.96
<i>BjuWOX06</i>	BjuA010056	A03	9 755 181–9 760 662	+	1 248	415	46 591.30	6.81
<i>BjuWOX07</i>	BjuA010055	A03	9 767 947–9 770 228	+	1 248	415	46 591.30	6.81
<i>BjuWOX08</i>	BjuA010821	A03	14 022 850–14 023 889	–	681	226	26 159.11	9.33
<i>BjuWOX09</i>	BjuA012587	A03	22 170 851–22 172 911	–	1 059	352	40 126.50	6.97
<i>BjuWOX10</i>	BjuA014157	A03	38 167 646–38 168 718	–	801	266	29 341.50	5.30
<i>BjuWOX11</i>	BjuA016365	A04	17 857 804–17 858 891	+	705	234	27 143.24	9.32
<i>BjuWOX12</i>	BjuA020101	A05	2 291 619–2 293 569	+	1 059	352	40 161.95	8.58
<i>BjuWOX13</i>	BjuA018465	A05	7 020 644–7 022 218	+	1 173	390	43 341.87	8.35
<i>BjuWOX14</i>	BjuA016427	A05	10 685 603–10 686 681	+	756	251	28 555.10	9.63
<i>BjuWOX15</i>	BjuA020524	A05	28 438 973–28 439 717	+	432	143	16 441.62	9.20
<i>BjuWOX16</i>	BjuA046118	A05	31 462 268–31 463 673	–	789	262	28 708.67	6.10
<i>BjuWOX17</i>	BjuA022314	A06	9 510 474–9 511 543	–	612	203	22 850.21	5.43
<i>BjuWOX18</i>	BjuA023426	A06	20 100 027–20 101 694	–	861	286	32 505.86	8.45
<i>BjuWOX19</i>	BjuA001259	A07	3 017 519–3 019 087	+	909	302	34 319.65	6.85
<i>BjuWOX20</i>	BjuA028186	A08	4 803 512–4 804 874	+	774	257	29 308.82	9.27
<i>BjuWOX21</i>	BjuA029662	A08	19 131 437–19 132 415	+	708	235	26 861.00	5.33
<i>BjuWOX22</i>	BjuA032954	A09	9 560 803–9 562 506	–	912	303	34 484.58	6.51
<i>BjuWOX23</i>	BjuA033941	A09	19 747 090–19 762 688	–	1 401	466	52 374.33	8.26
<i>BjuWOX24</i>	BjuA044155	A09	51 413 871–51 414 954	–	705	234	27 252.76	6.26
<i>BjuWOX25</i>	BjuA039918	A10	18 251 214–18 251 887	–	579	192	22 073.82	8.99
<i>BjuWOX26</i>	BjuB026308	B01	14 632 679–14 633 820	–	714	237	27 520.75	9.33
<i>BjuWOX27</i>	BjuB025530	B01	38 461 645–38 463 570	+	1 059	352	40 214.64	7.73
<i>BjuWOX28</i>	BjuB023627	B01	42 713 843–42 714 615	–	435	144	16 447.6	8.95
<i>BjuWOX29</i>	BjuB033714	B02	3 399 613–3 401 251	+	870	289	32 614.77	8.22
<i>BjuWOX30</i>	BjuB035507	B02	42 724 373–42 726 395	+	906	301	33 301.96	6.29
<i>BjuWOX31</i>	BjuB048545	B02	51 571 515–51 576 500	–	828	275	31 415.07	9.54
<i>BjuWOX32</i>	BjuB049008	B02	65 938 186–65 939 206	–	780	259	28 815.91	5.52
<i>BjuWOX33</i>	BjuB043771	B03	5 590 229–5 591 299	+	792	263	29 556.91	5.77
<i>BjuWOX34</i>	BjuB032260	B03	14 476 095–14 477 263	+	792	263	30 819.65	5.75
<i>BjuWOX35</i>	BjuB018002	B03	16 565 015–16 566 608	+	621	206	23 222.65	6.17
<i>BjuWOX36</i>	BjuB027615	B04	4 511 951–4 520 759	–	1 347	448	50 515.52	4.84
<i>BjuWOX37</i>	BjuB027817	B04	6 876 330–6 881 849	+	1 029	342	39 510.81	5.66
<i>BjuWOX38</i>	BjuB028686	B04	17 008 402–17 008 746	+	348	115	13 412.76	10.00
<i>BjuWOX39</i>	BjuB045340	B05	3 918 951–3 920 185	+	795	264	29 387.54	5.72
<i>BjuWOX40</i>	BjuB003204	B05	17 864 066–17 864 745	–	585	194	22 255.93	6.25
<i>BjuWOX41</i>	BjuB011697	B05	28 469 134–28 470 185	–	804	267	30 038.34	9.61
<i>BjuWOX42</i>	BjuB004417	B06	15 414 851–15 415 913	–	741	246	27 941.44	9.54

(待续)

(续表 2)

Gene name	Gene ID	Chromosome	Chromosome position	Strand	Coding region (bp)	Amino acids (aa)	Molecular weight (Da)	Theoretical isoelectric point
<i>BjuWOX43</i>	BjuB005294	B07	681 725–651 145	–	798	265	28 954.85	5.97
<i>BjuWOX44</i>	BjuB008508	B07	23 697 585–23 699 547	–	1 038	345	39 476.79	6.74
<i>BjuWOX45</i>	BjuB002871	B07	34 355 689–34 356 734	–	774	257	29 337.01	9.51
<i>BjuWOX46</i>	BjuB016205	B08	18 159 955–18 161 926	–	1 080	359	40 313.44	7.88
<i>BjuWOX47</i>	BjuB046140	B08	30 950 917–30 951 993	+	681	226	26 129.09	9.39
<i>BjuWOX48</i>	BjuO000931	Contig118_1274036_2398663_1051118_1124627	9 969–11 389	+	789	262	28 925.90	5.76
<i>BjuWOX49</i>	BjuO004268	Contig254_106612_1426954_1_97414	87 066–88 136	–	792	263	29 572.86	5.67
<i>BjuWOX50</i>	BjuO007820	Contig533	1 085 294–1 086 916	+	1 179	392	43 447.02	8.36
<i>BjuWOX51</i>	BjuO012621	Super_scaffold_41_1_1402938	67 707–69 429	–	933	310	35 086.44	6.79

+: Sense strand; -: Antisense strand.

