

富民枳 *WRKY* 基因家族的鉴定和干旱胁迫表达分析

张珊珊, 阮孙美, 杨文忠*

(国家林业和草原局云南珍稀濒危森林植物保护和繁育重点实验室, 云南省林业和草原科学院, 昆明 650201)

摘要: 【目的】富民枳 (*Poncirus polyandra*), 为柑橘属近缘种, 是嫁接时广泛使用的抗性砧木, 属云南省特有的极小种群野生植物。*WRKY* 家族是植物中特有且最大的转录因子之一, 在植物非生物胁迫过程中发挥着重要的作用。研究富民枳 *WRKY* 基因家族, 为解析富民枳 *WRKY* 基因功能以及筛选抗旱基因提供理论依据。【方法】基于富民枳基因组数据, 利用生物信息学方法对富民枳 *WRKY* 基因家族成员进行全基因组鉴定, 系统分析该家族成员的理化性质、序列特征、系统进化关系、染色体定位、共线性、基因结构和顺式作用元件等以及 qRT-PCR 分析干旱胁迫下的表达模式。【结果】在富民枳基因组中共鉴定到 46 个 *WRKY* 家族基因, 命名为 *PpWRKY1*~*PpWRKY46*, 染色体定位分析显示 *WRKY* 家族基因不均匀地分布在 9 条染色体上。亚细胞定位预测表明, 富民枳 *WRKY* 家族成员主要定位于细胞核上。*WRKY* 结构域多序列比对分析显示, 只有 IIc 亚组的 *PpWRKY15* 和 *PpWRKY21* 的典型七肽序列发生单氨基酸变异。共线性分析结果表明, 富民枳和枳有 88 对共线性基因; 片段复制是 *PpWRKY* 基因家族扩张的主要驱动力。顺式作用元件分析表明, *PpWRKY* 家族基因启动子区域含有大量胁迫类和激素类响应顺式作用元件。基于富民枳近缘种枳的 *WRKY* 家族基因在干旱胁迫下的转录组数据, 在富民枳中筛选到 *PpWRKY8*、*PpWRKY12*、*PpWRKY13*、*PpWRKY19*、*PpWRKY23*、*PpWRKY27*、*PpWRKY28*、*PpWRKY30* 和 *PpWRKY41* 共 9 个同源抗旱候选基因, 最后通过 qRT-PCR 分析表明, 这 9 个基因均受干旱胁迫诱导显著表达。蛋白互作预测结果表明, 有 12 个 *PpWRKY* 蛋白可能通过 MYB 转录因子介导 ABA 信号参与调控气孔运动来影响植物的耐旱性。【结论】鉴定到 9 个可能参与调控干旱胁迫的 *PpWRKY* 基因, 为解析 *WRKY* 基因在富民枳干旱胁迫响应中的功能提供新信息, 并为培育耐旱柑橘品种提供抗旱基因资源。

关键词: 富民枳; *WRKY* 基因; 干旱胁迫; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: S666 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2025)01-0001-08

Identification of *WRKY* Gene Family and Analysis of Drought Stress Expression in *Poncirus polyandra*

ZHANG Shanshan, RUAN Sunmei, YANG Wenzhong*

(Yunnan Academy of Forestry and Grassland Sciences, Yunnan Key Laboratory of Conservation and Breeding of Rare and Rare Forest Plants, National Forestry and Grassland Administration, Kunming 650201, Yunnan, China)

Abstract: 【Objective】 *Poncirus polyandra*, a relative species of citrus, is a resistant rootstock widely used in grafting. It is also a plant species with extremely small populations in Yunnan. The *WRKY* family, as one of the largest families of transcription factors in plants, plays a vital role in plant response to abiotic stresses such as drought, cold and salt. However, the current understandings of *WRKY* genes in *P. polyandra* are limited. The

收稿日期: 2024-11-11

接受日期: 2024-12-09

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目 (31960278); 云南省林业和草原科学院基金项目 (MS2019-08, MS2019-09)

作者简介: 张珊珊, 女, 副研究员, 研究方向为富民枳抗逆分子机制。E-mail: 944107309@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: wzyang2004@126.com

purpose of this study is to analysis the function of *WRKY* genes and screen the genes with potential drought resistances in *P. polyandra*. **【Methods】** Based on the genome-wide data of *P. polyandra*, *WRKY* genes were identified by HMMER, NCBI-CDD and SMART searches. Comprehensive analyses were systematically performed using bioinformatics methods, including the physicochemical properties, sequence characteristics, phylogenetic relationships, chromosome localization, collinearity, gene structure and cis-acting elements of the *PpWRKY* family members. In order to verify the drought resistance function of *WRKY* gene family members, one-year old *P. polyandra* seedlings were used as experimental materials. In the drought stress experiments, the seedlings were treated with 20% PEG-6000 solution. The leaves were respectively collected after 0 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h, and stored in the refrigerator at -80 °C. Real-time fluorescence quantitative analysis was carried out to study the effects of drought stress on the expression patterns of these genes. **【Results】** Amount to 46 *WRKY* family genes were identified in the genome of *P. polyandra* and named *PpWRKY1-PpWRKY46*. The results showed that the length of *PpWRKY* protein ranged from 116 to 1103 amino acids. Among them, the molecular weight of *PpWRKY21* was the lowest (13213.48 kDa), whereas *PpWRKY23* had the highest molecular weight (120198.96 kDa). The protein isoelectric points (pI) ranged from 4.93 (*PpWRKY24*) to 9.8 (*PpWRKY17*), and 61% of them was lower than 7.0, indicating that most of the proteins were acidic. Subcellular localization results exhibited that *PpWRKY23* was located in lysosomes and vacuoles, and other *PpWRKY* genes were located in the nucleus. Phylogenetic analysis revealed that *PpWRKY* proteins could be classified into three groups, namely groups I, II and III. Group II had the most members (31), which was further divided into five subgroups (II a- II e), containing three, eight, nine, five, and six *PpWRKY* members separately. *WRKY* domain multiple sequence alignment analysis demonstrated that only the typical heptaepitides of *PpWRKY15* and *PpWRKY21* in subgroup II c had single amino acid variation. Chromosome localization analysis revealed that *WRKY* family genes were unevenly distributed on nine chromosomes in *P. polyandra*. The genes clustered on chromosome one were the most, with a total of nine genes. But there was only one gene distributed on chromosome four. We found 24 duplicate gene pairs in the *PpWRKY* family, including four tandem duplicate gene pairs and 20 fragment duplicate gene pairs in the *P. polyandra* genome, suggesting that fragment replication was the main driving force for the expansion of *PpWRKY* gene family members. The *Ka/Ks* values of replicated *WRKY* genes in *P. polyandra* were all less than one, suggesting that these genes might have undergone purification selection. Intergenomic collinearity analysis indicated that there were 88 pairs of collinearity genes between *P. polyandra* and *P. trifoliata*. A cis-acting element analysis of the *P. polyandra WRKY* gene family members identified eight types of cis-elements related to plant hormone and stress responses. Among these, 26 *PpWRKY* genes contained a drought inducible element (MBS), 37 *PpWRKY* genes contained an abscisic acid-responsive element (ABRE), and 17 *PpWRKY* genes contained a low temperature response element (LTR). This suggested that the *PpWRKY* gene plays an important role in the regulation of hormone and stress in *P. polyandra*. To mine the drought-resistant *WRKY* gene in *P. polyandra*, we analyzed the transcriptomic data of *P. trifoliata* under drought stress treatments. Results revealed that 37 out of the 53 *WRKY* genes in *P. trifoliata* were significantly upregulated by drought, indicating that these genes might play an important role in drought resistance. Then, we screened nine homologous drought resistance candidate genes of *P. polyandra* which have a high homology with *P. trifoliata*, such as *PpWRKY8*,

