

甜瓜 *WAK/WAKL* 基因家族鉴定及响应疫霉菌侵染的表达分析

张林龙^{1,2}, 王方方^{1,2#}, 何玉敏^{1,2}, 薛冰^{1,2}, 沈晨阳^{1,2},
李杰^{1,2}, 赵胜杰^{1,2}, 徐志红^{1,2*}, 王平勇^{1,2*}

(¹中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009; ²三亚中国农业科学院国家南繁研究院, 海南三亚 572024)

摘要:【目的】鉴定甜瓜 *MeWAK/WAKL* 基因家族, 分析抗感材料在疫霉菌侵染下的表达模式, 探究该家族基因与甜瓜抗疫病的关系。【方法】根据 *WAK/WAKL* 家族基因的保守结构域特征, 基于全基因组筛选甜瓜 *WAK/WAKL* 家族基因。利用生物信息学方法分析家族基因的基因结构、蛋白理化性质、染色体分布、亚细胞定位、启动子顺式作用元件、进化关系。通过荧光定量PCR技术分析该家族成员在抗感材料接种疫病菌后不同时间的表达模式。【结果】甜瓜 *WAK/WAKL* 基因家族包括4个 *WAK* 基因和16个 *WAKL* 基因, 该家族基因主要定位于细胞外基质或质膜。系统进化树将甜瓜、本氏烟草、拟南芥和番茄中共113个 *WAK/WAKL* 家族基因分成6个亚族。甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因主要分布在亚族 I 和 VI 中, 其中7个 *MeWAKL* 基因独立构成亚族 I。启动子顺式作用元件分析显示, 该家族基因启动子中分布有光反应元件、分生组织表达响应元件、多种激素响应元件以及干旱、抗性和胁迫相关元件, 表明该家族基因在甜瓜抗病、抗逆以及生长发育方面发挥重要作用。通过荧光定量PCR发现, *MeWAKL4* 和 *MeWAKL16* 在抗病材料接种后特异性上调表达, 可能在甜瓜抗疫病反应中发挥重要作用, 具体作用机制还需进一步试验验证。【结论】鉴定了20个 *MeWAK/WAKL* 家族基因, 发现 *MeWAKL4* 和 *MeWAKL16* 在抗病材料接种疫病菌后特异性上调表达, 为进一步研究甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因与抗疫病反应的具体关联性奠定了基础。

关键词: 甜瓜; *WAK/WAKL* 基因家族; 疫病; 表达分析

中图分类号: S652

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2025)10-2273-14

Identification of the *WAK/WAKL* gene family in melon and expression analysis in response to *Phytophthora capsici* infection

ZHANG Linlong^{1,2}, WANG Fangfang^{1,2#}, HE Yumin^{1,2}, XUE Bing^{1,2}, SHEN Chenyang^{1,2}, LI Jie^{1,2}, ZHAO Shengjie^{1,2}, XU Zhihong^{1,2*}, WANG Pingyong^{1,2*}

(¹Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China; ²National Nanfan Research Institute (Sanya), Chinese Academy of Agricultural Sciences, Sanya 572024, Hainan, China)

Abstract: 【Objective】As a crucial class of receptor-like protein kinases, genes in the *WAK/WAKL* family play a vital role in plant growth and development, disease resistance, and stress responses. The aim of this study was to identify the *MeWAK/WAKL* family in melon, analyze their expression patterns in resistant and susceptible materials under *Phytophthora capsici* infection, and explore the relationship between this gene family and melon's resistance to *Phytophthora* blight. 【Methods】The melon ZQK9 and E31 are high-resistant and high-susceptible resources to *P. capsici*, respectively, and they were identified through disease resistance screening in our laboratory. These materials were used to analyze gene

收稿日期: 2025-04-28

接受日期: 2025-05-19

基金项目: 中国农业科学院郑州果树研究所协同创新专项(ZGS202307); 国家自然科学基金项目(32172573); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-ZFRI-06-202501, CAAS-ASTIP-2025-ZFRI, 2060299-2-25); 河南省科技攻关项目(242102110289); 三亚中国农业科学院国家南繁研究院南繁专项(YBXM2419); 河南省西瓜甜瓜产业技术体系(HARS-22-10-S)

作者简介: 张林龙, 男, 硕士研究生, 研究方向为西瓜甜瓜遗传育种。Tel: 0371-65330930, E-mail: 1436890900@qq.com。#为共同第一作者。

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0371-65330930, E-mail: wangpingyong@caas.cn; E-mail: xuzhihong@caas.cn

expression patterns after inoculation with *P. capsici*. The pathogen was isolated from diseased melon plants collected in Sanya, Hainan, China. The melon genome data were referenced from Melon (DHL92) v4.0. Based on the conserved domain features, the melon *WAK/WAKL* family members were identified through genome-wide screening. Subsequent analyses including gene structure, protein physicochemical properties, chromosome distribution, subcellular localization prediction, promoter cis-acting elements, and phylogenetic relationships were conducted by a series of softwares and visualized using TBtools software. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was employed to investigate the expression patterns of family members in resistant (ZQK9) and susceptible (E31) samples at 2, 24 and 72 hours post-inoculation (hpi) with *P. capsici*, aiming to elucidate their correlation with disease resistance in melon. **【Results】** The *WAK/WAKL* family in melon comprised 20 genes, including 4 *WAK* genes and 16 *WAKL* genes, which were distributed across 9 melon chromosomes. Among them, 7 genes were clustered on chromosome 3, suggesting that these genes might function through coordinated expression. The results of subcellular localization prediction indicated that the *WAK/WAKL* family genes in melon were mainly localized in the extracellular or plasma membrane, consistent with reports in other crops. The phylogenetic tree divided 113 *WAK/WAKL* family genes from melon and model plants such as *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, and *Solanum lycopersicum* into 6 groups. The *MeWAK/WAKL* family genes in melon were mainly distributed in group I and VI. Group I was independently composed of 7 *MeWAKL* genes, indicating that the members of the *MeWAK/WAKL* family in melon might have undergone strong natural selection (such as extreme environments) during the evolutionary process, showing a phenomenon of rapid evolution. In addition, 6 of these 7 genes were clustered on chromosome 3. This clustering might lead to functional redundancy, but it could also reduce the negative impacts caused by structural variations such as chromosome breakage in individuals under strong external pressure, thus being retained in evolution. Domain analysis showed that the *WAK/WAKL* family genes in melon contained 1 to 7 exons. Among the 20 family genes, 17 genes contained the GUB-WAK bind (wall-associated receptor kinase galacturonan-binding) domain. Seven genes contained the GUB-WAK bind, EGF (epidermal growth factor), and serine-threonine kinase domains simultaneously. Seven genes only contained the GUB-WAK bind domain, and 2 genes contained both EGF domain and the kinase domain without GUB-WAK bind domain. Analysis of promoter cis-acting elements revealed that the promoters of the *WAK/WAKL* family genes in melon contained light-responsive elements (LTR), regulatory element related to meristem expression (MEE), response elements for various hormones (MeJA, SA, ABA, Auxin, and GA), as well as elements related to drought-inducibility and defense and stress responsiveness. This suggested that the *WAK/WAKL* family genes in melon might play important roles in disease resistance, stress tolerance, and growth and development of melon. Two genes, *MeWAKL4* and *MeWAKL16*, which were specifically up-regulated after inoculation in resistant melon ZQK9, were screened through qRT-PCR analysis. *MeWAKL4* was a transmembrane protein containing the GUB-WAK bind domain, WAK_assoc domain, and kinase domain, might play an important role in recognizing pathogen infection signals and transmitting them into the cell. The *MeWAKL16* protein had only one GUB-WAK bind domain, was localized on the plasma membrane, and had a transmembrane structure. Based on the resistance mechanism of the maize gray leaf spot resistance gene *ZmWAKL*, we speculated that *MeWAKL16* might play a role in recognizing pathogen infection signals and transmitting the signals into the cell by forming a complex with other kinase(s) on the plasma membrane. The detail regulatory mechanism required further experimental research. **【Conclusion】** In this study, 20 *MeWAK/WAKL* family genes in melon were identified. Through gene domain and promoter cis-acting element

analyses, it could be speculated that *MeWAKs/WAKLs* could respond to various hormone or stress signals and regulate the plant's disease resistance, stress tolerance, and growth and development processes. Two genes, *MeWAKL4* and *MeWAKL16*, were screened via qRT-PCR and showed specific up-regulation at 24 and 72 hpi in resistant melon ZQK9, while their expression levels exhibited no significant differences in susceptible E31. They might be involved in the signal pathway of melon's resistance to *Phytophthora* blight. This study laid a foundation for further research on the specific relationship between melon *MeWAK/WAKL* family genes and the resistance response to *Phytophthora* blight.

