

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2026.01.011

基于 CRISPR/Cas9 技术靶向突变番茄 *WRKY3* 基因

宋茜茜, 刘周圆, 唐晓凤

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要: *WRKY* 转录因子在植物生长发育、次生代谢产物合成以及对生物和非生物胁迫的响应等方面发挥重要作用。为探究 *WRKY3* 在植株逆境应答中的功能及作用机制, 文章通过生物信息法对不同物种 *WRKY3* 的结构域及进化树进行分析, 发现 *WRKY3* 具有较高的保守性; TomExpress 数据库显示 *WRKY3* 在各种组织中均有表达, 且在红果期果实中表达量最高; 并构建 *WRKY3* 基因的 CRISPR 敲除载体, 利用农杆菌介导法转化番茄获得 *WRKY3* 基因的转基因番茄材料, 经聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 及测序鉴定发现, 已成功获得敲除 *WRKY3* 基因的转基因番茄植株。该研究获得了番茄 *WRKY3* 基因敲除突变体稳定遗传株系, 为探究 *WRKY3* 在逆境胁迫下植物的生长发育及果实成熟中所发挥的功能奠定了基础。

关键词: 番茄; *WRKY3* 基因; 基因编辑; CRISPR/Cas9 技术; 载体构建

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-5060(2026)01-0073-07

Targeted mutation of tomato *WRKY3* gene based on CRISPR/Cas9 technology

SONG Qianqian, LIU Zhouyuan, TANG Xiaofeng

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: *WRKY* transcription factors play important roles in plant growth and development, secondary metabolite synthesis, and response to biotic and abiotic stresses. In order to investigate the function and mechanism of action of *WRKY3* in plant adversity response, this study analyzed the structural domains and evolutionary trees of *WRKY3* in different species by bioinformatic method and found that *WRKY3* was highly conserved. TomExpress database was used to analyze *WRKY3* expression level in different tissues of tomato. The result showed that *WRKY3* was expressed in various tissues, and the highest in the fruit at the red-fruit stage. The CRISPR knockdown vector of *WRKY3* gene was constructed. *WRKY3* transgenic tomato plants were obtained by using *Agrobacterium*-mediated transformation and identified by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. In this study, the stable genetic knockout plants of tomato *WRKY3* was obtained, which lays the foundation for the investigation of the function of *WRKY3* in plant growth and development and fruit ripening under adversity stress.

Key words: tomato (*Solanum lycopersicum*); *WRKY3* gene; gene editing; CRISPR/Cas9 technology; vector construction

0 引 言

作为世界上最重要的栽培蔬菜作物之一, 番茄 (*Solanum lycopersicum*) 是促进健康的多种营养素的重要来源, 包括维生素 C、维生素 E、矿物质、类胡萝卜素 (如 β -胡萝卜素) 和番茄红素等, 在

人类饮食中起着至关重要的作用。且番茄作为科学研究的重要模式作物, 在科学研究中的作用也日益突出^[1]。

植物发育过程中面临各种非生物和生物胁迫的挑战。*WRKY* 转录因子是最重要和最大的植物转录调节因子家族之一, 具有多种功能作用, 如

收稿日期: 2023-08-08; 修回日期: 2023-08-28

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目 (2208085MC66)

作者简介: 宋茜茜 (1996—), 女, 安徽砀山人, 合肥工业大学硕士生;

唐晓凤 (1984—), 女, 四川广安人, 博士, 合肥工业大学副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: 31945038@qq.com.

增强对各种植物病原体的抗性、减轻非生物胁迫及衰老等^[2]。WRKY 家族是一个植物特异性家族,其成员至少具有 1 个约 60 个氨基酸的保守 DNA 结合区(WRKY 结构域),由高度保守的 WRKYGQK 肽序列和锌指基序组成^[3]。WRKY 蛋白可以根据 WRKY 结构域的数量和锌指基序的类型(C2H2 或 C2HC)分为 3 大类:第 I 类的成员有 2 个 WRKY 结构域和 1 个 C2H2 型锌指基序;第 II 类的成员只有 1 个 WRKY 结构域和 1 个 C2H2 型锌指基序;第 III 类的成员也只有 1 个 WRKY 结构域,其锌指基序为 C2HC 型。多数 WRKY 家族成员是第 II 类 WRKY 蛋白。WRKY 转录因子可以特异性结合启动子中的 W-box 顺式元件((T)TGAC(C/T)),从而调节启动子区域含有 W-box 元件的基因表达,控制植物的多种生理生化反应^[4-5]。