PpWRKY12, *PpWRKY13*, *PpWRKY19*, *PpWRKY23*, *PpWRKY27*, *PpWRKY28*, *PpWRKY30* and *PpWRKY41*. Their expression patterns under drought stress were detected by real-time fluorescence quantification, and the results revealed that all nine genes were significantly up-regulated under drought stress. Among these genes, the expression of *PpWRKY12*, *PpWRKY19*, *PpWRKY23*, *PpWRKY27*, *PpWRKY28* and *PpWRKY30* genes reached the peak after 6h of drought stress, which were 3.63-fold, 2.25-fold, 1.48-fold, 2.63-fold, 3.22-fold, and 2.89-fold of the control, respectively. *PpWRKY8* and *PpWRKY13* genes exhibited peak expression after 12 h of drought treatment, which were 2.6-fold and 2.9-fold of the control, separately, and the expression of *PpWRKY41* was the highest after 24 h of drought treatment, which was 2.92-fold of the control. The results demonstrated that these nine *WRKY* genes might be involved in the defence response of *P. polyandra* to drought stress. The results of protein interaction prediction showed that 12 *PpWRKY* proteins may be involved in regulating stomatal movement through MYB transcription factor mediated ABA signal to affect drought tolerance of plants. **【Conclusion】** A total of 46 *WRKY* genes were identified in *P. polyandra*. The expression levels of *PpWRKY8*, *PpWRKY12*, *PpWRKY13*, *PpWRKY19*, *PpWRKY23*, *PpWRKY27*, *PpWRKY28*, *PpWRKY30* and *PpWRKY41* significantly increased under drought stress, demonstrating that these genes may participate in the process of responses to drought. This study provides new information for analysing the function of *WRKY* gene and its regulatory mechanism in response to drought stress in *P. polyandra*, and provides excellent genetic resources for breeding drought-tolerant citrus varieties.

Key words: *Poncirus polyandra*; *WRKY* genes; Drought stress; Bioinformatics; Expression analysis

WRKY 家族是一类在植物界特有的、数量庞大的转录因子^[1]。其名称源于它们高度保守的 *WRKY* 结构域，该结构域大约包含 60 个氨基酸残基，其中氨基（N）端有高度保守的七肽序列 *WRKYGQK*，而在结构域的羧基（C）端则是一个 C2H2 型或 C2HC 型的锌指结构^[2]。根据 *WRKY* 结构域的数量以及锌指结构的特征，*WRKY* 转录因子一般被分为 I、II 和 III 组^[2-4]。*WRKY* 转录因子通过 *WRKY* 结构域识别并结合 DNA 序列中的顺式作用元件 W-box（（C/T）TGAC（C/T）），进而调控靶基因的表达水平，发挥相应的生物学功能^[1]。自第一个 *WRKY* 基因 *SPF1* 于 1994 年从甘薯（*Dioscorea esculenta*）中被克隆^[5]，*WRKY* 基因家族相继在拟南芥^[6]、水稻^[7]、草莓^[8]、香樟^[9]、绿豆^[10]、板栗^[11]等多个植物中被鉴定。

植物在生长过程中面临着各种逆境胁迫^[12]，其中干旱是严重影响植物生长发育和产量的重要因素之一^[13]。近年来，越来越多的研究表明，*WRKY* 转录因子在植物响应干旱胁迫中起着关键作用^[1, 14]。研究表明，大豆中的 *GmWRKY27* 基因可以通过两种方式增强大豆对干旱的抵抗力：一是直接抑制 *GmNAC29* 基因的启动子活性，二是与 *GmMYB174* 基因协同作用，进一步抑制 *GmNAC29* 的表达^[15]。拟南芥的 *AtWRKY1* 通过调节膜转运蛋白以保持水分，从而调节其对干旱胁迫的响应^[16]。尤其是在拟南芥中过表达小麦的 *TaWRKY2* 和 *TaWRKY19*，或水稻的 *OsWRKY45* 基因，可提高植株对干旱胁迫的耐受性^[17-18]。茶树过表达 *CsWRKY26* 可通过激活脱落酸信号通路或调节乙烯、生长素及丝裂原活化蛋白激酶信号转导，增强胁迫相关基因的表达，从而提高茶树的抗旱能力^[19]。棉花的 *GhWRKY68* 通过调节 ABA 信号传导以及细胞活性氧来响应干旱胁迫和盐胁迫^[20]。

富民枳（*Poncirus polyandra*）是芸香科枳属常绿小乔木，为云南省特有的极小种群野生植物^[21-22]。

富民枳抗逆性强，是一种优秀的柑橘矮化砧^[23-24]，尤其是前期研究发现该物种具有一定的抗旱性（研究结果尚未发表）。枳（*Poncirus trifoliata*）是枳属富民枳唯一的近缘种，耐旱耐寒，是柑橘最重要的砧木之一，也是最有价值的抗性和耐性基因来源^[22, 25-26]。虽然课题组前期研究已发现富民枳基因组富含多个抗逆性相关基因^[27]，但富民枳的 *WRKY* 基因在干旱胁迫下是否发挥功能不得而知。

因此，本研究基于富民枳的全基因组数据，通过筛选和鉴定 *PpWRKYs* 基因家族成员，分析其蛋白理化性质、进化关系、保守基序和顺式作用元件等，并基于近缘种枳在干旱胁迫下的转录组数据，在富民枳中筛选同源抗旱候选 *WRKY* 基因，最后通过 qRT-PCR 验证 *PpWRKYs* 在干旱胁迫下的表达水平，为进一步研究 *WRKY* 基因家族成员在富民枳响应干旱胁迫应答过程中的作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 富民枳 *WRKY* 基因家族鉴定及理化性质分析

富民枳基因组由本课题组完成测序并发表^[27]，*WRKY* 保守结构域序列（PF03106）文件从 InterPro（<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>）数据库下载。通过 HMMER 软件构建隐马尔可夫模型，在富民枳的氨基酸序列中检索。检索到的蛋白序列利用 NCBI-CDD（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>）和 SMART（<http://smart.embl-heidelberg.de/>）数据库进行结构域分析，剔除无 *WRKY* 结构域的蛋白，最终确定富民枳的 *WRKY* 基因家族成员。利用 ExPASy（<https://web.expasy.org/protparam/>）网站中的 ProtParam 工具分析富民枳 *WRKY* 蛋白的序列长度、相对分子质量及等电点。利用 Euk-mPLoc2.0（<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>）在线网站进行亚细胞定位分析。