Key words: Melon; *WAK/WAKL* family; *Phytophthora* blight; Expression analysis

植物免疫反应包括病原相关分子模式诱导的免疫反应(Pattern-triggered immunity, PTI)和效应子诱导的免疫反应(Effector-triggered immunity, ETI)。PTI是植物与病原菌相互作用进化过程中形成的第一层次防御系统,即病原菌固有的某些保守的分子(如鞭毛蛋白、几丁质和脂多糖等)或病原菌分解植物细胞壁产生的果胶碎片和低聚半乳糖醛酸(Oligogalacturonides, OGs)等被植物模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRRs)识别,并激活植物免疫反应,从而限制病原菌的入侵和扩繁^[1]。PRRs是一类位于细胞膜上的受体激酶,可识别病原体入侵并在植物中传递危险信号。细胞壁相关受体激酶(Wall-associated kinase, WAK)以及与其具有类似结构WAK样激酶(Wall-associated kinase-like, WAKL)是一类重要的模式识别受体。WAK/WAKL参与细胞壁信号传感并将细胞外信号传递到细胞质,从而调节植物生长发育和胁迫反应,在植物中广泛分布。研究表明,WAK/WAKL可以作为OGs的受体,激活丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)磷酸化级联反应,从而将胁迫信号传递到细胞内,导致细胞内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的产生、胼胝体的沉积、钙离子信号的传递、激素的合成以及防御基因的激活,这一系列分子事件能够使植物细胞在很短的时间内对病原菌的入侵采取迅速而有效的抵御^[2-3]。玉米的*Zm-WAK-RLK1*基因赋予了植株对叶枯病的抗性^[4]。在水稻中,过表达*OsWAK1*基因可增强植株对稻瘟病菌的抗性,而另一个WAK类型基因*Xa4*使水稻对白叶枯病具有持久抗性^[5-6]。*TaWAK6*赋予小麦对叶锈病的抗性^[7]。棉花*GhWAKL*可增强植株对黄萎病的抗性^[8]。在柑橘中,过表达*CsWAKL08*可增强植株对细菌性溃疡病的抗性^[9]。过表达*BrWAK1*可以显著增强白菜对霜霉病菌的抗性^[10]。可见WAK/WAKL介

导的免疫反应在植物抵抗病原菌侵染的调控过程中发挥了重要作用。

疫病(*Phytophthora* blight)是甜瓜的主要病害之一,在世界各地的甜瓜产区均有发生,对中国甜瓜产业发展构成严重威胁^[11-13]。该病为土传性病害,病原菌寄主范围广,可以卵孢子或厚垣孢子的形式在植物病残株、土壤以及种子上越冬。其中,土壤中的病残株带菌率最高,是翌年的主要初侵染源。疫霉菌可侵染植株的根、茎、叶、花、果各个部位,整个生育期均可发病,在条件适宜的情况下可出现大面积流行,造成整个地块死秧,瓜农损失惨重^[14]。引起甜瓜疫病的病原菌有辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)、瓜类疫霉(*Phytophthora melonis*)、掘氏疫霉(*Phytophthora drechsleri*)和烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*),其中辣椒疫霉在世界各地的甜瓜产区均有报道^[15-17]。疫霉菌的致病性强,瓜类作物中高抗资源极其匮乏,导致抗疫病研究进展缓慢。WAK/WAKL作为重要的模式识别受体,在甜瓜中未见抗病相关报道,也尚未对其基因家族的特征和功能进行全面研究。因此,笔者在本研究中基于甜瓜基因组数据,鉴定了甜瓜WAK/WAKL家族基因,分析了蛋白理化性质、染色体定位、进化关系、基因结构、保守结构域、启动子顺式作用元件。同时,研究了甜瓜WAK/WAKL家族基因在抗病和感病材料中响应疫霉菌侵染的表达模式,旨在挖掘响应甜瓜疫病侵染的关键WAK/WAKL基因,为进一步明确该基因家族在甜瓜抗病反应过程中的作用和揭示甜瓜抗疫病机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

甜瓜材料ZQK9和E31是本实验室通过抗病性鉴定获得的高抗和高感疫病资源^[18]。挑选种粒成熟

饱满、大小均匀一致且完整无损伤的甜瓜种子,用55℃水浸种30 min后转入室温水浸种4 h,30℃催芽箱催芽16 h后播种到营养土中,营养土为草炭和蛭石按体积比3:1混合而成。待幼苗长到两叶一心时,采用灌根接种法接种疫霉菌。

疫霉菌是本实验室在海南三亚采集的甜瓜病株中分离获得的,通过菌丝和孢子囊形态学鉴定和核糖体基因内转录间隔区域(Internal transcribed spacer, ITS)序列测序鉴定,证明是辣椒疫霉菌(*P. capsici*)。

1.2 甜瓜 *WAK/WAKL* 家族基因鉴定和理化性质分析

甜瓜基因组数据采用 Melon (DHL92) v4 版本 (<http://cucurbitgenomics.org/v2/>)。分别在烟草基因组数据库 (https://solgenomics.net/organism/Nicotiana_benthamiana/genome/)、拟南芥基因组数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>) 和番茄基因组数据库 (https://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome/) 获得其 *WAK/WAKL* 家族基因的蛋白序列。利用 TBtools 软件中 Blast 功能对烟草、拟南芥、番茄基因家族的蛋白序列与甜瓜的全部蛋白质序列进行比对,对处理结果去除冗余,删除重复项。然后,通过 Pfam 在线软件 (<http://pfam.xfam.org/search/sequence>) 分析确认包含 GUB_WAK_bind (PF13947)、EGF (PF00008) 和 Pkinase (PF00069) 结构域。使用 ProtParam tool 在线软件 (<https://web.expasy.org/ProtParam/>) 分析甜瓜 *WAK/WAKL* 基因家族的氨基酸数、分子质量以及等电点 (pI) 等理化性质。

1.3 甜瓜 *WAK/WAKL* 家族基因定位和系统进化树分析

使用 TBtools 软件进行染色体定位分析,用 Molecular Bioinformatics Center (MBC, <https://cello.life.nctu.edu.tw/>) 进行甜瓜 *WAK/WAKL* 基因的亚细胞定位预测。利用在线软件 Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>) 和 TMHMM- 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行跨膜结构预测。使用 MEGA11.0 软件对甜瓜、烟草、拟南芥、番茄 *WAK/WAKL* 基因家族蛋白序列进行对比,采用邻接法 (Neighbour-joining, NJ) 构建系统进化树,Bootstrap 检验设定 1000 次重复,以评价系统进化树的统计可靠性,使用 iTOL 软件进一步美化进化树。

1.4 甜瓜 *WAK/WAKL* 家族基序与启动子顺式作用元件分析

使用 CDD 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 对保守结构域进行分析,使用 TBtools 软件进行基因结构分析。在 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 上预测顺式作用元件,使用 TBtools 软件对预测结果进行可视化。

1.5 甜瓜 *WAK/WAKL* 基因家族成员在疫霉菌侵染过程中的表达分析

为了解甜瓜 *WAK/WAKL* 家族基因在抗疫霉菌侵染中的作用,采用灌根接种法,利用浓度为 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的孢子悬浮液接种到甜瓜幼苗根部,分别在接菌后 0 h、24 h 和 72 h 采集植株根系,用锡箔纸包裹,经液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱备用。每个处理设置 3 次生物学重复。使用天根 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (DP441) 提取 RNA,使用天根 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成试剂盒 (KR118) 合成 cDNA 第一链。以甜瓜 *Actin* 基因 (ME-LO3C023264) 为内参基因,实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 测定各基因在接菌后不同时间点的相对表达量。利用 Primer Premier 5 软件设计引物 (表 1)。选用 Universal SYBR Green Master 荧光定量试剂盒 (Roche) 在 Light Cycler[®] 480II (Roche) 进行检测。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 甜瓜 *WAK/WAKL* 家族基因鉴定及其理化性质分析

基于烟草、拟南芥和番茄基因组中获得的 93 个 *WAK/WAKL* 家族蛋白序列,通过与甜瓜基因组进行 Blast 比对,鉴定到 20 个 *WAK/WAKL* 家族基因 (包括 4 个 *WAK* 基因和 16 个 *WAKL* 基因),按照其在染色体上的位置顺序分别命名为 *MeWAK1~MeWAK4* 和 *MeWAKL1~MeWAKL16* (表 1)。理化性质分析显示,鉴定到的 20 个 *WAK/WAKL* 蛋白氨基酸数量为 203~847,其中 *MeWAKL11* 分子质量最低,为 22 656.90 Da; *MeWAKL1* 分子质量最高,为 93 830.01 Da。蛋白等电点为 5.07 (*MeWAK2*)~8.68 (*MeWAKL12*),其中等电点小于 7 的蛋白占 80%,说明甜瓜 *WAK/WAKL* 蛋白大部分是酸性。亚细胞定位结果显示,甜瓜 *WAK/WAKL* 家族基因主要定位于细胞外基质或质膜, *MeWAK1* 可能在叶绿体中也有分布 (表 2)。