已有研究表明,WRKY 基因家族在植物逆境胁迫响应中的作用至关重要。辣椒 WRKY27、陆地棉花 WRKY39 和 WRKY40 参与植物对青枯雷尔氏菌的抗性^[6-8];拟南芥 WRKY25、WRKY33 和 WRKY34 分别响应冷和盐胁迫,其过表达转基因株系的胁迫耐受性增强,表明它们参与非生物胁迫的响应^[9]。因此,利用基因组分析和功能分析等技术解析 WRKYs 在非生物和生物胁迫中的作用对于提高植物抗性和植物产量以应对不断变化的环境至关重要。

番茄有 83 个 WRKYs 基因,目前关于番茄 WRKY 基因的研究很少,植物对生物和非生物胁迫响应中的功能及分子机制尚不明确。已有研究表明,番茄中 *SlWRKY39* 在受到丁香假单胞菌的攻击后显著上调,番茄 *SlWRKY39* 的过表达能增强番茄对该病原体的抗性^[10];在低温胁迫下 70 个番茄 WRKYs 基因表现出不同的转录丰度,表明 WRKY 基因在番茄低温响应中可能发挥重要作用。在低温胁迫 48 h 后 10 个番茄 WRKYs 基因被强烈诱导 2 倍以上,*SlWRKY45*、*SlWRKY62* 相对表达量显著上升,可能在增强番茄耐冷性中起关键作用^[11];在番茄对根结线虫(RKN)敏感性研究过程中发现,WRKY3、WRKY23 和 WRKY33 基因在感染根结线虫后差异性表达,表明它们可能在响应 RKN 感染中起重要作用^[12]。因此本实验选择 WRKY3 基因作为目标基因对野生型番茄进行基因编辑,以进一步探究其功能。

CRISPR/Cas9 技术是一种新兴的基因编辑

手段。该系统可用于敲除或调节基因的表达,以了解基因功能及其作用机理,以及产生有助于提高对病原体的抗性,增加产量或对非生物胁迫的耐受性的新性状。CRISPR/Cas9 系统由 Cas9 蛋白和 sgRNA (small guided RNA) 组成,sgRNA 由 CRISPR RNA (crRNA) 和反式激活 CRISPR RNA (tracrRNA) 2 种短 RNA 组成。crRNA 与目标 DNA 区域具有互补性,其重要作用是执行目标识别;tracrRNA 参与 Cas 的募集,同时作为 crRNA 与核酸酶之间的连接点。crRNA 与 tracrRNA 结合形成 sgRNA,识别指导核酸内切酶 Cas9 蛋白诱导双链断裂(DSBs)的靶位点。当 DSBs 产生时,细胞 DNA 修复途径无意中诱导插入删除突变从而导致移码突变^[13-14]。本文以模式植物番茄为实验材料,基于 CRISPR/Cas9 的基因组编辑技术构建 WRKY3 的 CRISPR/Cas9 敲除载体,利用农杆菌介导的侵染法转化野生型番茄,得到番茄转基因 CRISPR 阳性植株,从而为进一步研究 WRKY3 在植物中对生物和非生物胁迫响应中的功能及分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料

野生型番茄 (*Solanum lycopersicum* L. Mill. cv. Ailsa Craig, AC) 由合肥工业大学人工气候培养室繁育保存。

1.1.2 载体与菌株

CRISPR/Cas9 植物基因敲除载体 pKSE401、pCBC-DT1T2 植物基因编辑质粒载体均由西南大学杜海教授赠予;大肠杆菌 DH5 α (*Escherichia coli* DH5 α)、根癌农杆菌 EHA105 (*Agrobacterium tumefaciens* EHA105) 均保存于本实验室 -80 °C 冰箱。

1.1.3 分子生物学试剂

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、高保真 DNA 聚合酶 PrimerStar Mix、T4 连接酶、DL500 DNA Marker 均购于 TaKaRa 公司;RNA 提取试剂 Trizol 购于诺唯赞生物科技有限公司;反转录试剂盒 5X All-In-One RT Master Mix 购于北京安诺伦生物科技有限公司;质粒提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒、琼脂糖胶回收试剂盒均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;引物由 Premier 5.0 软件设计,生工生物工程(上海)股份有限公司合成;其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析