1.2 富民枳 *WRKY* 家族蛋白的序列比对和系统发育分析

利用 MEGA11 软件中的 MUSCLE 对富民枳和拟南芥 *WRKY* 转录因子的氨基酸序列进行多序列比对，构建邻接系统发育树，bootstrap 复制为 1000，最后使用 ggtree 对进化树进行美化^[28]。利用 DNAMAN 软件对 *PpWRKYs* 蛋白各亚组成员的 *WRKY* 结构域进行多序列比对及可视化。

1.3 *PpWRKY* 基因的染色体定位和共线性分析

从 Phytozome（https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Ptrifoliata_v1_3_1）网站下载枳的全基因组数据和基因注释文件，富民枳基因组数据由本课题组完成测序并注释，通过 TBtools 的 MCScanX 功能对富民枳进行种内与种间共线性分析，并计算富民枳中片段重复基因对的 *Ka/Ks* 比值。

1.4 *PpWRKY* 家族基因结构、保守基序及结构域分析

利用 MEME（<http://meme.suite.org/tools/meme>）在线网站预测富民枳 *WRKY* 家族蛋白的保守基序，设置 motif 数量为 10；通过 TBtools 软件从富民枳基因组注释文件中提取富民枳 *WRKY* 家族基因的外显子和内含子位置信息；利用 NCBI-CDD 获取 *PpWRKY* 家族蛋白的保守结构域位置信息。最后通过 TBtools 软件的 Gene Structure View 工具进行可视化。

1.5 富民枳 *WRKY* 基因启动子顺式作用元件分析

利用 TBtools 软件提取 *PpWRKYs* 基因上游 2000 bp 的启动子序列，将其提交到 Plant CARE

(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 网站进行顺式作用元件预测, 通过手动整理后用 TBtools 软件进行可视化。

1.6 富民枳同源抗旱 WRKY 候选基因的鉴定

从 Phytozome (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Ptrifoliata_v1_3_1) 获取枳 (*Poncirus trifoliata*) 的基因组数据, 从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载枳在干旱胁迫下的转录组数据, 登记号是 PRJNA905931。再利用 HMMER 软件鉴定枳的 WRKY 家族基因, 方法如 1.1, 并通过枳 WRKY 基因 ID 提取在模拟干旱胁迫处理后 0 h、1.5 h、6 h 和 24 h 的转录组数据, 利用 TBtools 软件进行可视化。最后通过 TBtools 软件把枳中表达量高且显著上调的 WRKY 基因与富民枳基因组进行 Blast, 初步鉴定到富民枳抗旱候选基因。

1.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 表达分析

以云南省林业与草原科学院温室大棚培育的一年生富民枳作为实验材料。选取长势一致的富民枳幼苗, 用浓度为 20% 的 PEG-6000 溶液处理模拟干旱胁迫, 每个处理 3 个重复, 分别于处理 0、3、6、12 和 24 h 后采集叶片, 保存于 -80 °C 冰箱。利用 HiPure Plant RNA Plus Kit 试剂盒 (美基生物, 北京) 提取富民枳叶片总 RNA, 然后用江苏百时美生物科技有限公司 (连云港) 的 All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix (with dsDNase) 反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。通过 Vector NTI 设计引物 (表 1), 然后在生工生物工程股份有限公司 (上海) 合成。以 *Actin* 基因作为内参, 使用 F488 SYBR qPCR Mix 荧光定量试剂盒 (江苏百时美, 连云港) 进行 qRT-PCR 检测。反应体系 10 μ L: 5 μ L F488 SYBR qPCR Mix, 0.25 μ L 正向引物, 0.25 μ L 反向引物, 1 μ L cDNA, 3.5 μ L ddH₂O。扩增程序: 95 °C 预变性 30~60 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法测定相对表达量^[29]。

表 1 用于 RT-PCR 的引物
Table 1 Primers for RT-PCR

引物 primer	正向引物 (5'~3') Forward primer	反向引物 (5'~3') Reverse primer
<i>Actin</i>	CCGACCGTATGAGCAAGGAAA	TTCCTGTGGACAATGGATGGA
<i>PpWRKY8</i>	ACGAAGGGCCACCTTCTGAT	TGTTATGGCTAGAGGTGTAGGTG
<i>PpWRKY12</i>	TCGACCGGACAAACCATCACTC	TTCCCAGAAATTGCCGCAGC
<i>PpWRKY13</i>	AAGCACAACCATGATGTTCCGG	TGTTAGGATGATGAGCCACCGC
<i>PpWRKY19</i>	AGTCTGAGCAATCTGCCGTACATC	AGTCTCTGACTCGCAATTCGATTG
<i>PpWRKY23</i>	AGCTTTGTGACCGAATGCCAAG	ATGCACTGAGCCTCAGGACCTTC
<i>PpWRKY27</i>	ATGCTGTCTCCTTCCCTTCTGG	TCAGGAACCTGATGACCAAGTTG
<i>PpWRKY28</i>	AGCTACTACCGATGCACGCATC	TGCATCTGGTTCAAGATGTGCTC
<i>PpWRKY30</i>	ATGTTGAGAGAGCATCTACGGACCC	TGTGGCTACTATTCTTACCAGCCGG
<i>PpWRKY41</i>	ATCAAGGGCTCACCATACCCAC	AATGACGGTGCTCTCCTTCGTAC

1.8 PpWRKY 蛋白互作网络预测

利用 string 11.5 (<http://string-db.org/>) 数据库预测 PpWRKY 蛋白与调控植物耐旱性的 MYB 蛋白 (AtMYB15、AtMYB44 和 AtMYB96) 的相互作用网络, 选定模式植物拟南芥为物种参数, 去除不成簇和单个节点的蛋白得到蛋白互作网络图。

2 结果与分析

2.1 富民枳 *WRKY* 基因家族鉴定及理化性质分析

在富民枳基因组中共搜索到 49 条具有 *WRKY* 结构域的蛋白序列,剔除 3 条(*evm.model.LG09.1378*、*evm.model.LG05.2450* 和 *evm.model.LG05.872*) 不含有典型 *WRKY* 结构域的假阳性序列后,最终从富民枳基因组中鉴定到 46 个 *PpWRKY* 基因,按照其在染色体上的位置顺序命名为 *PpWRKY1~PpWRKY46* (表 2)。理化性质分析结果表明,鉴定到的 46 个 *PpWRKY* 蛋白的氨基酸数量为 116~1103 aa,其中 *PpWRKY21* 分子质量最低,为 13213.48 kDa; *PpWRKY23* 分子质量最高,为 120198.96 kDa。蛋白等电点 (pI) 为 4.93 (*PpWRKY24*)~9.8 (*PpWRKY17*),其中 61% 的蛋白等电点低于 7.0,说明富民枳 *WRKY* 蛋白大部分是酸性。亚细胞定位预测结果显示,除 *PpWRKY23* 定位于溶酶体和液泡外,其余 45 个 *PpWRKY* 基因均定位于细胞核中。