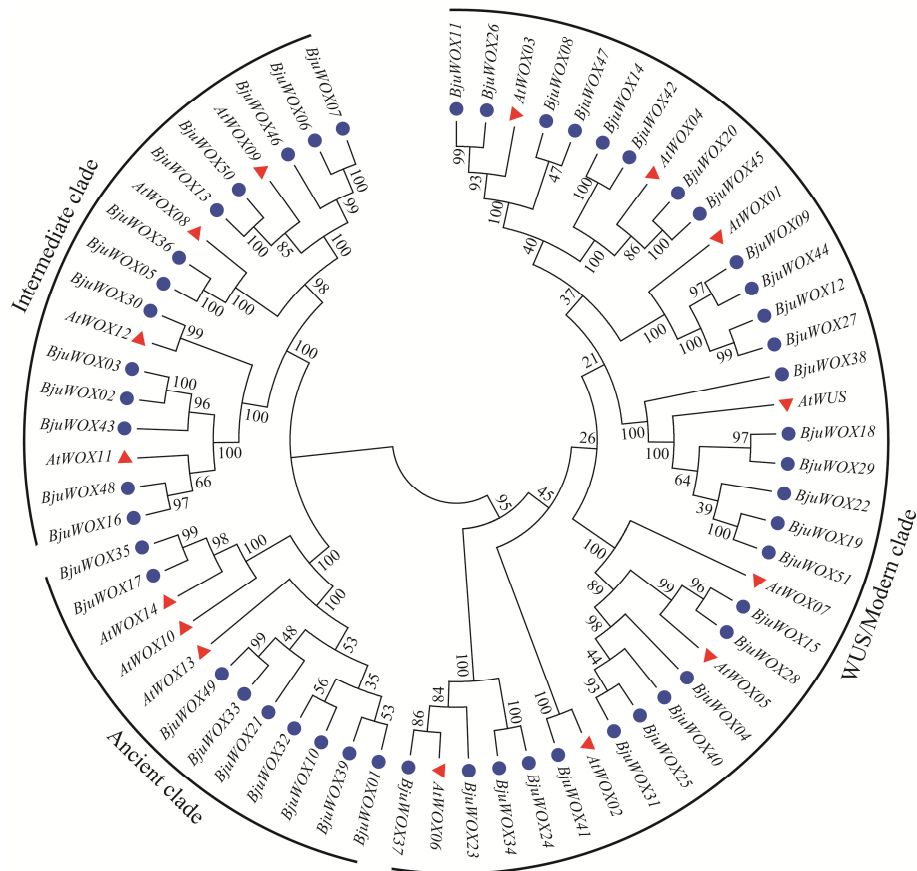


图 1 芥菜和拟南芥 *WOX* 基因家族的系统进化树 蓝色圆形代表芥菜 *WOX* 基因，红色三角形代表拟南芥 *WOX* 基因

Figure 1 Phylogenetic tree of *WOX* genes in *Brassica juncea* and *Arabidopsis thaliana*. The blue circles represent the mustard *WOX* genes, and the red triangles represent the *Arabidopsis* *WOX* genes.