在茄科基因组网络 Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>) 检索 WRKY3 (Solyc02g088340.2) 获取基因序列,利用美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)数据库中 Blast 获得其他物种中该基因编码的蛋白质序列,并对该基因功能结构域和进化关系进行分析。

获取其他物种的同源序列,包括马铃薯 *StWRKY3* (*Solanum tuberosum*, NP_001305593.1)、欧白英 *SdWRKY3* (*Solanum dulcamara*, XP_055803732.1)、辣椒 *CaWRKY3* (*Capsicum annuum*, XP_016561364.1)、芝麻 *SiWRKY3* (*Sesamum indicum*, XP_020551498.1)、烟草 *NtWRKY3* (*Nicotiana tabacum*, XP_016461958.1)、夏栎 *QrWRKY3* (*Quercus robur*, XP_050271687.1)、野大豆 *GsWRKY3* (*Glycine soja*, XP_028214098.1)、毛花猕猴桃 *AeWRKY3* (*Actinidia chinensis*, XP_057488370.1) 及拟南芥 *AtWRKY3* (*Arabidopsis thaliana*, NP_178433.1),利用 ClusterX 2.1 和 ESPript 3.0 进行多重序列比对分析,再用 MEGA7.0 软件和邻接法

(neighbor-joining,NJ)绘制系统进化树。

1.2.2 WRKY3 基因的表达谱

利用 TomExpress 数据库(<https://tomexpress.toulouse.inra.fr/>)分别获取野生型番茄 MT 植株的不同组织,如种子、根、叶、花和不同时期果实中 WRKY3 基因的 RNA-Seq 数据。

1.2.3 WRKY3 基因 CRISPR 表达载体的构建

利用 Benchling 网站 (<https://www.benchling.com/>)设计 sgRNA,选中靶位点后根据确定的靶序列设计引物,靶点引物序列见表 1 所列。以稀释 100 倍的 pCBC-DT1T2 载体为模板进行四引物聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增,PCR 反应程序为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,53 °C 3 s,72 °C 3 s,共 29 个循环;72 °C 7 min。PCR 产物纯化后与 pKSE401 载体一起用 *Bsa*I 内切酶酶切并加入 T4 连接酶连接,于 37 °C 5 h、50 °C 5 min、80 °C 10 min 处理后 4 °C 保存。上述连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态后过夜培养,挑取单菌落进行 PCR 鉴定,菌落鉴定引物序列见表 1 所列,将阳性单菌落扩大培养取样后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,并转农杆菌 EHA105 备用。

表 1 用于 CRISPR 表达载体构建及鉴定的引物

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
WRKY3-S1-F	ATATATGGTCTCGATTGAAGCAATTTGAACAGCCGGGTT	敲除载体构建
WRKY3-S2-F	TGAAGCAATTTGAACAGCCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	敲除载体构建
WRKY3-S1-R	ATTATTGGTCTCGAAACCTGGTGCTCTCGATAAGCCCAA	敲除载体构建
WRKY3-S2-R	AACCTGGTGCTCTCGATAAGCCCAATCTCTTAGTCGACTCTAC	敲除载体构建
U626-F	CCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAA	阳性菌落鉴定
U629-R	AGCCCTCTTCTTCGATCCATCAAC	阳性菌落鉴定

1.2.4 番茄植株的遗传转化及组织培养

依据根癌农杆菌介导的番茄遗传转化系统,将上述构建成功的 CRISPR 表达载体转化农杆菌 EHA105 并获得带有目的质粒的农杆菌。将阳性农杆菌克隆摇菌至 A₆₀₀ 值约为 0.7 后配制为侵染液,对剪切后预培养 2 d 的野生型番茄(AC)外植体进行侵染,并将侵染后的外植体移入共培养培养基;暗培养 2 d 后及时移至含有卡那霉素(Kanamycin Sulfate)的筛选培养基;然后,每 25 d 更换一次筛选培养基且逐渐提高卡那霉素质量浓度;约更换 3 次筛选培养基后将成苗的愈伤组织移至生根培养基中,进行生根培养;待苗生根后再移至营养土中培养^[15]。