表 2 *PpWRKY* 基因相关信息
Table 2 Information related to *PpWRKY* genes

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	氨基酸数量 Number of amino acid	等电点 PI	分子质量 Mw/Da	组/亚组 Group/ Subgroup	染色体 Chromosome	亚细胞定位预测 Prediction of subcellular localization
<i>evm.model.LG01.326</i>	<i>PpWRKY1</i>	342	6.32	37 421.21	II e	1	细胞核
<i>evm.model.LG01.3345</i>	<i>PpWRKY2</i>	602	6.23	65 179.94	II b	1	细胞核
<i>evm.model.LG01.3451</i>	<i>PpWRKY3</i>	307	5.77	34 362.27	II e	1	细胞核
<i>evm.model.LG01.3503</i>	<i>PpWRKY4</i>	336	5.2	37 632.48	III	1	细胞核
<i>evm.model.LG01.369</i>	<i>PpWRKY5</i>	359	5.02	40 495.95	III	1	细胞核
<i>evm.model.LG01.510</i>	<i>PpWRKY6</i>	501	7.23	54 333.76	II b	1	细胞核
<i>evm.model.LG01.572</i>	<i>PpWRKY7</i>	323	8.78	35 708.04	II c	1	细胞核
<i>evm.model.LG01.594</i>	<i>PpWRKY8</i>	274	5.18	31 021.3	II e	1	细胞核
<i>evm.model.LG01.944</i>	<i>PpWRKY9</i>	353	9.69	39 621.87	II d	1	细胞核
<i>evm.model.LG02.1969</i>	<i>PpWRKY10</i>	393	5.88	43 909.87	II b	2	细胞核
<i>evm.model.LG02.452</i>	<i>PpWRKY11</i>	359	9.3	38 791.88	II d	2	细胞核
<i>evm.model.LG03.1430</i>	<i>PpWRKY12</i>	320	8.35	35 519.57	II a	3	细胞核
<i>evm.model.LG03.1603</i>	<i>PpWRKY13</i>	595	7.09	65 006.34	I a	3	细胞核
<i>evm.model.LG03.1900</i>	<i>PpWRKY14</i>	230	9.1	25 906.22	II c	3	细胞核
<i>evm.model.LG03.1927</i>	<i>PpWRKY15</i>	202	7.18	23 128.21	II c	3	细胞核
<i>evm.model.LG03.424</i>	<i>PpWRKY16</i>	363	9.38	40 112.03	II d	3	细胞核
<i>evm.model.LG04.829</i>	<i>PpWRKY17</i>	358	9.8	40 365.76	II d	4	细胞核
<i>evm.model.LG05.1194</i>	<i>PpWRKY18</i>	599	6.45	65 236.13	II b	5	细胞核
<i>evm.model.LG05.1295</i>	<i>PpWRKY19</i>	488	6.27	53 121.33	I a	5	细胞核
<i>evm.model.LG05.1970</i>	<i>PpWRKY20</i>	492	6.07	53 073.03	II e	5	细胞核
<i>evm.model.LG05.22</i>	<i>PpWRKY21</i>	116	9.67	13 213.48	II c	5	细胞核
<i>evm.model.LG05.2392</i>	<i>PpWRKY22</i>	265	5.2	30 068.16	II e	5	细胞核
<i>evm.model.LG05.2539</i>	<i>PpWRKY23</i>	1103	6.1	120 199	II b	5	溶酶体、液泡
<i>evm.model.LG06.1687</i>	<i>PpWRKY24</i>	405	4.93	44 907.2	II e	6	细胞核
<i>evm.model.LG06.1727</i>	<i>PpWRKY25</i>	382	5.35	42 079.37	III	6	细胞核
<i>evm.model.LG06.91</i>	<i>PpWRKY26</i>	372	6	40 961.72	II c	6	细胞核

基因 ID	基因名称	氨基酸数量	等电点	分子量	组/亚组	染色体	亚细胞定位预测
Gene ID	Gene name	Number of amino acid	PI	Mw/Da	Group/Subgroup	Chromosome	Prediction of subcellular localization
<i>evm.model.LG07.1123</i>	<i>PpWRKY27</i>	305	7	33 912.31	II c	7	细胞核
<i>evm.model.LG07.1630</i>	<i>PpWRKY28</i>	193	9.12	21 656.09	II c	7	细胞核
<i>evm.model.LG07.1989</i>	<i>PpWRKY29</i>	568	6.64	62 894.97	II b	7	细胞核
<i>evm.model.LG07.2082</i>	<i>PpWRKY30</i>	468	7.71	50 962.14	I a	7	细胞核
<i>evm.model.LG07.2104</i>	<i>PpWRKY31</i>	291	6.19	32 079.37	II c	7	细胞核
<i>evm.model.LG07.279</i>	<i>PpWRKY32</i>	356	6.57	39 395.82	III	7	细胞核
<i>evm.model.LG07.280</i>	<i>PpWRKY33</i>	309	6.02	35 007.62	III	7	细胞核
<i>evm.model.LG07.926</i>	<i>PpWRKY34</i>	154	9.64	17 280.34	II c	7	细胞核
<i>evm.model.LG08.140</i>	<i>PpWRKY35</i>	257	8.41	28 673.11	II a	8	细胞核
<i>evm.model.LG08.141</i>	<i>PpWRKY36</i>	321	7.17	35 906.14	II a	8	细胞核
<i>evm.model.LG08.1427</i>	<i>PpWRKY37</i>	569	6.6	62 543.49	II b	8	细胞核
<i>evm.model.LG08.1495</i>	<i>PpWRKY38</i>	563	6.47	60 903.47	I a	8	细胞核
<i>evm.model.LG08.1635</i>	<i>PpWRKY39</i>	721	5.78	77 868.67	I a	8	细胞核
<i>evm.model.LG08.2185</i>	<i>PpWRKY40</i>	485	6.31	53 220.25	I a	8	细胞核
<i>evm.model.LG08.66</i>	<i>PpWRKY41</i>	341	9.56	36 671.4	II d	8	细胞核
<i>evm.model.LG09.1053</i>	<i>PpWRKY42</i>	331	5.48	36 852.64	III	9	细胞核
<i>evm.model.LG09.1115</i>	<i>PpWRKY43</i>	569	6.48	62 646.18	I a	9	细胞核
<i>evm.model.LG09.135</i>	<i>PpWRKY44</i>	588	5.96	63 697.51	II b	9	细胞核
<i>evm.model.LG09.1507</i>	<i>PpWRKY45</i>	469	8.42	52 130.91	I a	9	细胞核
<i>evm.model.LG09.37</i>	<i>PpWRKY46</i>	497	7	54 874.39	I a	9	细胞核

2.2 富民枳 WRKY 家族蛋白的序列比对和系统发育分析

富民枳和拟南芥的 WRKY 蛋白序列构建系统发育树结果显示, 46 个 PpWRKY 蛋白分为 I、II、III 3 个组 (图 1)。其中, II 组的成员数量最多, 有 31 个, 可进一步分为 5 个亚组 (II a~II e), 依次含有 3、8、9、5 和 6 个 PpWRKY 成员; I 和 III 组分别含有 9 个和 6 个成员。富民枳 WRKY 结构域的多序列比对结果显示, I 组 9 个蛋白均是 C2H2 型锌指基序, 属于 Ia 亚组, 未在 PpWRKY 蛋白中发现含 C2HC 型锌指基序的 Ib 亚组成员 (图 2)。除了 II c 亚组的 PpWRKY15 和 PpWRKY21 蛋白在 WRKY 结构域的七肽序列上出现了单个氨基酸变异, PpWRKY15 中的 Q 被 K 替换, PpWRKY21 中的 R 被 K 替换, 其余 44 个 PpWRKY 基因家族成员均具有典型的 WRKY 结构域特征序列 WRKYGQK, 说明 PpWRKYs 基因家族保守性较强, 暗示该基因家族编码的蛋白质在生物体中承担着关键的生物学功能。