表 1 甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因实时荧光定量引物

Table 1 Real-time quantitative primers for *MeWAK/WAKL* genes

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') The sequence of primers (5'-3')	目标片段长度 Fragment length/bp
<i>MeActin</i>	<i>MeActin-F</i>	CCTGGTATCGCTGACCGTAT	133
	<i>MeActin-R</i>	TACTGAGCGATGCAAGGATG	
<i>MeWAK1</i>	<i>MeWAK1-F</i>	AAGTCCTGAATGAGGTCCGA	203
	<i>MeWAK1-R</i>	CGCTGTGCCTTCCGCTA	
<i>MeWAK2</i>	<i>MeWAK2-F</i>	CAATGTCTACCTGCTCAATCCT	270
	<i>MeWAK2-R</i>	CCGTATCGTATCCCGTAAAAC	
<i>MeWAK3</i>	<i>MeWAK3-F</i>	GACCTGTGGCGACAATCAA	155
	<i>MeWAK3-R</i>	AAATACTGCGGACGAAAA	
<i>MeWAK4</i>	<i>MeWAK4-F</i>	TATGGGGCTACCTTTGTTCTC	177
	<i>MeWAK4-R</i>	AAATGCTCAACTCGTCGGT	
<i>MeWAKL1</i>	<i>MeWAKL1-F</i>	AGCGGTGGGTGTTATGGG	266
	<i>MeWAKL1-R</i>	TGGGGAGGATGCCTTTGT	
<i>MeWAKL2</i>	<i>MeWAKL2-F</i>	GTGGTCGGCAAGGGTGGT	151
	<i>MeWAKL2-R</i>	TGCGATGGTTGATTGAGACAGA	
<i>MeWAKL3</i>	<i>MeWAKL3-F</i>	CGAGCGTCCTTGCGTATCT	282
	<i>MeWAKL3-R</i>	CCGCCTTCTTTCCCGTTAT	
<i>MeWAKL4</i>	<i>MeWAKL4-F</i>	TTTGCATTCTTCAGCCTCTACTC	217
	<i>MeWAKL4-R</i>	CACATCGCTCTTCTCCGTCA	
<i>MeWAKL5</i>	<i>MeWAKL5-F</i>	CCGTTCGGGATGAGGGA	196
	<i>MeWAKL5-R</i>	CGGTAGCAGTATCTGGAGGGTG	
<i>MeWAKL6</i>	<i>MeWAKL6-F</i>	TAATAATTTGTCCAACGCAGAGG	121
	<i>MeWAKL6-R</i>	AATTCGAGCTTTTATGCTATCCC	
<i>MeWAKL7</i>	<i>MeWAKL7-F</i>	TCCCAACCGCAACCGAT	136
	<i>MeWAKL7-R</i>	CACCCACTTACATAACCACTCCC	
<i>MeWAKL8</i>	<i>MeWAKL8-F</i>	AGGGCGAAAAGAGGAGGTAAA	162
	<i>MeWAKL8-R</i>	AAATGCCAAGCATCTGAACG	
<i>MeWAKL9</i>	<i>MeWAKL9-F</i>	TGTTGGTAAAGGTGGGTATGGT	154
	<i>MeWAKL9-R</i>	CACATTGCGATGATTGATTGA	
<i>MeWAKL10</i>	<i>MeWAKL10-F</i>	GCTAGTCTCGCCGCTCAATT	121
	<i>MeWAKL10-R</i>	GGTACAGCAAGGGTCAAGAACAC	
<i>MeWAKL11</i>	<i>MeWAKL11-F</i>	TTGCCTTTCAATGTTTCTACGC	216
	<i>MeWAKL11-R</i>	GCACCCTCCAATTCTGACTCTTA	
<i>MeWAKL12</i>	<i>MeWAKL12-F</i>	GGTTGCCCAAAATCCAA	251
	<i>MeWAKL12-R</i>	ACCAATCTCGTCGTGCAGTTA	
<i>MeWAKL13</i>	<i>MeWAKL13-F</i>	AGCGGAAGCGGTTATCAA	161
	<i>MeWAKL13-R</i>	CCGTGGGGACATAAGCAG	
<i>MeWAKL14</i>	<i>MeWAKL14-F</i>	CCGCTAAACGATTTCTCTTTC	256
	<i>MeWAKL14-R</i>	CGCTCCTCCAATACACGCT	
<i>MeWAKL15</i>	<i>MeWAKL15-F</i>	CAGTTCCACCACCAACATCCA	293
	<i>MeWAKL15-R</i>	ACGGCAACCGCCATTCC	
<i>MeWAKL16</i>	<i>MeWAKL16-F</i>	GCTCCTAAGCCAATGTTCTGC	212
	<i>MeWAKL16-R</i>	GCCCCAATGCTCTTCCAATA	

2.2 甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因定位分析

通过染色体定位分析,发现 20 个甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因分布在 9 条染色体上。在第

3 号染色体上分布了 9 条基因,其中 7 个基因成簇状分布;第 12 号染色体分布了 3 个基因;第 6 号染色体分布 2 个基因;在第 1、4、5、7、8、10 号染色体上各分布 1 个

表 2 甜瓜 *MeWAK/WAKL* 基因家族的理化性质

Table 2 Physicochemical properties of <i>MeWAK/WAKL</i> genes in melon										
家族 Family	基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	染色体上位置信息 Position on chromosome	基因长度 ORF/bp	氨基酸数目 Number of amino acid/aa	分子量 Molecular mass/Da	等电点 pI	外显子数 Exon number	亚细胞定位 Subcellular localization	是否含跨膜结构 Transmembrane domains (Yes/No)
WAK	<i>MeWAK1</i>	MELO3C029803	chr03: 2230405-2243014 (+)	3610	625	67912.63	6.38	4	细胞外基质、叶绿体 Extracellular, Chloroplast	有 Yes
	<i>MeWAK2</i>	MELO3C031621	chr06: 5633061-5634018 (+)	958	259	28676.84	5.07	2	细胞外基质 Extracellular	无 No
	<i>MeWAK3</i>	MELO3C012268	chr10: 1158495-1562774 (+)	4380	599	67641.61	6.01	3	质膜 Plasma membrane	有 Yes
	<i>MeWAK4</i>	MELO3C002105	chr12: 24856126-24858456 (+)	2331	645	72751.56	5.74	3	质膜 Plasma membrane	有 Yes
WAKL	<i>MeWAKL1</i>	MELO3C013239	chr01: 14549563-14569683 (-)	20121	847	93830.01	5.64	7	质膜 Plasma membrane	有 Yes
	<i>MeWAKL2</i>	MELO3C008436	chr03: 6173345-6176353 (-)	3009	739	83189.24	6.47	3	质膜 Plasma membrane	有 Yes
	<i>MeWAKL3</i>	MELO3C008440	chr03: 6266326-6269437 (+)	3112	693	77852.38	6.11	3	质膜 Plasma membrane	有 Yes
	<i>MeWAKL4</i>	MELO3C008442	chr03: 6307229-6310780 (-)	3552	751	83614.37	5.97	3	质膜 Plasma membrane	有 Yes
	<i>MeWAKL5</i>	MELO3C008445	chr03: 6463484-6466340 (-)	2857	764	83665.41	5.21	3	细胞外基质、质膜、细胞质 Extracellular, Plasma membrane, Cytoplasmic	有 Yes
	<i>MeWAKL6</i>	MELO3C008446	chr03: 6494473-6498693 (-)	4221	743	82920.94	5.37	3	质膜 Plasma membrane	有 Yes
	<i>MeWAKL7</i>	MELO3C008448	chr03: 6532805-6533650 (-)	846	281	30693.23	5.26	1	细胞外基质、质膜 Extracellular, Plasma membrane	有 Yes
	<i>MeWAKL8</i>	MELO3C010909	chr03: 27689851-27694185 (-)	4335	680	74757.26	7.77	2	质膜 Plasma membrane	有 Yes
	<i>MeWAKL9</i>	MELO3C027309	chr03: 6529827-6530985 (-)	1159	357	40277.43	7.50	2	细胞外基质 Extracellular	有 Yes
	<i>MeWAKL10</i>	MELO3C009414	chr04: 31119891-31121807 (+)	1917	638	71190.79	8.03	1	细胞外基质、质膜 Extracellular, Plasma membrane	有 Yes
	<i>MeWAKL11</i>	MELO3C004207	chr05: 25005690-25006301 (+)	612	203	22656.90	6.78	1	细胞外基质 Extracellular	无 No
	<i>MeWAKL12</i>	MELO3C013919	chr06: 32481079-32481723 (+)	645	214	24688.25	8.68	1	细胞外基质 Extracellular	无 No
	<i>MeWAKL13</i>	MELO3C017070	chr07: 126420-128819 (-)	2400	765	85151.77	6.54	2	质膜 Plasma membrane	有 Yes
	<i>MeWAKL14</i>	MELO3C007410	chr08: 2580021-2581969 (+)	1949	327	35712.69	5.22	3	质膜 Plasma membrane	有 Yes
	<i>MeWAKL15</i>	MELO3C002274	chr12: 23776013-23779544 (-)	3532	303	33309.12	6.15	3	细胞外基质 Extracellular	无 No
	<i>MeWAKL16</i>	MELO3C002430	chr12: 22683091-22684600 (-)	1510	308	34163.75	6.15	2	质膜 Plasma membrane	有 Yes

基因;第2、9、11号染色体上无该家族基因(图1)。

2.3 甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族成员多序列比对与系统进化树构建

为确定甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族成员之间的进化关系,根据其他模式植物中的同源基因进一步推

断其可能的功能。将烟草中的38个 *NbWAK/WAKL* 基因、拟南芥中的26个 *AtWAK/WAKL* 基因、番茄中的29个 *SlWAK/WAKL* 基因和甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因一起进行系统进化分析,发现113个基因可分为6个亚族(图2,表3)。亚族I由7个甜瓜 *Me-*