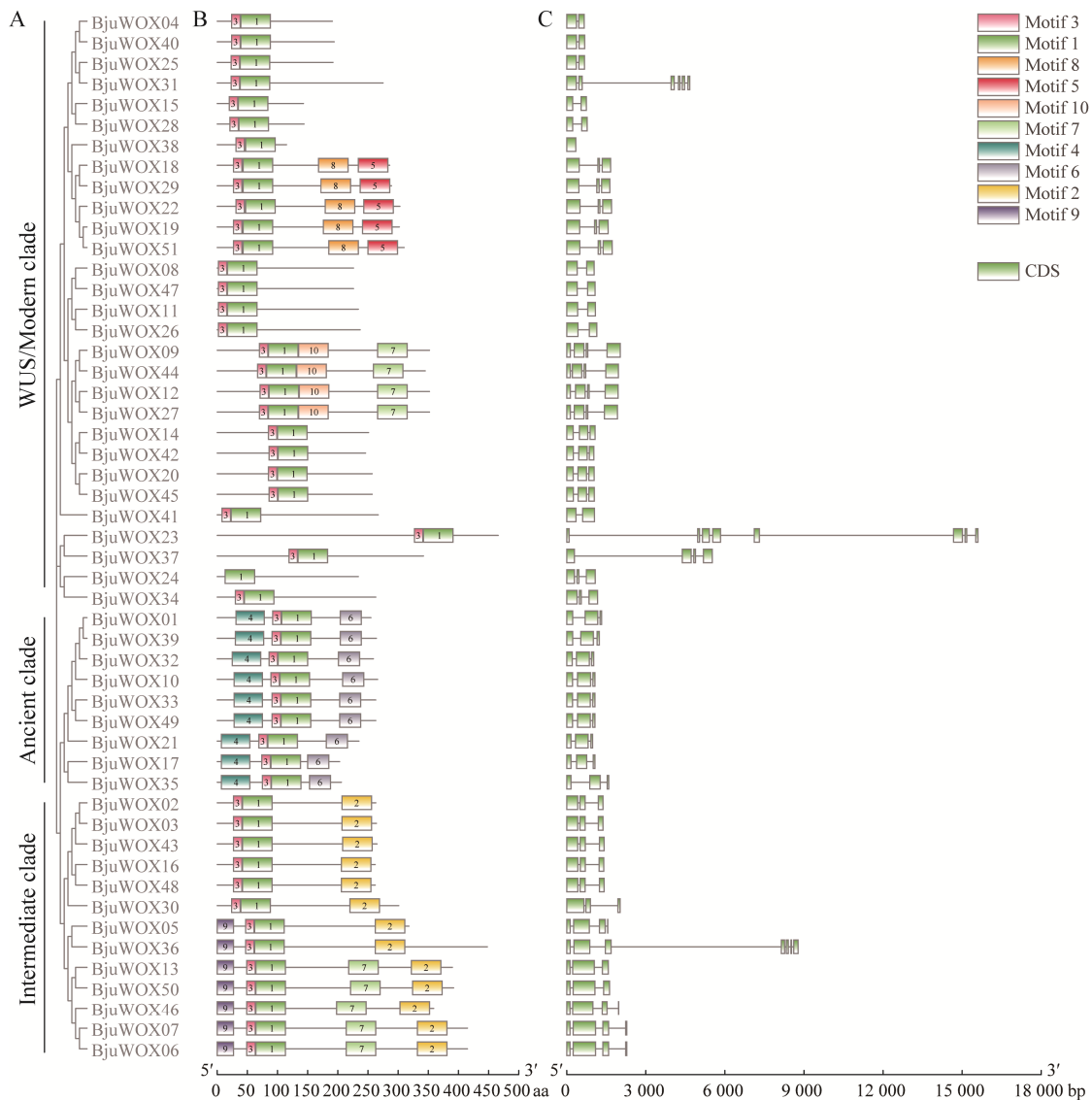


图2 芥菜 *WOX* 基因家族的系统进化和基因结构 A: 芥菜 *WOX* 基因系统发育进化树. B: 芥菜 *WOX* 基因编码蛋白质保守结构域. C: 芥菜 *WOX* 基因外显子和内含子结构

Figure 2 Phylogenetic relationships and gene structure of *WOX* genes in *Brassica juncea*. A: Phylogenetic tree of mustard *WOX* genes. B: Protein conservative domains of mustard *WOX* genes. C: Exon and intron structure of *WOX* genes in mustard.

酸序列二级结构主要以 α -螺旋和随机卷曲为主。同时,亚细胞定位预测显示 51 个芥菜 *WOX* 基因均定位在细胞核中。

2.4 芥菜 *WOX* 基因染色体定位和顺式作用元件分析

根据染色体定位结果(表 2, 图 3), 芥菜的

47 个 *WOX* 基因不均匀地分布在 18 条染色体上, 其中 A05 染色体上分布的 *WOX* 基因最多 (5 个), 而 A04、A07、A10 和 B06 染色体上分布的 *WOX* 基因最少(1 个), 另外 4 个 *WOX* 基因 (*BjuWOX48*–*BjuWOX51*) 分别位于 Contig118_1274036_2398663_1051118_1124627、Contig254_

表 3 芥菜 *WOX* 基因编码蛋白的二级结构Table 3 Secondary structure of the proteins encoded by mustard *WOX* genes

Gene name	α -helix	Extended strand	β -turn	Random coil	Gene name	α -helix	Extended strand	β -turn	Random coil
<i>BjuWOX01</i>	34.12	8.63	3.92	53.33	<i>BjuWOX27</i>	25.00	12.50	3.69	58.81
<i>BjuWOX02</i>	17.49	15.59	7.22	59.70	<i>BjuWOX28</i>	33.33	15.97	4.17	46.53
<i>BjuWOX03</i>	17.05	16.29	7.20	59.47	<i>BjuWOX29</i>	17.99	11.42	4.84	65.74
<i>BjuWOX04</i>	30.89	12.04	3.66	53.40	<i>BjuWOX30</i>	25.58	15.61	7.97	50.83
<i>BjuWOX05</i>	12.58	21.70	5.03	60.69	<i>BjuWOX31</i>	45.82	11.64	5.09	37.45
<i>BjuWOX06</i>	22.89	18.31	5.30	53.49	<i>BjuWOX32</i>	34.75	9.65	5.41	50.19
<i>BjuWOX07</i>	22.89	18.31	5.30	53.49	<i>BjuWOX33</i>	30.42	9.51	5.32	54.75
<i>BjuWOX08</i>	30.09	7.08	3.10	59.73	<i>BjuWOX34</i>	30.80	18.25	4.94	46.01
<i>BjuWOX09</i>	25.85	11.08	3.12	59.94	<i>BjuWOX35</i>	37.38	6.80	4.85	50.97
<i>BjuWOX10</i>	33.83	8.65	4.89	52.63	<i>BjuWOX36</i>	29.91	13.62	3.79	52.68
<i>BjuWOX11</i>	27.35	16.24	6.41	50.00	<i>BjuWOX37</i>	31.87	17.84	7.31	42.98
<i>BjuWOX12</i>	25.28	11.93	3.41	59.38	<i>BjuWOX38</i>	24.35	5.22	9.57	60.87
<i>BjuWOX13</i>	18.72	16.15	6.67	58.46	<i>BjuWOX39</i>	37.88	7.20	4.92	50.00
<i>BjuWOX14</i>	39.84	8.37	3.59	48.21	<i>BjuWOX40</i>	27.32	19.59	4.12	48.97
<i>BjuWOX15</i>	39.16	11.89	4.90	44.06	<i>BjuWOX41</i>	20.22	13.48	5.62	60.67
<i>BjuWOX16</i>	14.12	13.74	6.49	65.65	<i>BjuWOX42</i>	31.30	7.32	4.47	56.91
<i>BjuWOX17</i>	37.44	7.39	4.43	50.74	<i>BjuWOX43</i>	14.72	15.09	6.79	63.40
<i>BjuWOX18</i>	17.48	11.19	2.45	68.88	<i>BjuWOX44</i>	27.25	9.57	3.48	59.71
<i>BjuWOX19</i>	22.52	7.28	3.97	66.23	<i>BjuWOX45</i>	35.02	8.17	2.33	54.47
<i>BjuWOX20</i>	27.24	7.00	4.28	61.48	<i>BjuWOX46</i>	14.21	15.60	3.90	66.30
<i>BjuWOX21</i>	35.32	9.36	4.68	50.64	<i>BjuWOX47</i>	28.76	11.95	3.10	56.19
<i>BjuWOX22</i>	21.12	7.26	3.96	67.66	<i>BjuWOX48</i>	16.41	12.60	5.73	65.27
<i>BjuWOX23</i>	40.99	15.02	7.08	36.91	<i>BjuWOX49</i>	32.32	9.89	4.18	53.61
<i>BjuWOX24</i>	36.75	14.10	5.98	43.16	<i>BjuWOX50</i>	19.90	18.37	7.14	54.59
<i>BjuWOX25</i>	30.73	13.54	4.17	51.56	<i>BjuWOX51</i>	18.39	11.61	3.55	66.45
<i>BjuWOX26</i>	27.00	17.72	5.91	49.37					