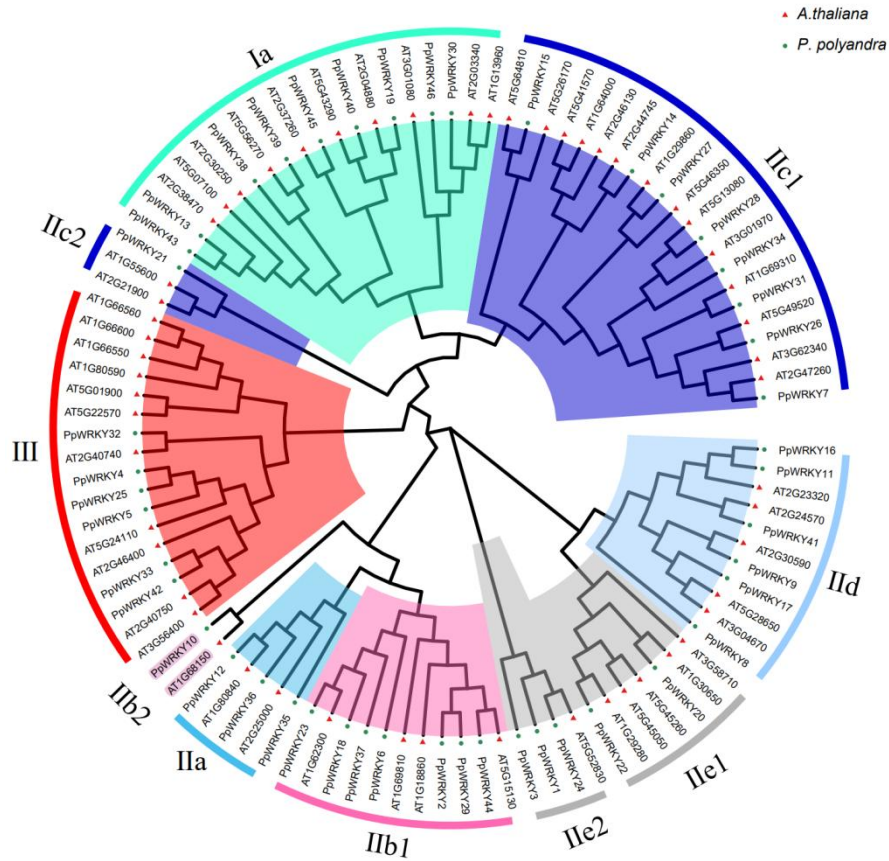
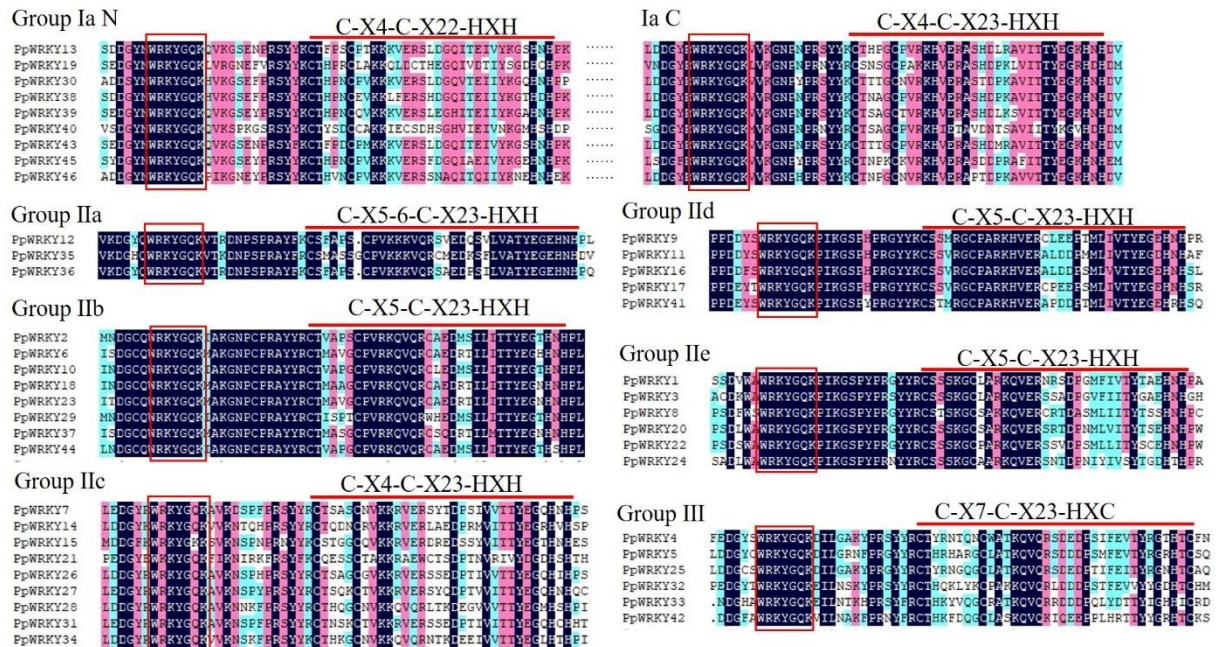


图 1 富民枳和拟南芥 WRKY 家族成员的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees of WRKY family members of *Poncirus polyandra* and *Arabidopsis thaliana*



红框标出了保守的七肽序列，红线则表示了锌指结构域。

The red box shows conserved heptapeptide sequences, and the red line shows zinc finger domains.

图 2 PpWRKYs 保守结构域多序列比对 (MSA)

Fig. 2 PpWRKYs conserved domain multiple sequence alignment (MSA)

2.3 染色体定位和共线性分析

染色体定位分析发现, 46 个富民枳的 *WRKY* 基因在 9 条染色体上的分布是不均匀的, 尤其是 1 号染色体, 上面聚集了最多的 *PpWRKY* 基因, 共有 9 个, 其次是 7 号染色体, 有 8 个, 4 号染色体分布的 *PpWRKY* 基因最少, 只有 1 个(图 3)。位于 1 号染色体的 *PpWRKY7* 和 *PpWRKY8*, 7 号染色体的 *PpWRKY30* 和 *PpWRKY31*, *PpWRKY32* 和 *PpWRKY33*, 8 号染色体的 *PpWRKY35* 和 *PpWRKY36* 为串联重复基因; *PpWRKY* 基因家族还存在 20 对片段复制基因, 如 *PpWRKY13* 和 *PpWRKY43*。为了探究 *PpWRKY* 基因在进化中是否经历自然选择, 将计算其片段复制的 *Ka/Ks* 比值进行分析, 结果显示, 在富民枳中发生片段复制的 *WRKY* 基因的 *Ka/Ks* 值均小于 1 (表 3), 说明这些基因经历了纯化选择作用。通过对富民枳和枳的 *WRKY* 基因进行共线性分析发现, 富民枳和枳有 88 对共线性基因(图 4)。