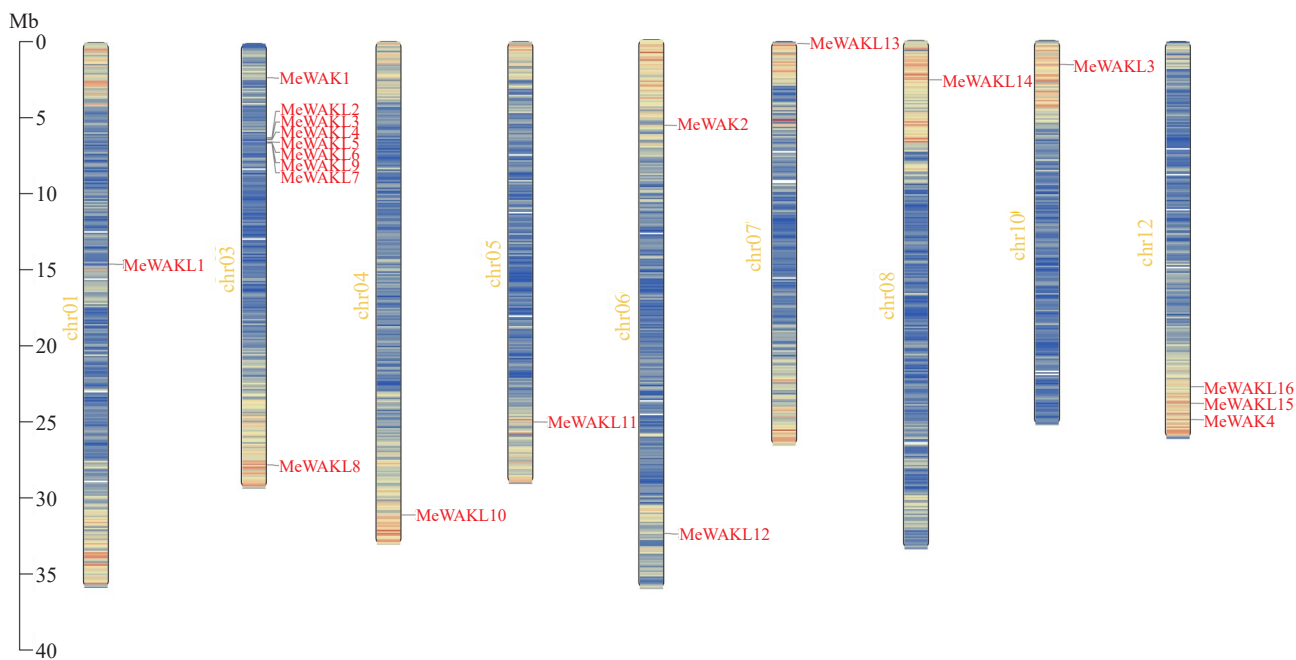


图1 甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因的染色体定位

Fig. 1 Chromosomal localization of *MeWAK/WAKL* genes

WAKL 构成;亚族II有17个基因,包含1个 *MeWAKL* 基因(*MeWAKL13*)、9个 *NbWAK/WAKL* 基因和7个 *SlWAK* 基因;亚族III最小,只有2个基因(*NbWAKL16* 和 *SlWAK8*);亚族IV包含5个 *AtWAK* 基因;亚族V有18个基因,包含2个 *NbWAK/WAKL* 基因(*NbWAK11* 和 *NbWAKL21*)、2个 *SlWAK* 基因(*SlWAK1* 和 *SlWAK2*)和14个 *AtWAK/WAKL* 基因;亚群VI最大,有64个基因,包含26个 *NbWAK/WAKL* 基因、19个 *SlWAK/WAKL* 基因、7个 *AtWAKL* 基因和12个 *MeWAK/WAKL* 基因。甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因主要分布在亚族I和VI中,烟草 *NbWAK/WAKL* 基因主要分布在亚族II和VI中,拟南芥 *AtWAK/WAKL* 基因主要分布在亚族IV、V和VI中,番茄 *SlWAK/WAKL* 基因主要分布在亚族II、VI中。

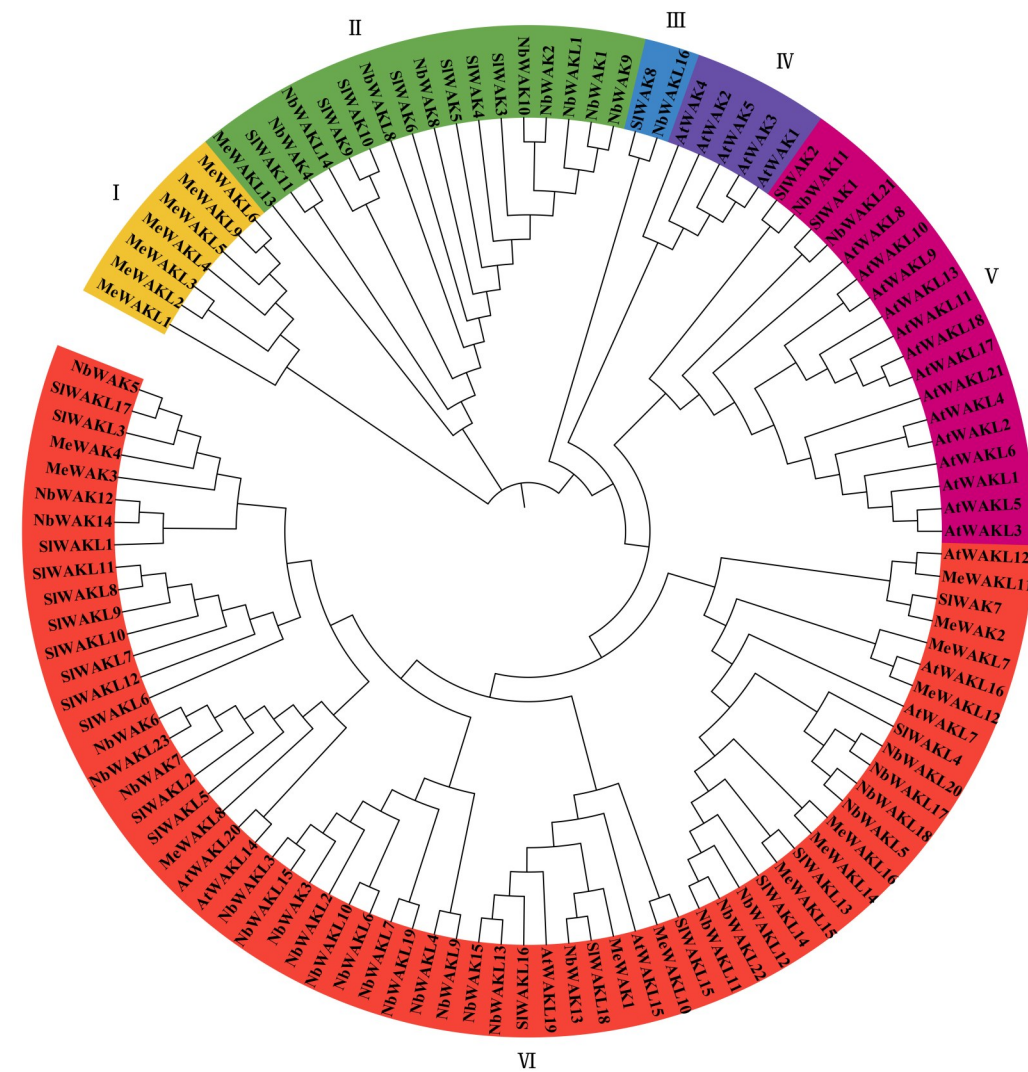
2.4 甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族成员基因结构和结构域分析

为获得更多关于甜瓜 *MeWAK/WAKL* 基因结构多样性信息,对家族基因的外显子-内含子组成以及基因保守结构域进行分析。甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家

族基因含有1~7个外显子(图3)。*MeWAKL1* 含有7个外显子,而 *MeWAKL7*、*MeWAKL11* 和 *MeWAKL12* 只有1个外显子。结构域分析结果显示,20个家族基因中有17个都含有 GUB-WAK-bind(wall-associated receptor kinase galacturonan-binding)结构域,有7个基因同时包含 GUB-WAK-bind(wall-associated receptor kinase galacturonan-binding)结构域、EGF(epidermal growth factor)和丝氨酸苏氨酸激酶结构域,有7个基因只含有 GUB-WAK-bind 结构域,有2个基因只含有 EGF 结构域和激酶结构域(图4)。

2.5 甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族成员启动子顺式作用元件分析

为探索甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因的潜在功能和调控模式,使用 PlantCARE 数据库分析了基因2000 bp 启动子序列中的顺式作用元件(图5)。结果显示,与光反应相关的元件(LRE)最多,表明甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因可能在光合作用或与光照胁迫相关反应中发挥重要作用。同时,茉莉酸(*Me-JARE*)、水杨酸(*SARE*)、生长素(*AuxRE*)、脱落酸



Nb. 本氏烟草; At. 拟南芥; Sl. 番茄。

Nb. *Nicotiana benthamiana*; At. *Arabidopsis thaliana*; Sl. 番茄 *Solanum lycopersicum*。

图2 甜瓜与本氏烟草、拟南芥、番茄 *WAK/WAKL* 基因家族成员的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of *WAK/WAKL* gene family members in melon, *N. benthamiana*, *A. thaliana* and *S. lycopersicum*

(ABRE)、赤霉素(GARE)响应元件也分布较多,表明甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因与多个激素信号紧密相关。在多个基因启动子中分布有干旱诱导响应元件(DRE)、抗性和胁迫响应元件(DSRE)、分生组织表达响应元件(MEE),这表明甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因在甜瓜抗病、抗逆及生长发育方面发挥重要作用。

2.6 甜瓜 *MeWAK/WAKL* 基因家族成员在疫霉菌侵染过程中的表达分析

为探究甜瓜 *MeWAK/WAKL* 基因家族对疫霉菌侵染的响应机制,利用 RT-qPCR 分析了抗病材料 ZQK9 和感病材料 E31 在接种疫霉菌后 0 h、24 h 和 72 h 的表达模式,有 14 个基因检测到表达量(图 6)。*MeWAKL4*、*MeWAKL16* 在抗病材料接种后 24 h