106612_1426954_1_97414、Contig533 和 Super_scaffold_41_1_1402938 上。

利用 PLANTCARE 和 NEWPLACE 在线软件分析芥菜 *WOX* 基因启动子序列的顺式作用元件, 结果共鉴定到了 42 种 5 856 个顺式作用元件, 除了含有启动子基础作用元件 CAAT-Box、GATA-Box、TATA-Box 等之外, 还含有多种与激素应答、组织特异性表达、生物和非生物胁迫诱导等相关的顺式作用元件(图 4)。其中, 芥菜 51 个 *WOX* 基因都含有光照响应元件, 暗示芥

菜 *WOX* 基因表达可能受光调节。除 *BjuWOX51* 外, *BjuWOX01*–*BjuWOX50* 均含有赤霉素响应元件; 有 28、19、39 个 *WOX* 基因分别含有生长素、玉米素和脱落酸响应元件; 此外有 33、19 个 *WOX* 基因分别含有茉莉酸和水杨酸响应元件; 有 45、29、20 个 *WOX* 基因分别含有缺氧、干旱和低温响应元件; 有 8、6 和 5 个 *WOX* 基因分别含有胚乳、分生组织和种子特异性响应元件。推测芥菜 *WOX* 基因参与多个信号通路调控芥菜的生长发育过程和对环境刺激的响应。

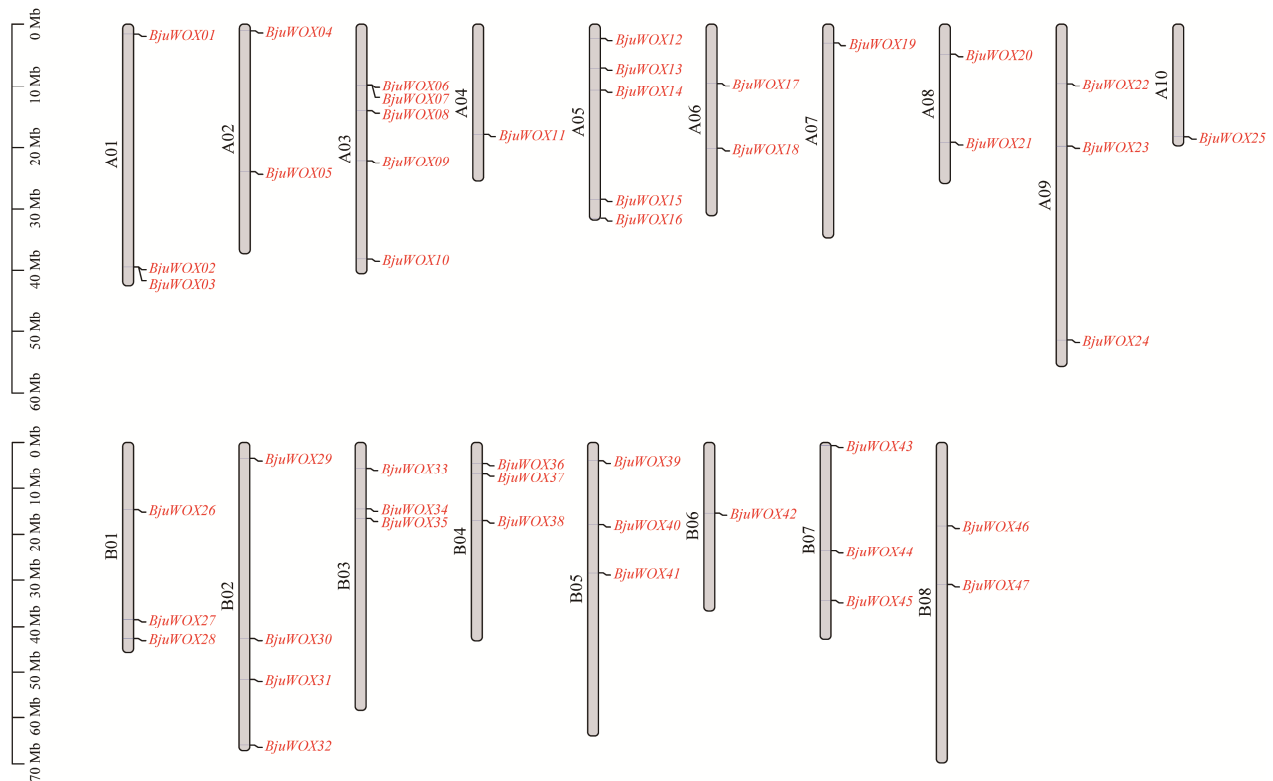


图3 芥菜 *WOX* 基因在染色体上的位置 最左侧标尺表示染色体长度; A01–A10、B01–B08 分别表示芥菜的 18 条染色体名称

Figure 3 Chromosomal position of *WOX* genes in *Brassica juncea*. The leftmost scales represent the chromosome length; A01–A10 and B01–B08 represent the names of 18 chromosomes of mustard respectively.