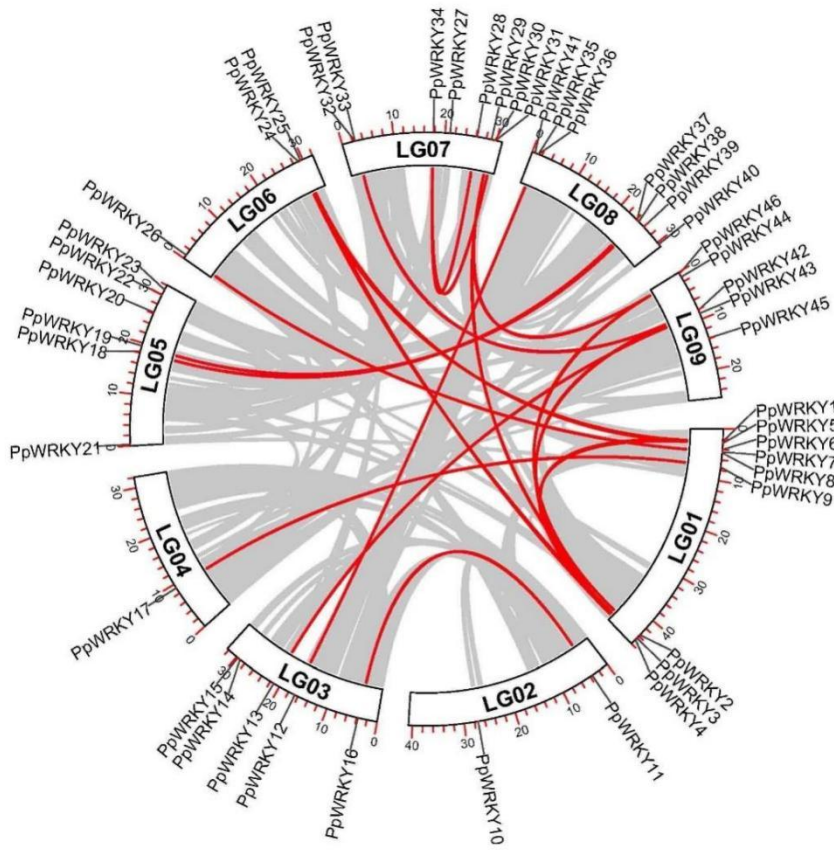


图 3 富民枳 *WRKY* 基因家族染色体定位和共线性分析

Fig. 3 Chromosome localization and collinearity analysis of *WRKY* gene family of *Poncirus polyandra*

表 3 富民枳 *WRKY* 基因家族进化选择压力分析

Table 3 Analysis of evolutionary selection pressure of *WRKY* gene family in *Poncirus polyandra*

基因对	非同义突变频率	同义突变频率	非同义突变频率/同义突变频率	有效长度
Gene Pair	Ka	Ks	Ka/Ks	EffectiveLen
<i>PpWRKY1-PpWRKY3</i>	0.472 743 091	1.693 329 527	0.279 179 618	891
<i>PpWRKY1-PpWRKY24</i>	0.544 214 695	1.705 310 132	0.319 129 456	936
<i>PpWRKY2-PpWRKY29</i>	0.381 015 57	1.484 446 351	0.256 671 836	1617
<i>PpWRKY2-PpWRKY44</i>	0.369 024 58	1.182 774 268	0.311 999 162	1641

<i>PpWRKY3-PpWRKY24</i>	0.552 613 297	3.330 629 746	0.165 918 562	843
<i>PpWRKY5-PpWRKY4</i>	0.413 011 094	2.339 242 867	0.176 557 595	972
<i>PpWRKY4-PpWRKY25</i>	0.394 458 768	2.249 854 199	0.175 326 369	969
<i>PpWRKY4-PWRKY42</i>	0.629 533 389	NaN	NaN	792
<i>PpWRKY5-PpWRKY25</i>	0.406 770 881	2.408 042 46	0.168 921 806	1014
<i>PpWRKY7-PpWRKY26</i>	0.351 616 092	2.180 353 963	0.161 265 601	915
<i>PpWRKY9-PpWRKY17</i>	0.301 116 399	2.806 189 938	0.107 304 354	987
<i>PpWRKY11-PpWRKY16</i>	0.353 671 882	1.528 342 258	0.231 408 822	1026
<i>PpWRKY12-PpWRKY35</i>	0.482 939 687	NaN	NaN	714
<i>PpWRKY13-PpWRKY43</i>	0.301 185 505	1.585 841 657	0.189 921 55	1569
<i>PpWRKY18-PpWRKY37</i>	0.394 549 307	2.173 707 703	0.181 509 826	1521
<i>PpWRKY19-PpWRKY38</i>	0.568 454 942	1.456 897 398	0.390 181 864	1257
<i>PpWRKY34-PpWRKY28</i>	0.332 928 003	1.911 064 164	0.174 210 793	456
<i>PpWRKY29-PpWRKY44</i>	0.442 097 469	1.709 517 499	0.258 609 502	1593
<i>PpWRKY34-PpWRKY31</i>	0.603 872 571	NaN	NaN	450
<i>PpWRKY33-PpWRKY42</i>	0.558 069 516	1.872 714 226	0.298 000 362	873

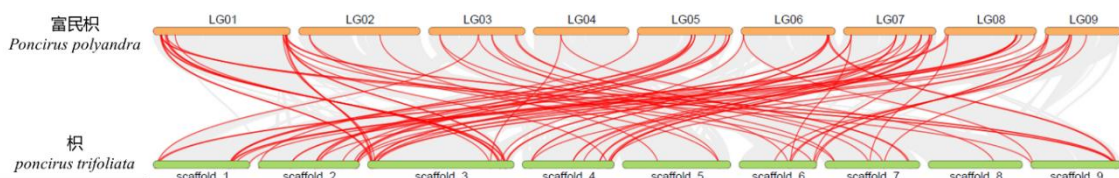


图 4 富民枳和枳 *WRKY* 基因家族的共线性分析

Fig. 4 Collinearity analysis of *WRKY* gene families of *Poncirus polyandra* and *Poncirus trifoliata*

2.4 *PpWRKY* 家族基因结构、保守基序及结构域分析

通过 MEME 软件对 46 个 *PpWRKY* 蛋白的 10 个保守基序进行分析发现，Motif 1 和 Motif 3 包括 *WRKY* 七肽结构域，Motif 2 和 Motif 10 是锌指基序，Motif 3 和 Motif 10 组成了 N 端 *WRKY* 结构域，Motif 1 和 Motif 2 组成了 C 端 *WRKY* 结构域（图 5）。46 个富民枳 *WRKY* 蛋白中都包含 Motif 1 和 Motif 2，而 Motif 3 只存在于 I a 亚组，说明 Motif 1 和 Motif 2 在 *PpWRKY* 蛋白中高度保守，可能具有重要的功能。不同组或亚组成员的基序组成有不同的特点。II a 亚组和 II b 亚组基序组成相似，都具有 Motif 1、Motif 2、Motif 5、Motif 6 和 Motif 8 五个基序，此外 II b 亚组还特有一个 Motif 9；II c 亚组成员除 *PpWRKY21* 只有 Motif 1 和 Motif 2 外，其余成员皆还有 Motif 4；II d、II e 亚组和 III 组成员基序组成较为相似，除了 *PpWRKY3*、*PpWRKY32* 和 *PpWRKY33* 缺失 Motif 7 外，其余成员都由 Motif 1、Motif 2 和 Motif 7 组成。这些结果反映了 *WRKY* 转录因子在富民枳进化过程中功能的多样性和保守性。