上调表达,在 72 h 表达量有所下降,在感病材料接菌后表达量没有明显变化;*MeWAK3* 和 *MeWAKL6* 在抗病材料中表达模式相似,都是在接菌后 24 h 上调表达,在 72 h 表达量有所下降;*MeWAKL3*、*MeWAKL10*、*MeWAKL11*、*MeWAKL14* 和 *MeWAKL15* 在抗病材料接菌后下调表达;*MeWAKL12* 在抗病材料接菌后表达量没有明显变化,在感病材料接菌后 24 h 表达量下降,在 72 h 表达量上升;*MeWAKL5* 基因在抗病材料接菌后 24 h 显著上调表达,之后表达量下降,但在感病材料中持续上调表达;*MeWAK4* 在抗病材料接菌后 24 h 无明显变化,但接菌后 72 h 在抗病材料中表达量降低,在感病材料中表达量上升;*MeWAKL8* 在抗病材料接菌后 24 h 无明显变化,接菌后

表 3 本氏烟草、拟南芥、番茄 *WAK/WAKL* 家族基因名称

Table 3 The gene name of *WAK/WAKL* family in *N. benthamiana*, *A. thaliana* and *S. lycopersicum*

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID
<i>NbWAK1</i>	Niben101Scf00149g10001	<i>NbWAKL17</i>	Niben101Scf07969g00010	<i>AtWAKL21</i>	AT5G66790
<i>NbWAK2</i>	Niben101Scf00149g10003	<i>NbWAKL18</i>	Niben101Scf11389g01034	<i>AtWAKL22</i>	AT1G79670
<i>NbWAK3</i>	Niben101Scf00530g11020	<i>NbWAKL19</i>	Niben101Scf11416g00017	<i>SIWAK1</i>	Solyc02g068660
<i>NbWAK4</i>	Niben101Scf01237g11009	<i>NbWAKL20</i>	Niben101Scf14950g00001	<i>SIWAK2</i>	Solyc07g007020
<i>NbWAK5</i>	Niben101Scf02160g02006	<i>NbWAKL21</i>	Niben101Scf20037g00022	<i>SIWAK3</i>	Solyc09g014710
<i>NbWAK6</i>	Niben101Scf02608g01007	<i>NbWAKL22</i>	Niben101Scf21589g00004	<i>SIWAK4</i>	Solyc09g014720
<i>NbWAK7</i>	Niben101Scf02608g01008	<i>NbWAKL23</i>	Niben101Ctg15342g00002	<i>SIWAK5</i>	Solyc09g014730
<i>NbWAK8</i>	Niben101Scf03202g03004	<i>AtWAK1</i>	AT1G21250	<i>SIWAK6</i>	Solyc09g014740
<i>NbWAK9</i>	Niben101Scf03202g04015	<i>AtWAK2</i>	AT1G21270	<i>SIWAK7</i>	Solyc09g015230
<i>NbWAK10</i>	Niben101Scf03202g04017	<i>AtWAK3</i>	AT1G21240	<i>SIWAK8</i>	Solyc09g015240
<i>NbWAK11</i>	Niben101Scf03472g00005	<i>AtWAK4</i>	AT1G21210	<i>SIWAK9</i>	Solyc10g076530
<i>NbWAK12</i>	Niben101Scf06394g08019	<i>AtWAK5</i>	AT1G21230	<i>SIWAK10</i>	Solyc10g076550
<i>NbWAK13</i>	Niben101Scf10330g02004	<i>AtWAKL1</i>	AT1G16120	<i>SIWAK11</i>	Solyc11g072140
<i>NbWAK14</i>	Niben101Scf13018g00012	<i>AtWAKL2</i>	AT1G16130	<i>SIWAKL1</i>	Solyc02g086270
<i>NbWAK15</i>	Niben101Scf21196g00008	<i>AtWAKL3</i>	AT1G16140	<i>SIWAKL2</i>	Solyc02g090110
<i>NbWAKL1</i>	Niben101Scf00149g10020	<i>AtWAKL4</i>	AT1G16150	<i>SIWAKL3</i>	Solyc03g119240
<i>NbWAKL2</i>	Niben101Scf00327g01037	<i>AtWAKL5</i>	AT1G16160	<i>SIWAKL4</i>	Solyc04g007390
<i>NbWAKL3</i>	Niben101Scf00530g11014	<i>AtWAKL6</i>	AT1G16110	<i>SIWAKL5</i>	Solyc04g079710
<i>NbWAKL4</i>	Niben101Scf00700g06021	<i>AtWAKL7</i>	AT1G16090	<i>SIWAKL6</i>	Solyc05g008930
<i>NbWAKL5</i>	Niben101Scf01521g06001	<i>AtWAKL8</i>	AT1G16260	<i>SIWAKL7</i>	Solyc05g008940
<i>NbWAKL6</i>	Niben101Scf02290g02006	<i>AtWAKL9</i>	AT1G69730	<i>SIWAKL8</i>	Solyc05g008950
<i>NbWAKL7</i>	Niben101Scf02381g08016	<i>AtWAKL10</i>	AT1G79680	<i>SIWAKL9</i>	Solyc05g008960
<i>NbWAKL8</i>	Niben101Scf03202g03002	<i>AtWAKL11</i>	AT1G19390	<i>SIWAKL10</i>	Solyc05g008970
<i>NbWAKL9</i>	Niben101Scf03304g01026	<i>AtWAKL12</i>	AT1G22720	<i>SIWAKL11</i>	Solyc05g008980
<i>NbWAKL10</i>	Niben101Scf03363g01019	<i>AtWAKL13</i>	AT1G17910	<i>SIWAKL12</i>	Solyc05g008990
<i>NbWAKL11</i>	Niben101Scf03445g00009	<i>AtWAKL14</i>	AT2G23450	<i>SIWAKL13</i>	Solyc05g009010
<i>NbWAKL12</i>	Niben101Scf03939g06023	<i>AtWAKL15</i>	AT3G53840	<i>SIWAKL14</i>	Solyc05g010530
<i>NbWAKL13</i>	Niben101Scf04445g01002	<i>AtWAKL16</i>	AT3G25490	<i>SIWAKL15</i>	Solyc09g008640
<i>NbWAKL14</i>	Niben101Scf05368g07009	<i>AtWAKL17</i>	AT4G31100	<i>SIWAKL16</i>	Solyc09g011200
<i>NbWAKL15</i>	Niben101Scf06394g08020	<i>AtWAKL18</i>	AT4G31110	<i>SIWAKL17</i>	Solyc12g036330
<i>NbWAKL16</i>	Niben101Scf06909g04005	<i>AtWAKL20</i>	AT5G02070.1	<i>SIWAKL18</i>	Solyc12g088040