1.2.5 阳性苗鉴定

取获得的转基因番茄植株和野生型番茄

(AC)植株幼嫩叶片,用 SDS 法提取番茄总 DNA 作为模板,以野生型为阴性对照进行 DNA 水平 Cas9 PCR 鉴定,Cas9-F、Cas9-R 引物序列见表 2 所列。

表 2 用于转基因番茄株系鉴定的引物

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
Cas9-F	GAGCAGGAAATAGGCAAGG	DNA 鉴定
Cas9-R	CACTGTAAGCTGTAGGAG	DNA 鉴定
WRKY3-S3-F	TCTTATCTCCATTCACAACACG	测序鉴定
WRKY3-S3-R	TCTAACCTCGCTTACGCTCA	测序鉴定

PCR 反应程序如下:94 °C 5 min;94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 30 s,共 30 个循环;72 °C 7 min。

对 DNA 阳性植株进行靶位点序列验证。根据设计的靶位点位置,在其上、下游 200 bp 左右区域利用 Premier 5.0 软件进行测序,鉴定引物序列见表 2 所列。以阳性植株 DNA 为模板,PCR 反应程序为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,54 °C 30 s,72 °C 30 s,共 30 个循环;72 °C 7 min。

PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 WRKY3 基因的生物信息学分析结果

利用 MEGA7.0 和 ESPript 3.0 软件分析番茄及其他不同物种 WRKY3 蛋白保守域,并绘制不同物种 WRKY3 系统进化树,如图 1、图 2 所示。图 1 中,* 代表 WRKYGQK 肽序列及 C2H2 型锌指基序。