保守结构域分析显示，46 个 *PpWRKY* 蛋白中至少含有一个 *WRKY* 结构域，其中有 9 个 *PpWRKY* 蛋白还含有其他结构域，值得注意的是 II d 亚组的蛋白（*PpWRKY9*、*PpWRKY17*、*PpWRKY41*、*PpWRKY11* 和 *PpWRKY16*）都含有植物锌簇结构域（Plant_zn_clust）（图 5），但其功能尚不清楚。*PpWRKY* 家族基因结构分析显示，除 *PpWRKY23* 基因的外显子数量（20 个）较多外，其余 45 个 *PpWRKY* 基因的外显子数量为 2 个到 6 个不等。其中，I a、II a 和 II b 亚组 *WRKY* 基因的外显子数量为 4~6 个；II d、II e 亚组和 III 组 *WRKY* 基因的外显子数量均为 3 个；II c 亚组 *WRKY* 基因的外显子数量为 2~3 个，

其中含有 3 个外显子的基因占大部分。上述结果表明, *WRKY* 家族每个亚组的成员在基因结构上具有多样性和特异性。

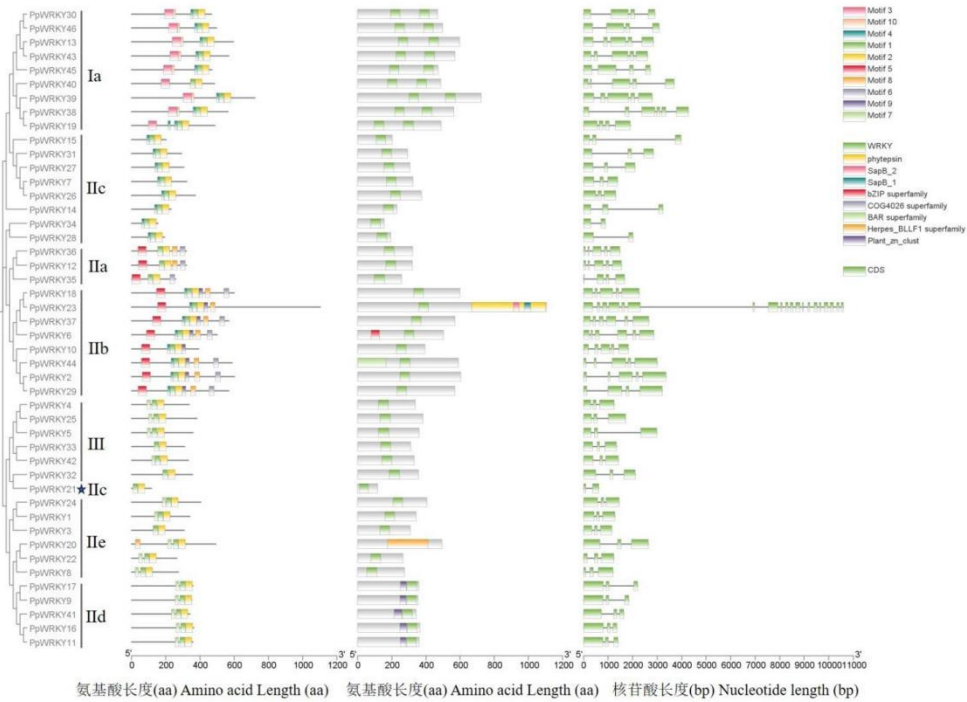


图 5 PpWRKYs 的保守基序、保守结构域和基因结构
Fig. 5 Conserved motif, conserved domain and gene structure of PpWRKYs

2.5 富民枳 *WRKY* 基因启动子顺式作用元件分析

对富民枳 *WRKY* 基因上游 2000 bp 的启动子区域顺式作用元件进行预测的结果显示, *PpWRKY* 启动子中存在 8 种与激素类和胁迫类响应相关的元件 (图 6)。其中, 37 个 *PpWRKY* 基因的启动子中含有 184 个茉莉酸甲酯响应元件 (TGACG-motif/CGTCA-motif); 21 个 *PpWRKY* 基因的启动子中有 24 个胁迫响应元件 (TC-rich repeats); 26 个 *PpWRKY* 基因含有 38 个干旱诱导元件 (MBS); 37 个 *PpWRKY* 基因含有 132 个脱落酸响应元件 (ABRE); 15 个 *PpWRKY* 基因含有 18 个水杨酸响应元件 (TCA-element); 17 个 *PpWRKY* 基因的启动子含有 25 个低温响应元件 (LTR)。推测 *PpWRKY* 基因在富民枳激素调控和逆境胁迫中发挥着重要作用。