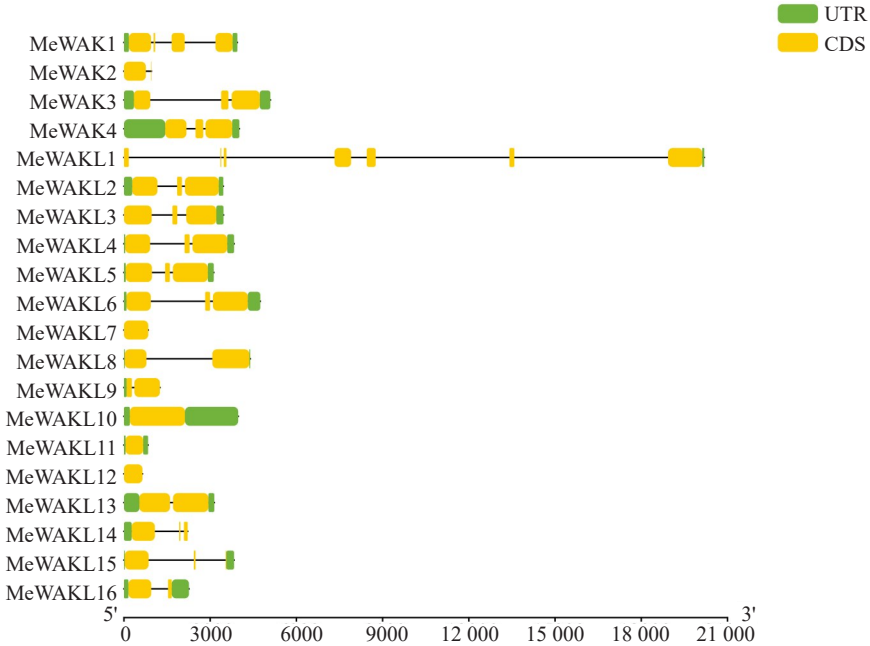


图 3 甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族成员基因和外显子-内含子结构

Fig. 3 The exon-intron structures of *MeWAK/WAKL* family members

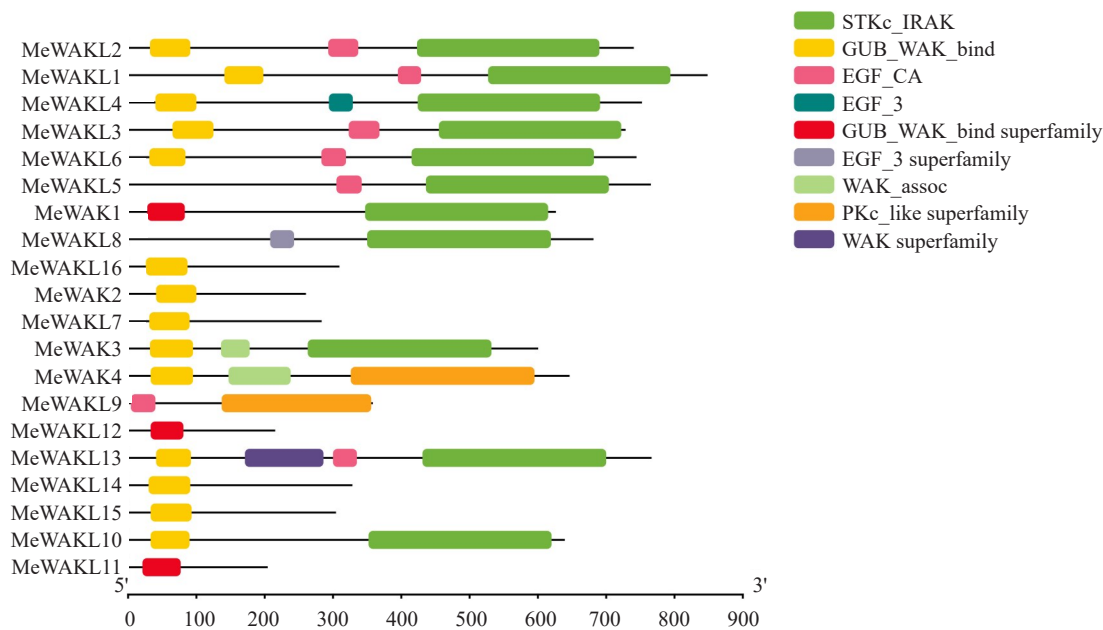
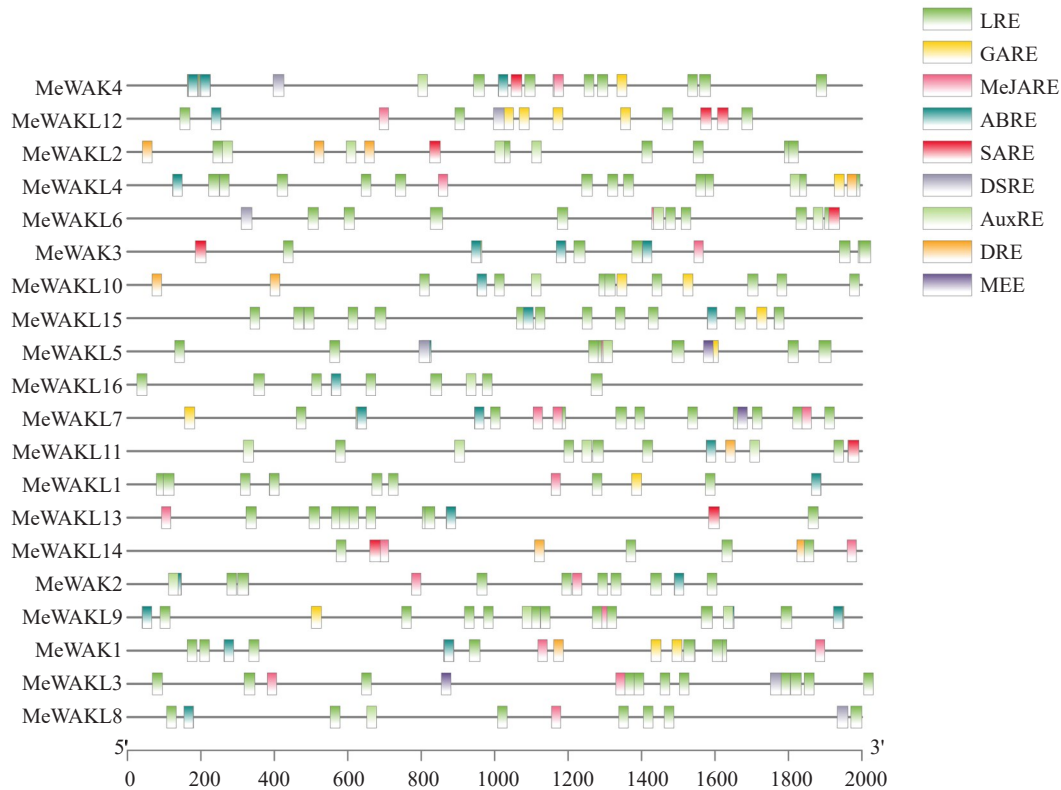


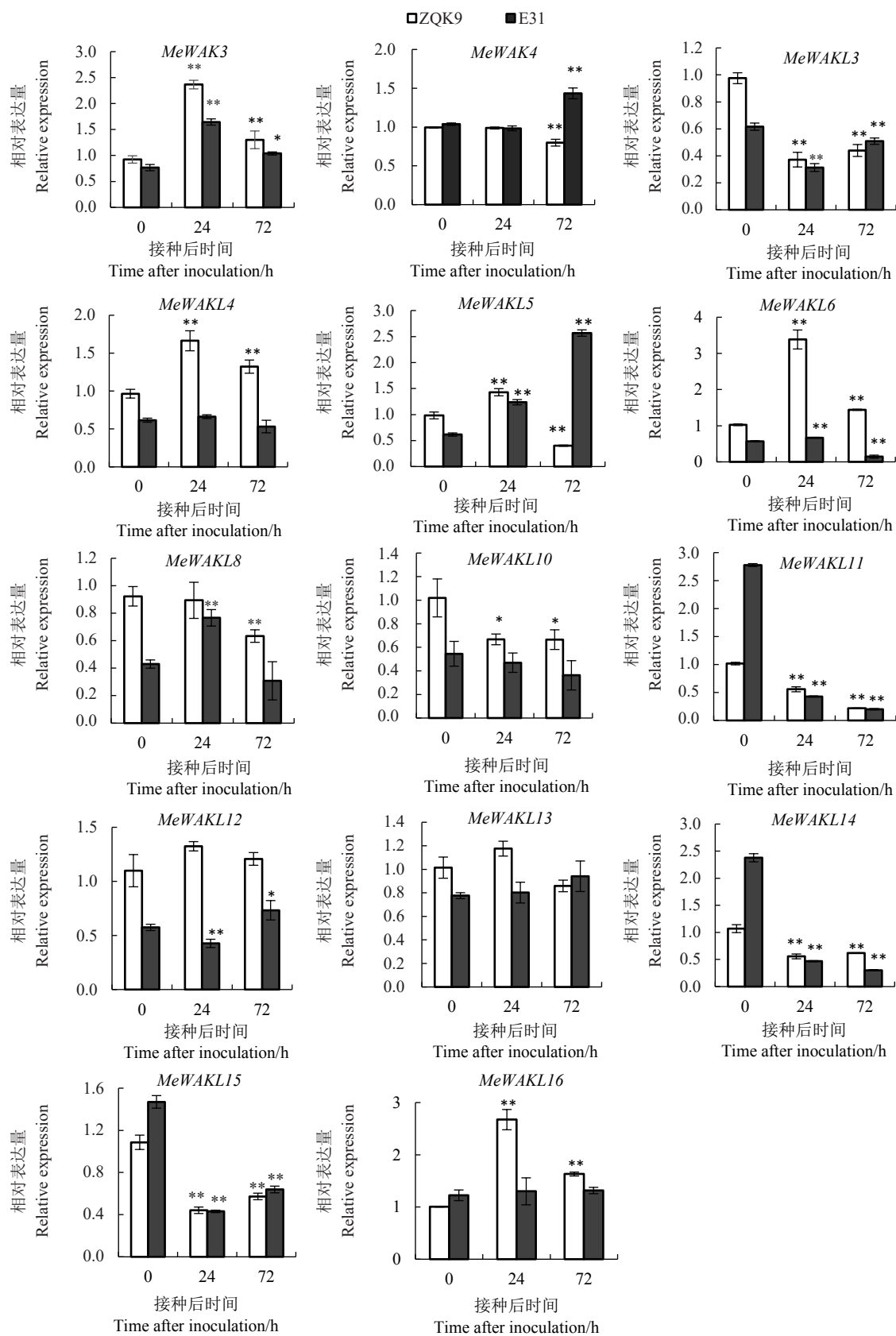
图 4 甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族成员保守结构域
Fig. 4 The conserved motifs of *MeWAK/WAKL* family members



LRE. 光响应元件; GARE. 赤霉素响应元件; MeJARE. 茉莉酸响应元件; ABRE. 脱落酸响应元件; SARE. 水杨酸响应元件; DSRE. 抗性和胁迫响应元件; AuxRE. 生长素响应元件; DRE. 干旱响应元件; MEE. 分生组织表达响应元件。

LRE. Light response elements; GARE. *Cis*-acting element involved in Gibberellin response elements; MeJARE. MeJA response elements; ABRE. Absciscic acid response elements; SARE. Salicylic acid response elements; DSRE. Defense and stress responses elements; AuxRE. Auxin response elements; DRE. Droughtstress responses elements; MEE. Meristem expression elements.

图 5 甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族成员启动子顺式作用元件
Fig. 5 *Cis*-elements of *MeWAK/WAKL* gene family promoters



*表示在 $P < 0.05$ 差异显著,**表示在 $P < 0.01$ 差异极显著。下同。

* indicate significant difference at $P < 0.05$, ** indicate significant difference at $P < 0.01$. The same below.