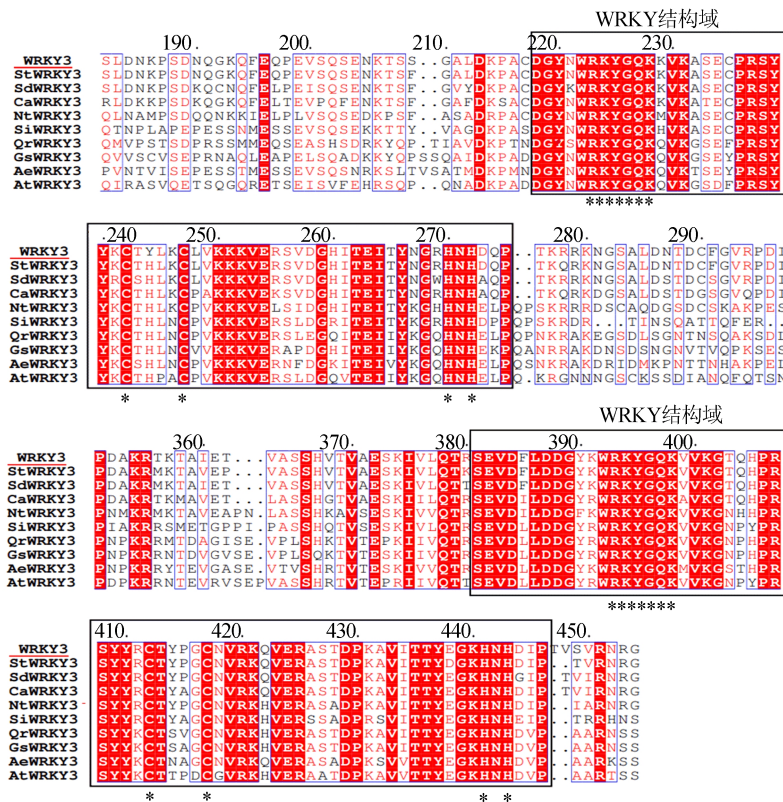


图 1 不同物种 WRKY3 蛋白保守域

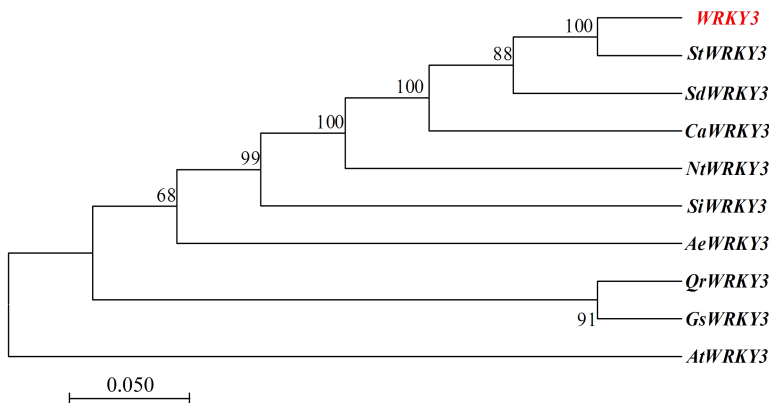


图 2 番茄 WRKY3 进化树

由图 1 可知,WRKY3 属于第 I 类的 WRKY 蛋白,包含 2 个 WRKYGQK 肽序列和 2 个 C2H2 型的锌指基序。由图 2 可知,番茄 WRKY3 与马铃薯 *StWRKY3* 亲缘关系最近,而与拟南芥亲缘

关系较远。

2.2 WRKY3 基因表达模式分析

通过 TomExpress 数据库获得 WRKY3 基因在野生型番茄种子、根、叶、花及不同发育阶段(绿

果期、破色期、红果期)果实的转录组数据,如图 3 所示。

由图 3 可知,WRKY3 基因在番茄各组织中均有表达,在红果期果实中表达量最高,其次在根、叶片及不同发育阶段的果实中也有不同程度的表达,且随着果实成熟度增加其中 WRKY3 基因转录水平也同步升高,但在种子和花中表达量相对较少。由此推测 WRKY3 基因可能参与调控植株的生长发育和果实的成熟度。

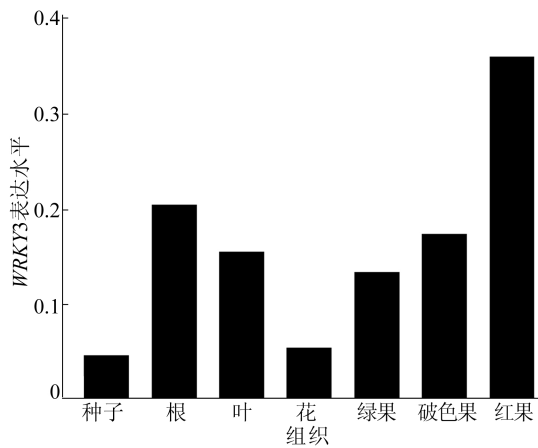


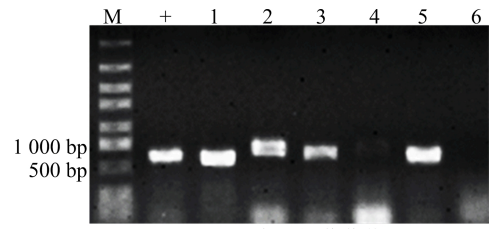
图 3 WRKY3 基因组织特异性表达

2.3 CRISPR 表达载体的构建与鉴定

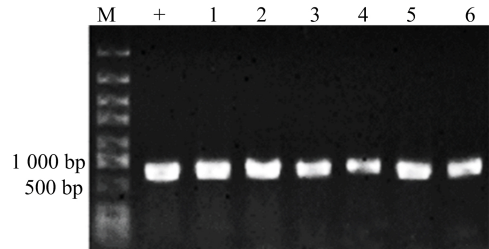
本文利用 Benchling 网站在番茄 WRKY3 的编码序列 (coding sequence, CDS) 区选择合适的靶点,综合中靶率和片段特异性选中了 2 个靶点,靶点 1 和靶点 2 均位于 WRKY3 蛋白保守域,靶点 1 序列为 5'-AAGCAATTTGAACAGCCG-3',靶点 2 序列为 5'-CTGGTGCTCTCGATA AGCC-3'。

按上述方法构建 CRISPR 载体并转入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,挑单菌落进行菌落 PCR 初步检测,结果如图 4a 所示。图 4a 中:M 表示 DNA Marker;+表示对照组;泳道 1~泳道 6 表示大肠杆菌单菌落。由图 4a 可知,PCR 产物片段长度为 600~700 bp,条带明亮清晰、大小符合预期,表明 CRISPR 表达载体成功转化至大肠杆菌。

为进一步确定载体是否构建成功,扩大培养阳性克隆并提取质粒测序鉴定,提取测序鉴定成功的大肠杆菌质粒转入农杆菌 EHA105,农杆菌菌落鉴定为阳性后存甘油菌中备用。农杆菌转化鉴定结果如图 4b 所示。图 4b 中:M 表示 DNA Marker;+表示对照组;泳道 1~泳道 6 表示农杆菌单菌落。由图 4b 可知,PCR 产物片段长度与大肠杆菌相同,均为阳性菌,挑选一个菌株扩播保存。