2.5 芥菜 *WOX* 基因在逆境下和不同组织中的表达分析

利用 RNA-Seq 数据分析了芥菜 *WOX* 基因在高温和干旱胁迫下的表达情况。结果显示(图 5), 共有 12 个 *WOX* 基因在高温和干旱处理后检测到表达, 与未经高温和干旱处理相比, 在干旱处理后, 有 2 个基因(*BjuWOX10* 和 *BjuWOX32*)明显上调表达, 另有 3 个基因(*BjuWOX09*、*BjuWOX27* 和 *BjuWOX31*)下调表达。在高温处理后, 也有 2 个基因(*BjuWOX11* 和 *BjuWOX23*)明显上调表达, 3 个基因(*BjuWOX09*、*BjuWOX32* 和 *BjuWOX33*)下调表达。其余基因在干旱或高温胁迫处理后未检测到表达, 推测这些基因的表达可能不受干旱和高温胁迫的影响。

对 18 个 *BjuWOXs* 基因在芥菜叶片、花、

花茎和角果中的实时荧光定量 PCR 分析发现(图 6), 除 *BjuWOX26* 外, 其余 *WOX* 基因在幼嫩的角果中的表达水平明显高于叶片、花和花茎, 其中 *BjuWOX25*、*BjuWOX33*、*BjuWOX49* 的相对表达量分别是内参基因的 10、25、30 倍, 说明这 3 个基因在芥菜角果的发育过程中起着十分重要的作用, 其余基因也发挥一定的作用。*BjuWOX14*、*BjuWOX25*、*BjuWOX32*、*BjuWOX33*、*BjuWOX36*、*BjuWOX49* 在叶片、花和花茎也有较高水平的表达, 说明这些基因对芥菜叶片、花和花茎的生长发育也具有一定的作用。*BjuWOX01*、*BjuWOX04*、*BjuWOX08*、*BjuWOX09*、*BjuWOX10*、*BjuWOX17*、*BjuWOX19*、*BjuWOX22*、*BjuWOX26*、*BjuWOX27*、*BjuWOX48*、*BjuWOX51* 在叶片、花和花茎中有很低水平的表达, 推测

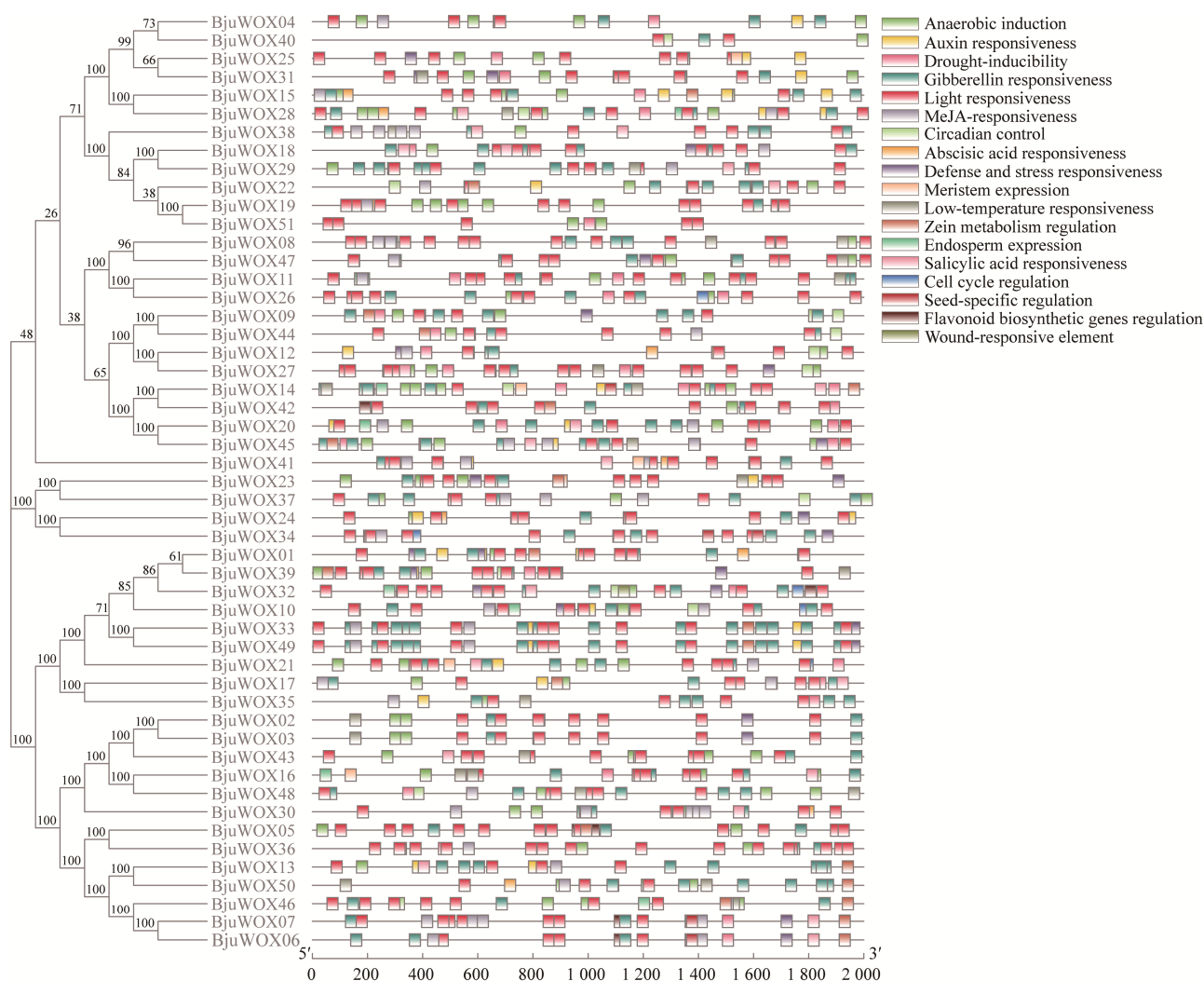


图4 芥菜 *WOX* 基因家族启动子顺式作用元件分布 芥菜 *WOX* 基因上游启动子 2 000 bp 区段含有的各种顺式作用元件, 包括光反应元件, 激素反应元件, 干旱、低温、缺氧、伤害等反应元件, 以及分生组织、种子、胚乳等特异性元件