图6 甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族在接种疫霉菌后的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of the *MeWAK/WAKL* gene family after *P. capsici* infection

72 h 表达量下降,在感病材料接菌后 24 h 表达量显著上升,接菌后 72 h 表达量下降;*MeWAKL13* 在抗病材料接菌后表达量没有明显变化。结合上述表达模式分析,*MeWAKL4* 和 *MeWAKL16* 在抗病材料接菌后特异性上调表达,而在感病材料接菌后表达量无显著差异,可能参与甜瓜对疫霉菌的抗性反应。

3 讨 论

WAK/WAKL 基因家族作为一类重要的类受体蛋白激酶,在植物生长发育、抗病、抗逆过程中起着至关重要的作用^[19-21]。基于典型的 GUB-WAK-bind 结构域、WAK_assoc 结构域和 EGF 结构域,在甜瓜基因组中共鉴定出 20 个 *WAK/WAKL* 家族基因,包括 4 个 *MeWAK* 基因和 16 个 *MeWAKL* 基因。*WAK/WAKL* 家族基因的鉴定、进化、结构和功能在多种作物和植物中均有研究报道,如玫瑰^[22](*Rosa chinensis*)有 12 个、拟南芥^[23](*Arabidopsis thaliana*)有 26 个、棉花^[24](*Gossypium hirsutum*)有 29 个、马铃薯^[25](*Solanum tuberosum*)有 29 个、本氏烟草^[26](*Nicotiana benthamiana*)有 38 个、番茄^[27](*Solanum lycopersicum*)有 39 个、谷子^[28](*Setaria italica*)有 41 个、苹果^[29](*Malus domestica*)有 44 个、大麻^[30](*Cannabis sativa*)有 53 个、白菜^[31](*Brassica rapa ssp. pekinensis*)有 96 个、杨树^[32](*Populus trichocarpa*)有 175 个、大麦^[33](*Hordeum vulgare* L.)有 320 个该家族基因。然而,甜瓜中 *MeWAK/WAKL* 基因家族的结构特征、潜在的生物学功能和调控机制尚不清楚。对甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因进行鉴定,利用前期筛选获得的高抗和高感疫病甜瓜种质资源,对该家族基因在疫霉菌侵染下的表达进行了全面分析^[18],为进一步挖掘甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因在抗病中的功能奠定基础。

WAK/WAKL 基因家族作为植物类受体蛋白激酶的重要成员,其结构域在抗病过程中通过多种机制协同发挥作用。GUB-WAK-bind 结构域和 EGF 结构域是 *WAK/WAKL* 蛋白的典型特征,根据胞外域的不同,各 *WAK* 蛋白可通过连接不同种类的配基促使植物对各种胞外信号产生相应的响应^[34]。研究表明,*WAK/WAKL* 蛋白可通过位于细胞外的结构域识别细胞壁中的 OGs、果胶和果胶片段成分,从而感知细胞壁结构变化的信号。通过对甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因进行亚细胞定位和跨膜结构预测,发现除 *MeWAK1* 可能定位于叶绿体和 *Me-*

WAKL5 可能在细胞质中分布外,其他基因都位于质膜或细胞外基质,说明甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因可能通过传递胞外信号,从而触发生长发育调控或在抗病抗逆反应中发挥重要作用。通过与模式植物拟南芥、本氏烟草和番茄中的 *WAK/WAKL* 家族基因进行系统进化树分析,发现甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族主要在亚族 I 和 VI 中,其中亚族 I 是由 7 个 *MeWAKL* 基因(*MeWAKL1*、*MeWAKL2*、*MeWAKL3*、*MeWAKL4*、*MeWAKL5*、*MeWAKL6* 和 *MeWAKL9*)独立构成,说明甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族成员在进化过程中,可能受到强烈的自然选择(如极端环境等),存在快速进化的现象^[29,35-36]。此外,染色体定位分析显示,在这 7 个基因中有 6 个(*MeWAKL2*、*MeWAKL3*、*MeWAKL4*、*MeWAKL5*、*MeWAKL6* 和 *MeWAKL9*)成簇分布在 3 号染色体,推测这些基因可能通过协同表达发挥作用。该现象可能导致功能冗余,但也可降低个体在强烈的外界压力下因染色体断裂等结构变异造成的负面影响,从而在进化中被保留^[37-38]。

启动子顺式作用元件分析表明,在甜瓜 *MeWAK/WAKL* 家族基因启动子中存在很多响应不同激素和胁迫的元件。如茉莉酸(MeJA)、水杨酸(SA)、脱落酸(ABA)、生长素(Auxin)和赤霉素(GA)等激素响应元件,它们同样存在于棉花、核桃、烟草、马铃薯等作物的 *WAK/WAKL* 家族基因启动子中,在调控玉米黑穗病抗性中也发挥重要作用^[39]。表达模式分析表明,*MeWAKL4* 和 *MeWAKL16* 都是在抗病材料接种疫霉菌后 24 h 和 72 h 特异性上调表达,而在感病材料接菌后表达量无显著差异。通过生物信息学分析发现,*MeWAKL4* 是一个跨膜蛋白,包含 GUB-WAK-bind 结构域、WAK_assoc 结构域和激酶结构域,可能在识别病原菌侵染信号并将信号传递到胞内过程中发挥重要作用。*MeWAKL16* 蛋白只有一个 GUB-WAK-bind 结构域,该蛋白定位于质膜,具有跨膜结构。系统进化树分析显示,*MeWAKL16* 位于第 VI 亚族,该亚族中多个成员与抗病相关,其中 *NbWAKL12* (*Niben101Scf03939g06023*)在烟草响应 TYLCV 侵染中发挥重要作用,该基因沉默后会导致植株中病毒含量增加^[26]。番茄 *SlWAKL2* (*Solyc02g090110*)和拟南芥 *AtWAKL14* (*AT2G23450*)的细胞外结构域能够结合多种形式的果胶,包括果胶寡半乳糖醛酸片段,在植株抵抗病原菌侵染时可能具有积极作

用^[40]。因此, *MeWAKL16* 可能在识别病原菌侵染信号中发挥作用, 并通过与位于质膜上的其他激酶形成复合体, 将信号传到细胞内。这种作用机制在玉米灰斑病抗性通路中已有报道^[41], 具体调控机制还需进一步试验验证。

4 结 论

笔者共鉴定了 20 个 *MeWAK/WAKL* 家族基因, 不均匀分布于 9 条染色体上, 其中有 7 个家族成员成簇分布在 3 号染色体上; 启动子顺式作用元件分析发现存在很多激素响应元件和胁迫响应元件。在疫霉菌侵染的胁迫过程中, *MeWAKL4* 和 *MeWAKL16* 在抗病材料接种疫霉菌后特异性上调表达, 可能参与甜瓜抗病信号途径。

参考文献 References:

- [1] 严霞, 牛晓磊, 陶均. 病原菌诱发的植物先天免疫研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(3): 821-831.
YAN Xia, NIU Xiaolei, TAO Jun. Research advances on pathogen-induced plant innate immunity[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(3): 821-831.
- [2] CHINCHILLA D, BOLLER T. Innate immunity: Pattern recognition in plants[M]. MARTIN F, KAMOUN S. Effectors in plant-microbe interactions. Heidelberg: Springer, 2011: 1-32.
- [3] 张蕊, 李来庚. 植物细胞壁信号研究进展[J]. 植物生理学报, 2018, 54(8): 1254-1262.
ZHANG Rui, LI Laigeng. Research progress of the plant cell wall signaling[J]. Plant Physiology Journal, 2018, 54(8): 1254-1262.
- [4] HURNI S, SCHEUERMANN D, KRATTINGER S G, KESSEL B, WICKER T, HERREN G, FITZE M N, BREEN J, PRESTERL T, OUZUNOVA M, KELLER B. The maize disease resistance gene *Htn1* against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(28): 8780-8785.
- [5] HU K M, CAO J B, ZHANG J, XIA F, KE Y G, ZHANG H T, XIE W Y, LIU H B, CUI Y, CAO Y L, SUN X L, XIAO J H, LI X H, ZHANG Q L, WANG S P. Improvement of multiple agronomic traits by a disease resistance gene *via* cell wall reinforcement[J]. Nature Plants, 2017, 3: 17009.
- [6] LI H, ZHOU S Y, ZHAO W S, SU S C, PENG Y L. A novel wall-associated receptor-like protein kinase gene, *OsWAK1*, plays important roles in rice blast disease resistance[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69(3): 337-346.
- [7] SAINTENAC C, LEE W S, CAMBON F, RUDD J J, KING R C, MARANDE W, POWERS S J, BERGÈS H, PHILLIPS A L, UAUY C, HAMMOND-KOSACK K E, LANGIN T, KANYUKA K. Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*[J]. Nature Genetics, 2018, 50(3): 368-374.
- [8] FENG H J, LI C, ZHOU J L, YUAN Y, FENG Z L, SHI Y Q, ZHAO L H, ZHANG Y L, WEI F, ZHU H Q. A cotton WAKL protein interacted with a DnaJ protein and was involved in defense against *Verticillium dahliae*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 167: 633-643.
- [9] LI Q, HU A H, QI J J, DOU W F, QIN X J, ZOU X P, XU L Z, CHEN S C, HE Y R. CsWAKL08, a pathogen-induced wall-associated receptor-like kinase in sweet orange, confers resistance to citrus bacterial canker *via* ROS control and JA signaling[J]. Horticulture Research, 2020, 7: 42.
- [10] ZHANG B, SU T B, XIN X Y, LI P R, WANG J, WANG W H, YU Y J, ZHAO X Y, ZHANG D S, LI D Y, ZHANG F L, YU S C. Wall-associated kinase BrWAK1 confers resistance to downy mildew in *Brassica rapa*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21(10): 2125-2139.
- [11] LAMOUR K H, STAM R, JUPE J, HUITEMA E. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(4): 329-337.
- [12] 谢大森, 赵芹, 何晓明, 彭庆务. 瓜类疫病研究进展[J]. 热带作物学报, 2010, 31(3): 503-507.
XIE Dasen, ZHAO Qin, HE Xiaoming, PENG Qingwu. Research progress on *Phytophthora* blight wilt attacking cucurbits and its control strategy[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2010, 31(3): 503-507.
- [13] 赵廷昌, 宋凤鸣, 古勤生, 张友军. 我国西瓜甜瓜病虫害防控现状、存在问题与发展趋势[J]. 中国瓜菜, 2014, 27(6): 1-5.
ZHAO Tingchang, SONG Fengming, GU Qinsheng, ZHANG Youjun. Status, challenges and trend of watermelon and melon disease and insect control in China[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2014, 27(6): 1-5.
- [14] 谢大森, 何晓明, 彭庆务. 瓜类疫病病原物研究进展[J]. 农业科技通讯, 2009(3): 73-75.
XIE Dasen, HE Xiaoming, PENG Qingwu. Research advances in pathogens of cucurbit *Phytophthora* blight[J]. Bulletin of Agricultural Science and Technology, 2009(3): 73-75.
- [15] PADLEY L D, KABELKA E A, ROBERTS P D. Inheritance of resistance to crown rot caused by *Phytophthora capsici* in *Cucurbita*[J]. HortScience, 2009, 44(1): 211-213.
- [16] KIM M J, SHIM C K, KIM Y K, JEE H J, HONG S J, PARK J H, LEE M H, HAN E J. Screening of resistance melon germplasm to *Phytophthora* rot caused by *Phytophthora capsici*[J]. Korean Journal of Crop Science, 2012, 57(4): 389-396.
- [17] DONAHOO R S, TURECHEK W W, THIES J A, KOUSIK C S. Potential sources of resistance in U. S. *Cucumis melo* PIs to crown rot caused by *Phytophthora capsici*[J]. HortScience, 2013, 48(2): 164-170.
- [18] 王平勇, 赵光伟, 孔维虎, 贺玉花, 欧点点, 张健, 徐永阳, 徐志红, 刘璐璐. 甜瓜种质资源对疫病的抗性鉴定研究[J]. 中国农学通报, 2018, 34(20): 144-150.
WANG Pingyong, ZHAO Guangwei, KONG Weihua, HE Yuhua, OU Diandian, ZHANG Jian, XU Yongyang, XU Zhihong, LIU

- Lulu. Resistance identification of melon germplasms to *Phytophthora* rot[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2018, 34(20):144-150.
- [19] KOHORN B D. Cell wall-associated kinases and pectin perception[J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(2):489-494.
- [20] AMSBURY S. Sensing attack: The role of wall-associated kinases in plant pathogen responses[J]. Plant Physiology, 2020, 183(4):1420-1421.
- [21] STEPHENS C, HAMMOND-KOSACK K E, KANYUKA K. WAKsing plant immunity, waning diseases[J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(1):22-37.
- [22] LIU X T, WANG Z C, TIAN Y, ZHANG S Y, LI D D, DONG W Q, ZHANG C Q, ZHANG Z. Characterization of wall-associated kinase/wall-associated kinase-like (WAK/WAKL) family in rose (*Rosa chinensis*) reveals the role of RcWAK4 in *Botrytis* resistance[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1):526.
- [23] VERICA J A, HE Z H. The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family[J]. Plant Physiology, 2002, 129(2):455-459.
- [24] DOU L L, LI Z F, SHEN Q, SHI H R, LI H Z, WANG W B, ZOU C S, SHANG H H, LI H B, XIAO G H. Genome-wide characterization of the WAK gene family and expression analysis under plant hormone treatment in cotton[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1):85.
- [25] YU H F, ZHANG W N, KANG Y C, FAN Y L, YANG X Y, SHI M F, ZHANG R Y, WANG Y, QIN S H. Genome-wide identification and expression analysis of wall-associated kinase (WAK) gene family in potato (*Solanum tuberosum* L.)[J]. Plant Biotechnology Reports, 2022, 16(3):317-331.
- [26] ZHONG X T, LI J P, YANG L L, WU X Y, XU H, HU T, WANG Y J, WANG Y Q, WANG Z Q. Genome-wide identification and expression analysis of wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family in response to tomato yellow leaf curl virus infection in *Nicotiana benthamiana*[J]. BMC Plant Biology, 2023, 23(1):146.
- [27] SUN Z Y, SONG Y P, CHEN D, ZANG Y D, ZHANG Q L, YI Y T, QU G Q. Genome-wide identification, classification, characterization, and expression analysis of the wall-associated kinase family during fruit development and under wound stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)[J]. Genes, 2020, 11(10):1186.
- [28] 王雪, 孙玉荣, 张诺, 李忠祥, 任志贤, 张宝俊. 谷子 WAK 基因家族全基因组鉴定及表达分析[J]. 山西农业科学, 2023, 51(10):1153-1161.
- WANG Xue, SUN Yurong, ZHANG Nuo, LI Zhongxiang, REN Zhixian, ZHANG Baojun. Whole genome identification and expression analysis of WAK gene family in foxtail millet[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2023, 51(10):1153-1161.
- [29] ZUO C W, LIU Y L, GUO Z G, MAO J, CHU M Y, CHEN B H. Genome-wide annotation and expression responses to biotic stresses of the wall-associated kinase-receptor-like kinase (WAK-RLK) gene family in apple (*Malus domestica*) [J]. European Journal of Plant Pathology, 2019, 153(3):771-785.
- [30] SIPAHI H, WHYTE T D, MA G, BERKOWITZ G. Genome-wide identification and expression analysis of wall-associated kinase (WAK) gene family in *Cannabis sativa* L.[J]. Plants, 2022, 11(20):2703.
- [31] ZHANG B, LI P, SU T B, LI P R, XIN X Y, WANG W H, ZHAO X Y, YU Y J, ZHANG D S, YU S C, ZHANG F L. Comprehensive analysis of wall-associated kinase genes and their expression under abiotic and biotic stress in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2020, 39(1):72-86.
- [32] TOCQUARD K, LAFON-PLACETTE C, AUGUIN D, MURIES B, BRONNER G, LOPEZ D, FUMANAL B, FRANCHEL J, BOURGERIE S, MAURY S, LABEL P, JULIEN J L, ROECKEL-DREVET P, VENISSE J S. In silico study of wall-associated kinase family reveals large-scale genomic expansion potentially connected with functional diversification in *Populus* [J]. Tree Genetics & Genomes, 2014, 10(5):1135-1147.
- [33] TRIPATHI R K, AGUIRRE J A, SINGH J. Genome-wide analysis of wall associated kinase (WAK) gene family in barley[J]. Genomics, 2021, 113(1):523-530.
- [34] 王宏蕾. *GbWAK3* 在棉花抗黄萎病中的功能研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2017.
- WANG Honglei. Functional analysis of *GbWAK3* in cotton responsive to *Verticillium dahliae* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.
- [35] LAGERCRANTZ U, AXELSSON T. Rapid evolution of the family of *CONSTANS* LIKE genes in Plants[J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(10):1499-1507.
- [36] ALBA R, KELMENSEN P M, CORDONNIER-PRATT M M, PRATT L H. The phytochrome gene family in tomato and the rapid differential evolution of this family in angiosperms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(3):362-373.
- [37] POLTURAK G, OSBOURN A. The emerging role of biosynthetic gene clusters in plant defense and plant interactions[J]. PLoS Pathogens, 2021, 17(7):e1009698.
- [38] 刘祖洞, 乔守怡, 吴燕华, 赵寿元. 遗传学[M]. 3版. 北京:高等教育出版社, 2013.
- LIU Zudong, QIAO Shouyi, WU Yanhua, ZHAO Shouyuan. Genetics[M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2013.
- [39] ZUO W L, CHAO Q, ZHANG N, YE J R, TAN G Q, LI B L, XING Y X, ZHANG B Q, LIU H J, FENGLER K A, ZHAO J, ZHAO X R, CHEN Y S, LAI J S, YAN J B, XU M L. A maize wall-associated kinase confers quantitative resistance to head smut[J]. Nature Genetics, 2015, 47(2):151-157.
- [40] MA Y X, WANG Z H, HUMPHRIES J, RATCLIFFE J, BACIC A, JOHNSON K L, QU G Q. WALL-ASSOCIATED KINASE Like 14 regulates vascular tissue development in *Arabidopsis* and tomato[J]. Plant Science, 2024, 341:112013.
- [41] ZHONG T, ZHU M, ZHANG Q Q, ZHANG Y, DENG S N, GUO C Y, XU L, LIU T T, LI Y C, BI Y Q, FAN X M, BALINT-KURTI P, XU M L. The ZmWAKL-ZmWIK-ZmBLK1-ZmRBOH4 module provides quantitative resistance to gray leaf spot in maize[J]. Nature Genetics, 2024, 56(2):315-326.