(a) 大肠杆菌菌落



(b) 农杆菌菌落

图 4 CRISPR 表达载体的菌落 PCR 鉴定

2.4 番茄愈伤组织的诱导与转化

通过上述根癌农杆菌介导法将构建的 WRKY3 基因 CRISPR 表达载体进行遗传转化,转化及组培过程如图 5 所示。

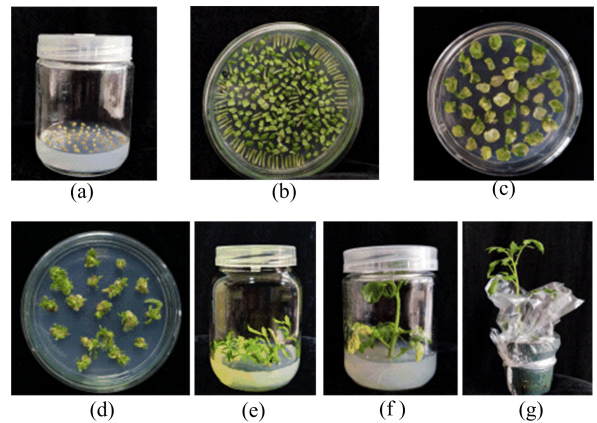


图 5 表达载体遗传转化及组培过程

从图 5 可以看出:经过无菌处理萌发野生型番茄种子(图 5a);待子叶展开后将叶片剪至 2 cm²,预培养 2 d 后;侵染阳性农杆菌 EHA105 共培养 2 d(图 5b);再分别经 K60 筛选培养(卡那霉素质量浓度为 60 mg/L)、K65 筛选培养(卡那霉素质量浓度为 65 mg/L)、K70 筛选培养(卡那霉素质量浓度为 70 mg/L)各 25 d(图 5c~图 5e);生根后培养 25 d 至苗生根(图 5f);最后将生根苗移入营养土中并套袋进一步培养,约 2 周后开袋鉴定(图 5g)。

2.5 番茄 CRISPR 阳性植株鉴定结果分析

提取已开袋的转基因植株与野生型番茄 DNA,以 pKSE401 表达载体所携带筛选标记 Cas9-F/R 为引物,对植株基因组 DNA 进行 PCR

鉴定,结果如图 6a 所示。图 6a 中:M 表示 DNA Marker;+ 表示对照组;泳道 1~泳道 13 表示待鉴定植株。由图 6a 可知,13 株待鉴定植株中有 3 株为 DNA 水平阳性植株。

对通过 PCR 扩增的这 3 株 DNA 水平阳性植株的 *WRKY3* 基因编辑靶点区域进行测序,测序结果如图 6b 所示。结果表明,有 2 株植株测序结果在相应靶点位置序列发生了编辑,分别命名为 *cr1-WRKY3* 和 *cr2-WRKY3*。

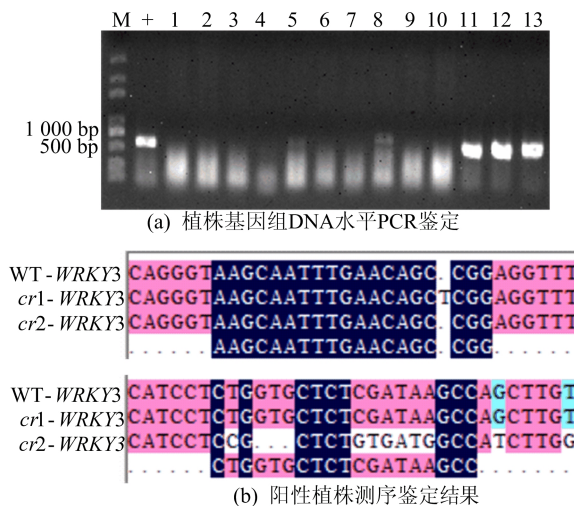


图 6 阳性植株 DNA 水平及测序鉴定

通过 DNAMAN 软件序列比对可知,*cr1-WRKY3* 株系在靶点 1 发生了一个位点的碱基插入,导致碱基移码发生无义突变;*cr2-WRKY3* 株系在靶点 2 发生了碱基对的缺失和突变,以及靶点后续序列碱基移码发生无义突变。由于上述基因突变导致终止密码子提前,从而使翻译提前终止,产生较小、不具功能的 *WRKY3* 蛋白。