Figure 4 *Cis*-acting element distribution in the promoters of the *WOX* genes in *Brassica juncea*. The 2 000 bp promoter sequences of mustard *WOX* genes contain a variety of *cis*-acting elements, including photo responsive elements, hormone responsive elements, drought, low temperature, anaerobic, wound and other response elements, as well as specific elements of meristem, seed, and endosperm.

它们可能参与其他生理活动, 这需要进一步的实验验证。

3 讨论与结论

本研究从芥菜基因组中成功鉴定出 51 个 *WOX* 基因, 其中 47 个 *WOX* 基因不均匀分布于

芥菜的 18 条染色体上(A01–A10、B01–B08), 另外 4 个未能定位到染色体上, 相比于同为十字花科植物的拟南芥只有 15 个 *WOX* 基因, 作为异源四倍体(AABB 基因组)的芥菜, 具有了更多的 *WOX* 基因, 这可能是芥菜在进化过程中出现多次加倍事件和基因丢失导致的^[30]。而甘蓝型



图 5 *BjuWOXs* 在干旱及高温胁迫下的表达 BDS: 干旱胁迫处理 12 h. BHS: 高温胁迫处理 4 h

Figure 5 Expression profiles of *BjuWOXs* under drought and high temperature stresses. BDS: Treatment for 12 h under drought stress; BHS: Treatment for 4 h under high temperature stress.

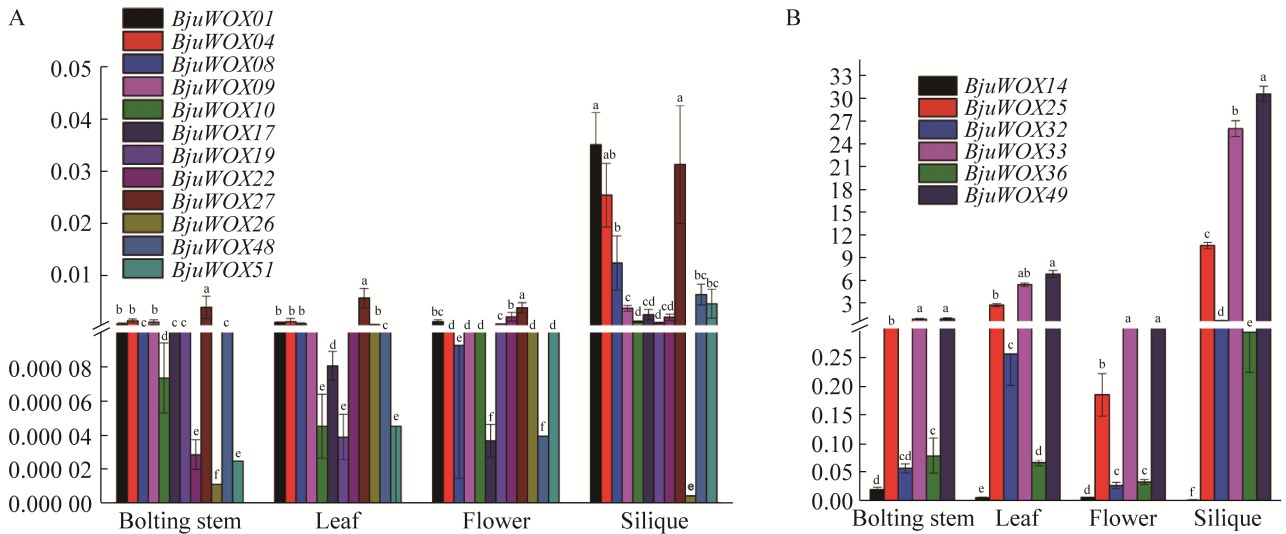


图 6 *BjuWOXs* 在芥菜不同组织中的表达 A 和 B 分别表示在芥菜花薹、叶、花、角果中表达水平相对较低和相对较高的部分 *WOX* 基因. 不同小写字母表示差异达显著水平 $P < 0.05$

Figure 6 Expression profiles of *BjuWOXs* in different tissues of *Brassica juncea*. A and B represent some *WOX* genes with relatively low expression level and relatively high expression level in mustard bolting stem, leaf, flower and siliques, respectively. Different lowercase letters showed significant difference at 0.05 level.

油菜(异源四倍体, AACC 基因组, A01–A10, C01–C09)具有 58 个 *WOX* 基因,其中 49 个 *WOX* 基因不均匀分布于 19 条染色体上,其余 9 个未能定位^[13]。芥菜和油菜的基因组大小比较接近,进化过程也有一定的相似性(出现过多倍化事件),但是由于其重复序列占比较大,基因组序列还存在不少缺失(gap),因此芥菜基因组中可能还有一些 *WOX* 基因未能被鉴定出来,这需要进一步的研究。