结果表明,本研究设计的 2 个靶点形成的 sgRNA 可引导 Cas9 蛋白对 *WRKY3* 基因 CDS 区进行编辑,产生功能丧失的 *WRKY3* 蛋白,从而获得了 *WRKY3* 基因特异性编辑的番茄突变体植株。

3 讨 论

目前基因编辑技术已经在抗病、抗逆以及改良农艺性状方面取得了很大的成就,创建的突变体能够稳定遗传,从而更准确地研究目标基因的功能,保证了科研的严谨性。基因编辑技术加速了农作物的驯化,提高了番茄商业价值,因此 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术将在番茄等重要作物上获得广泛的应用^[16]。

迄今为止,研究表明 *WRKYs* 转录因子与各种生理过程有关,包括植物生长、根系发育、代谢、胚胎形态发生、衰老和发芽。*WRKY3* 和 *WRKY4* 基因已被证明具有对病原体感染和非生物胁迫响应的生理功能。例如,烟草中的 *NaWRKY3* 参与对伤害的防御反应;*MuWRKY3* 通过调节胁迫响应基因的表达和活性氧清除酶的活性来增强花生的抗旱性;拟南芥 *WRKY3* 和 *WRKY4* 基因增强植物对坏死性病原体的抗性^[17]。然而,通过构建突变体验证这 2 种 *WRKY* 转录因子在番茄响应胁迫和生长发育中的作用机制的相关研究尚未开展。

本文通过对多种植物 *WRKY3* 同源序列进行生物信息学分析发现,*WRKY3* 高度保守,包含 2 个 *WRKYGQK* 肽序列、2 个 C2H2 型的锌指基序。分析系统发育树发现,番茄 *WRKY3* 与马铃薯的关系最为密切,与拟南芥亲缘关系较远。通过分析 *WRKY3* 基因在野生型番茄各组织中的表达水平,推测 *WRKY3* 基因可能参与调控植株生长发育和果实成熟。研究表明,在 DNA 水平上,*WRKY* 转录因子可通过自调节或交叉调节激活或抑制下游基因的表达调控其反应。在蛋白水平上,*WRKY* 转录因子可以与多种蛋白相互作用,包括丝裂原活化蛋白激酶、组蛋白去乙酰化酶、抗性 R 蛋白、多种转录因子等,调节植物的生长发育或各种应激反应^[18]。因此推测 *WRKY3* 可能在番茄植株各种逆境应答、生长发育调节和果实发育中发挥重要作用。

本研究通过 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统设计敲除靶点,成功构建 *WRKY3* 基因的 CRISPR/Cas9 敲除载体。通过根癌农杆菌介导的番茄遗传转化系统和组织培养成功获得 2 株独立的 *WRKY3* 基因敲除突变体番茄幼苗,为探究在胁迫环境下 *WRKY3* 对植物的生长发育发挥的作用及进一步研究其分子机制和通路奠定了基础,同时也为获得番茄优良品种提供了遗传材料。

[参 考 文 献]

- [1] ZHANG N, ROBERTS H M, VAN ECK J, et al. Generation and molecular characterization of CRISPR/Cas9-induced mutations in 63 immunity-associated genes in tomato reveals specificity and a range of gene modifications [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 10.
- [2] AAMIR M, SINGH K V, MEENA M, et al. Structural and functional insights into *WRKY3* and *WRKY4* transcription fac-