系统发育分析表明,芥菜 WUS 支/现代支中有多个 *WOX* 基因分别与拟南芥的 *AtWOX1*、*AtWOX3*、*AtWOX4*、*AtWOX6*、*AtWOX7* 亲缘关系较近,如 *BjuWOX09*、*BjuWOX12*、*BjuWOX27*、*BjuWOX44* 与 *AtWOX1* 亲缘关系最近; *BjuWOX08*、*BjuWOX11*、*BjuWOX26*、*BjuWOX47* 与 *AtWOX3* 亲缘关系最近。中间支中, *BjuWOX02*、*BjuWOX03*、*BjuWOX16*、*BjuWOX43*、*BjuWOX48* 与 *AtWOX11* 亲缘关系最近; *BjuWOX06*、*BjuWOX07*、*BjuWOX13*、*BjuWOX46*、*BjuWOX50* 与 *AtWOX9* 亲缘关系最近,等等,油菜 *WOX* 基因也具有类似情况^[30],进一步说明芥菜基因组的多倍化事件导致 *WOX* 基因数量大大增加。

表达模式分析发现, *BjuWOX10*、*BjuWOX32* 在干旱处理后上调表达,而 *BjuWOX09*、*BjuWOX27*、*BjuWOX31* 下调表达,这几个基因的启动子区均含有干旱相关的 DRE 顺式作用元件。*BjuWOX11*、*BjuWOX23* 在高温处理后上调表达,而 *BjuWOX09*、*BjuWOX32*、*BjuWOX33* 下调表达,这几个基因的启动子区均含有 ABRE 顺式作用元件,推测其对高温的响应可能涉及到 ABA 信号途径。*BjuWOX14*、*BjuWOX25*、*BjuWOX32*、*BjuWOX33*、*BjuWOX36*、*BjuWOX49* 在发育的花、花茎和角果中有较高水平的表达,分析这几个基因的启动子发现它们均具有赤霉

素或生长素或玉米素顺式作用元件,推测这几个基因可能参与了芥菜分生组织的维持。*BjuWOX14* 与拟南芥 *AtWOX4* 亲缘关系很近,据报道, *AtWOX4* 基因主要参与 SAM 与 RAM 维管束的发育与形成^[31];突变体研究发现 TDIF-TDR-WOX4 信号在拟南芥次生长过程中的维管分生组织的维持具有重要角色^[32],据此推测 *BjuWOX14* 也可能具有类似的功能。*BjuWOX32*、*BjuWOX33*、*BjuWOX49* 与 *AtWOX13* 同属于古老支,且亲缘关系较近,在拟南芥中, *WOX13* 在主根和侧根以及花药中表达,具有防止提前分化的功能^[19], *AtWOX13* 功能缺失突变体表现出胚座框变小的表型^[33],推测 *BjuWOX32*、*BjuWOX33*、*BjuWOX49* 在功能上可能也有着相似的作用,但还需要进一步的实验验证。

本研究在全基因组水平上鉴定了异源四倍体芥菜的 *WOX* 基因家族成员,并分析了其理化性质、基因结构、染色体定位、进化关系和表达特征等,为利用基因工程技术改良芥菜生长发育特性和逆境抗性提供了一定的依据和候选基因。

REFERENCES

- [1] van der GRAAFF E, LAUX T, RENSING SA. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(12): 248.
- [2] LAUX T, MAYER KF, BERGER J, JÜRGENS G. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*[J]. *Development*: Cambridge, England, 1996, 122(1): 87-96.
- [3] KAMIYA N, NAGASAKI H, MORIKAMI A, SATO Y, MATSUOKA M. Isolation and characterization of a rice *WUSCHEL*-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2003, 35(4): 429-441.
- [4] MUKHERJEE K, BROCCIERI L, BÜRGLIN TR. A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes[J]. *Molecular Biology and*

- Evolution, 2009, 26(12): 2775-2794.
- [5] HAECKER A, GROSS-HARDT R, GEIGES B, SARKAR A, BREUNINGER H, HERRMANN M, LAUX T. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*[J]. Development: Cambridge, England, 2004, 131(3): 657-668.
- [6] LIAN GB, DING ZW, WANG Q, ZHANG DB, XU J. Origins and evolution of WUSCHEL-related homeobox protein family in plant kingdom[J]. The Scientific World Journal, 2014, 2014: 534140.
- [7] IKEDA M, MITSUDA N, OHME-TAKAGI M. *Arabidopsis* WUSCHEL is a bifunctional transcription factor that acts as a repressor in stem cell regulation and as an activator in floral patterning[J]. The Plant Cell, 2009, 21(11): 3493-3505.
- [8] 王俞程, 何瑞萍, 彭献军, 沈世华. WOX 转录因子家族研究进展[J]. 草业科学, 2015, 32(5): 760-769. WANG YC, HE RP, PENG XJ, SHEN SH. The research progress of WOX transcription factor family[J]. Pratacultural Science, 2015, 32(5): 760-769 (in Chinese).
- [9] 李晓旭, 刘成, 李伟, 张增林, 高晓明, 周慧, 郭永峰. 番茄 WOX 转录因子家族的鉴定及其进化、表达分析[J]. 遗传, 2016, 38(5): 444-460. LI XX, LIU C, LI W, ZHANG ZL, GAO XM, ZHOU H, GUO YF. Genome-wide identification, phylogenetic analysis and expression profiling of the WOX family genes in *Solanum lycopersicum*[J]. Hereditas, 2016, 38(5): 444-460 (in Chinese).
- [10] ZHANG X, ZONG J, LIU JH, YIN JY, ZHANG DB. Genome-wide analysis of *WOX* gene family in rice, sorghum, maize, *Arabidopsis* and poplar[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52(11): 1016-1026.
- [11] 武强强, 张凤洁, 董浩欢, 卢平, 樊婕, 李雪垠, 王爱萍, 董琦. 小麦 WOX 转录因子基因的全基因组鉴定与分析[J]. 激光生物学报, 2021, 30(1): 67-74. WU QQ, ZHANG FJ, DONG HH, LU P, FAN J, LI XY, WANG AP, DONG Q. Genome-wide identification and analyses of WOX transcription factor genes in wheat[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2021, 30(1): 67-74 (in Chinese).
- [12] RATHOUR M, SHARMA A, KAUR A, UPADHYAY SK. Genome-wide characterization and expression and co-expression analysis suggested diverse functions of *WOX* genes in bread wheat[J]. Heliyon, 2020, 6(12): e05762.
- [13] WANG MM, LIU MM, RAN F, GUO PC, KE YZ, WU YW, WEN J, LI PF, LI JN, DU H. Global analysis of WOX transcription factor gene family in *Brassica napus* reveals their stress- and hormone-responsive patterns[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(11): 3470.
- [14] HE P, ZHANG YZ, LIU H, YUAN Y, WANG C, YU JN, XIAO GH. Comprehensive analysis of *WOX* genes uncovers that *WOX13* is involved in phytohormone-mediated fiber development in cotton[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 312.
- [15] HAO QN, ZHANG L, YANG YY, SHAN ZH, ZHOU XN. Genome-wide analysis of the *WOX* gene family and function exploration of GmWOX18 in soybean[J]. Plants: Basel, Switzerland, 2019, 8(7): 215.
- [16] AKBULUT SE, OKAY A, AKSOY T, ARAS ES, BÜYÜK İ. The genome-wide characterization of *WOX* gene family in *Phaseolus vulgaris* L. during salt stress[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2022, 28(6): 1297-1309.
- [17] HAN N, TANG R, CHEN XQ, XU ZX, REN ZH, WANG LN. Genome-wide identification and characterization of *WOX* genes in *Cucumis sativus*[J]. Genome, 2021, 64(8): 761-776.
- [18] 董新玉, 邓浪, 张亚春, 陈国发, 李树锋. 大蒜全基因组 WOX 基因家族鉴定及密码子使用偏性分析[J]. 西南农业学报, 2022, 35(2): 285-293. DONG XY, DENG L, ZHANG YC, CHEN GF, LI SF. Identification of *WOX* genes family and analysis of codon usage bias in garlic genome[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2022, 35(2): 285-293 (in Chinese).
- [19] SARKAR AK, LUIJTEN M, MIYASHIMA S, LENHARD M, HASHIMOTO T, NAKAJIMA K, SCHERES B, HEIDSTRA R, LAUX T. Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers[J]. Nature, 2007, 446(7137): 811-814.
- [20] NAIR R, ROST B. LOCnet and LOCtarget: sub-cellular localization for structural genomics targets[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(suppl_2): W517-W521.
- [21] BREUNINGER H, RIKIRSCH E, HERMANN M, UEDA M, LAUX T. Differential expression of *WOX* genes mediates apical-basal axis formation in the *Arabidopsis* embryo[J]. Developmental Cell, 2008, 14(6): 867-876.
- [22] SHIMIZU R, JIJB, KELSEY E, OHTSU K, SCHNABLE PS, SCANLON MJ. Tissue specificity

- and evolution of meristematic *WOX3* function[J]. *Plant Physiology*, 2009, 149(2): 841-850.
- [23] JIJB, STRABLE J, SHIMIZU R, KOENIG D, SINHA N, SCANLON MJ. *WOX4* promotes procambial development[J]. *Plant Physiology*, 2010, 152(3): 1346-1356.
- [24] PARK SO, ZHENG ZG, OPPENHEIMER DG, HAUSER BA. The *PRETTY FEW SEEDS2* gene encodes an *Arabidopsis* homeodomain protein that regulates ovule development[J]. *Development*: Cambridge, England, 2005, 132(4): 841-849.
- [25] ZHU JH, SHI HZ, LEE BH, DAMSZ B, CHENG SE, STIRM V, ZHU JK, HASEGAWA PM, BRESSAN RA. An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor gene, *HOS9*, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(26): 9873-9878.
- [26] DEVEAUX Y, TOFFANO-NIOCHE C, CLAISSE G, THAREAU V, MORIN H, LAUFS P, MOREAU H, KREIS M, LECHARNY A. Genes of the most conserved *WOX* clade in plants affect root and flower development in *Arabidopsis*[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8: 291.
- [27] CHENG SF, HUANG YL, ZHU N, ZHAO Y. The rice *WUSCHEL*-related homeobox genes are involved in reproductive organ development, hormone signaling and abiotic stress response[J]. *Gene*, 2014, 549(2): 266-274.
- [28] YANG ZE, GONG Q, QIN WQ, YANG ZR, CHENG Y, LU LL, GE XY, ZHANG CJ, WU ZX, LI FG. Genome-wide analysis of *WOX* genes in upland cotton and their expression pattern under different stresses[J]. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 113.
- [29] BHARDWAJ AR, JOSHI G, KUKREJA B, MALIK V, ARORA P, PANDEY R, SHUKLA RN, BANKAR KG, KATIYAR-AGARWAL S, GOEL S, JAGANNATH A, KUMAR A, AGARWAL M. Global insights into high temperature and drought stress regulated genes by RNA-Seq in economically important oilseed crop *Brassica juncea*[J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15: 9.
- [30] LI MD, WANG RH, LIU ZY, WU XM, WANG JB. Genome-wide identification and analysis of the *WUSCHEL*-related homeobox (*WOX*) gene family in allotetraploid *Brassica napus* reveals changes in *WOX* genes during polyploidization[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 317.
- [31] ETCHELLES JP, PROVOST CM, MISHRA L, TURNER SR. *WOX4* and *WOX14* act downstream of the *PXY* receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation[J]. *Development*: Cambridge, England, 2013, 140(10): 2224-2234.
- [32] ZHAO Y, HU YF, DAI MQ, HUANG LM, ZHOU DX. The *WUSCHEL*-related homeobox gene *WOX11* is required to activate shoot-borne crown root development in rice[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(3): 736-748.
- [33] ROMERA-BRANCHAT M, RIPOLL JJ, YANOFSKY MF, PELAZ S. The *WOX13* homeobox gene promotes replum formation in the *Arabidopsis thaliana* fruit[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2013, 73(1): 37-49.

(本文责编 郝丽芳)