- tors to unravel the WRKY-DNA (W-Box) complex interaction in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). A computational approach[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8:819.
- [3] SINGH D, DEBNATH P, ROOHI, et al. Expression of the tomato WRKY gene, *SlWRKY23*, alters root sensitivity to ethylene, auxin and JA and affects aerial architecture in transgenic Arabidopsis[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2020, 26(6):1187-1199.
- [4] GUAN K X, YANG Z M, ZHAN M Q, et al. Two sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L.) WRKY transcription factors promote aluminum tolerance via the reduction in callose deposition[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(12):10288.
- [5] HUANG S X, GAO Y F, LIU J K, et al. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2012, 287(6):495-513.
- [6] HUSSAIN A, NOMAN A, KHAN I M, et al. Molecular regulation of pepper innate immunity and stress tolerance: an overview of WRKY TFs[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 135(C):103610.
- [7] WANG X L, YAN Y, LI Y Z, et al. *GhWRKY40*, a multiple stress-responsive cotton WRKY gene, plays an important role in the wounding response and enhances susceptibility to *Ralstonia solanacearum* infection in transgenic *Nicotiana Benthamiana* [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(4):e93577.
- [8] SHI W N, LIU D D, HAO L L, et al. *GhWRKY39*, a member of the WRKY transcription factor family in cotton, has a positive role in disease resistance and salt stress tolerance[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, 118(1):17-32.
- [9] LIU G, ZHANG D Y, ZHAO T T, et al. Genome-wide analysis of the WRKY gene family unveil evolutionary history and expression characteristics in tomato and its wild relatives[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13:962975.
- [10] BAI Y L, SUNARTI S, KISSOUDIS C, et al. The role of tomato WRKY genes in plant responses to combined abiotic and biotic stresses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:801.
- [11] LIN C, YANG Y, LIU C, et al. Characterization of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum* reveals colinearity and their expression patterns under cold treatment[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 464(3):962-968.
- [12] BHATTARAI K K, XIE Q G, MANTRLIN S, et al. Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires an intact jasmonic acid signaling pathway[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21(9):1205-1214.
- [13] IJAZ S, HAQ I U, RAZZAQ H A. Mutation introduced in *DDTFR10/A* gene of ethylene response element-binding protein (EREBP) family through CRISPR/Cas9 genome editing confers increased Fusarium wilt tolerance in tomato [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2023, 29(1):1-10.
- [14] D'AMBROSIO C, STIGLIANI A L, GIORIO G. CRISPR/Cas9 editing of carotenoid genes in tomato[J]. *Transgenic Research*, 2018, 27(4):367-378.
- [15] 曹慧颖, 夏润玺, 吕淑霞, 等. 提高农杆菌介导番茄遗传转化效率的研究[J]. *北方园艺*, 2008(1):178-180.
- [16] 蒋萌, 付尚谭, 王晓峰. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在番茄中的应用现状及展望[J]. *西北植物学报*, 2022, 42(2):348-360.
- [17] LI P, LI X W, JIANG M. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of WRKY3 and WRKY4 function decreases salt and Me-JA stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48(8):5821-5832.
- [18] 黄幸, 丁峰, 彭宏祥, 等. 植物 WRKY 转录因子家族研究进展[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(12):129-143.

(责任编辑 闫杏丽)

(上接第 72 页)

- [16] 张恒慧, 张志军, 陈士国, 等. 紫苏粕蛋白抗氧化活性肽的制备、分离纯化及序列鉴定[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(9):347-355.
- [17] XIE S Z, YANG G, JIANG X M, et al. *Polygonatum cyrtonema* Hua polysaccharide promotes GLP-1 secretion from enteroendocrine L-cells through sweet taste receptor-mediated cAMP signaling[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(25):6864-6872.
- [18] 田文慧, 孙丽平, 张翠, 等. 白啤中二肽基肽酶-IV抑制肽的虚拟筛选及活性分析[J]. *食品科学*, 2022, 43(10):81-87.
- [19] TOLHURST G, ZHENG Y, PARKER H E, et al. Glutamine triggers and potentiates glucagon-like peptide-1 secretion by raising cytosolic Ca²⁺ and cAMP[J]. *Endocrinology*, 2011, 152(2):405-413.
- [20] 黄晶晶, 周迎芹, 程秀峰, 等. 食源性血糖调节活性肽的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(21):431-441.
- [21] 赵嘉妮, 陈宏, 翁凌, 等. 食源性 DPP-IV 抑制肽降血糖作用机制研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(23):447-454.
- [22] MIGUÍNS-GÓMEZ A, CASANOVA-MARTÍ A, BLAY M T, et al. Glucagon-like peptide-1 regulation by food proteins and protein hydrolysates[J]. *Nutrition Research Reviews*, 2021, 34(2):259-275.
- [23] CARON J, CUDENNEC B, DOMENGER D, et al. Simulated GI digestion of dietary protein: release of new bioactive peptides involved in gut hormone secretion[J]. *Food Research International*, 2016, 89(1):382-390.

(责任编辑 闫杏丽)