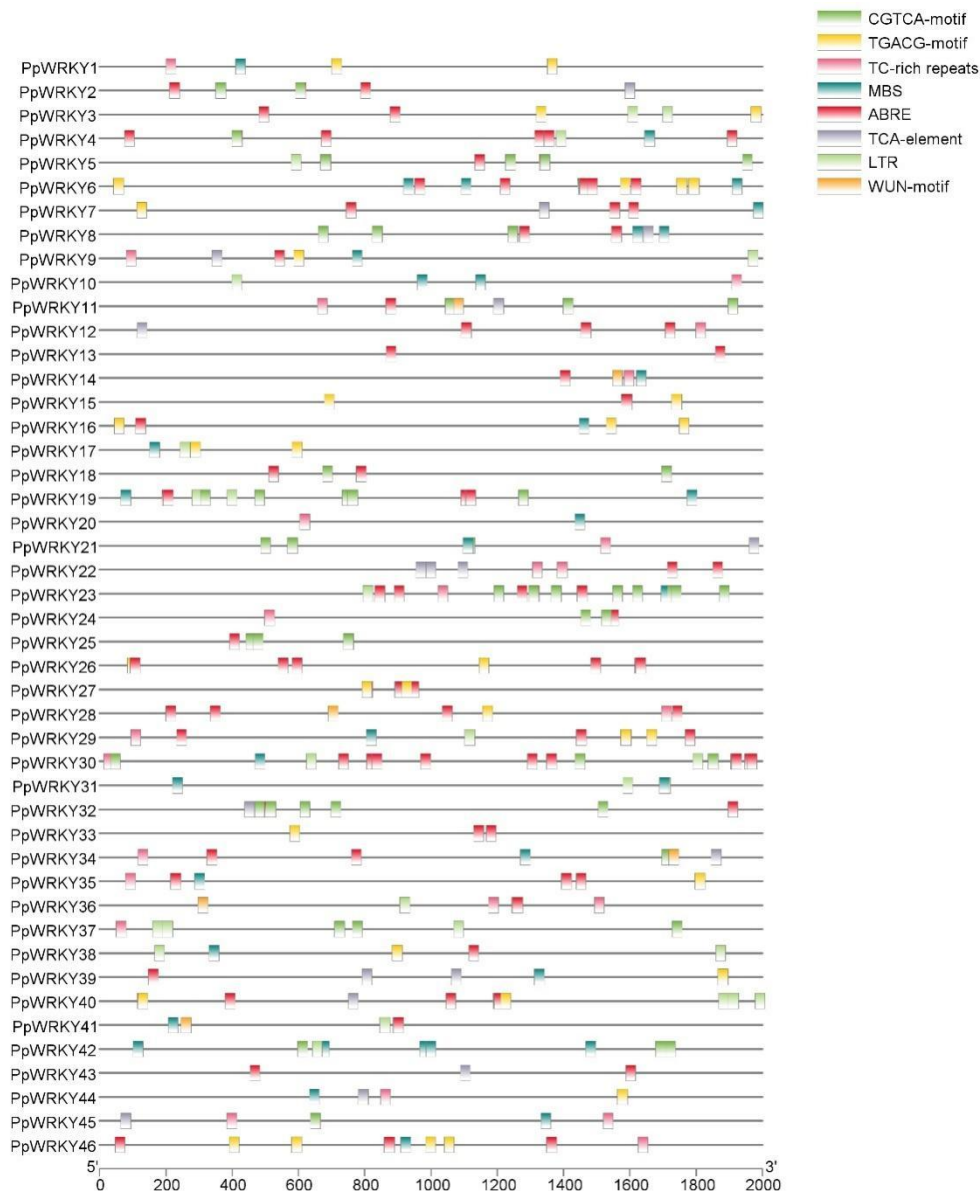


图 6 PpWRKYs 家族成员启动子区域顺式作用元件分析

Fig. 6 Analysis of cis-acting elements in promoter regions of PpWRKYs family members

2.6 富民积同源抗旱 WRKY 候选基因的鉴定

本研究在积中鉴定出 53 个 WRKY 基因后，对其在 PEG-6000 模拟干旱处理后 0 h、1.5 h、6 h 和 24 h 的表达情况进行分析。结果显示，53 个积的 WRKY 基因按照其对干旱胁迫的应答模式可分为 3 组，第 1 组为 *Ptrif.0001s2122.1* 等 8 个基因，表达量随着模拟干旱胁迫时间的延长逐渐下降；第 2 组为 *Ptrif.0006s0664.1* 等 8 个基因，在干旱处理前期（1.5 h）表达量上升，后期（24 h）表达量下降；第三组为 *Ptrif.0004s1310.1* 等 37 个基因，表达量随着干旱处理时间的延长而上升（图 7），表明这些 WRKY 基因在干旱胁迫中发挥重要作用。值得注意的是，*Ptrif.0001s0079.1*、*Ptrif.0002s1584.1*、*Ptrif.0002s3086.1*、*Ptrif.0003s3779.1*、*Ptrif.0004s1310.1*、*Ptrif.0004s1919.1*、*Ptrif.0004s2426.1*、*Ptrif.0007s1695.1* 和 *Ptrif.0007s1914.1* 基因表达水平较高且干旱处理后显著上调表达，表明这些基因在干旱胁迫中极为关键。将这 9 个基因编码的氨基酸序列比对到富民积基因组数据库，分别在富民积中搜索到同源基因

PpWRKY41、*PpWRKY19*、*PpWRKY23*、*PpWRKY8*、*PpWRKY27*、*PpWRKY28*、*PpWRKY30*、*PpWRKY12* 和 *PpWRKY13*，且同源性都在 95% 以上，推测这 9 个 *PpWRKY* 基因也受干旱诱导表达，可能参与富民枳对于干旱胁迫的防御反应。

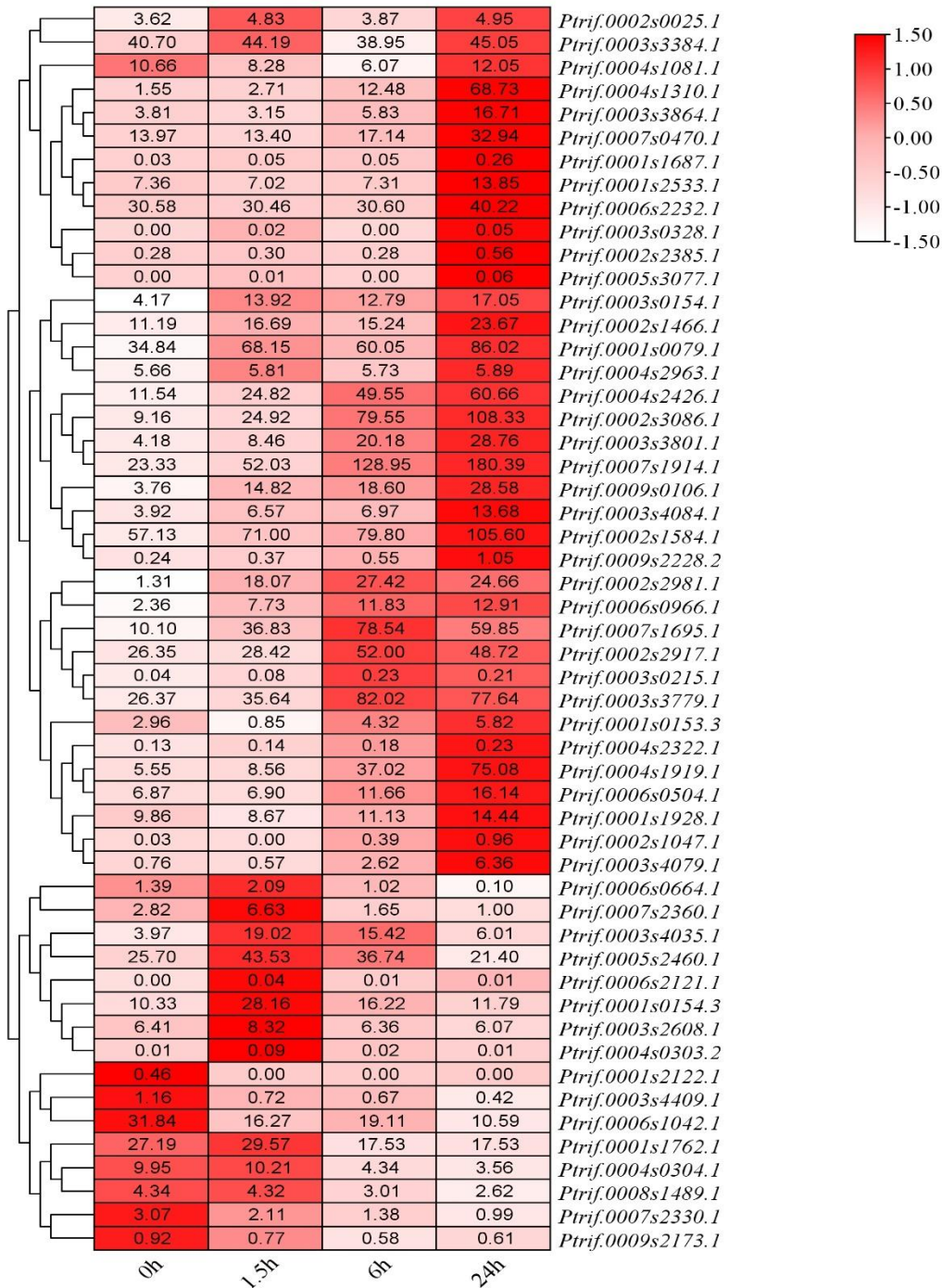


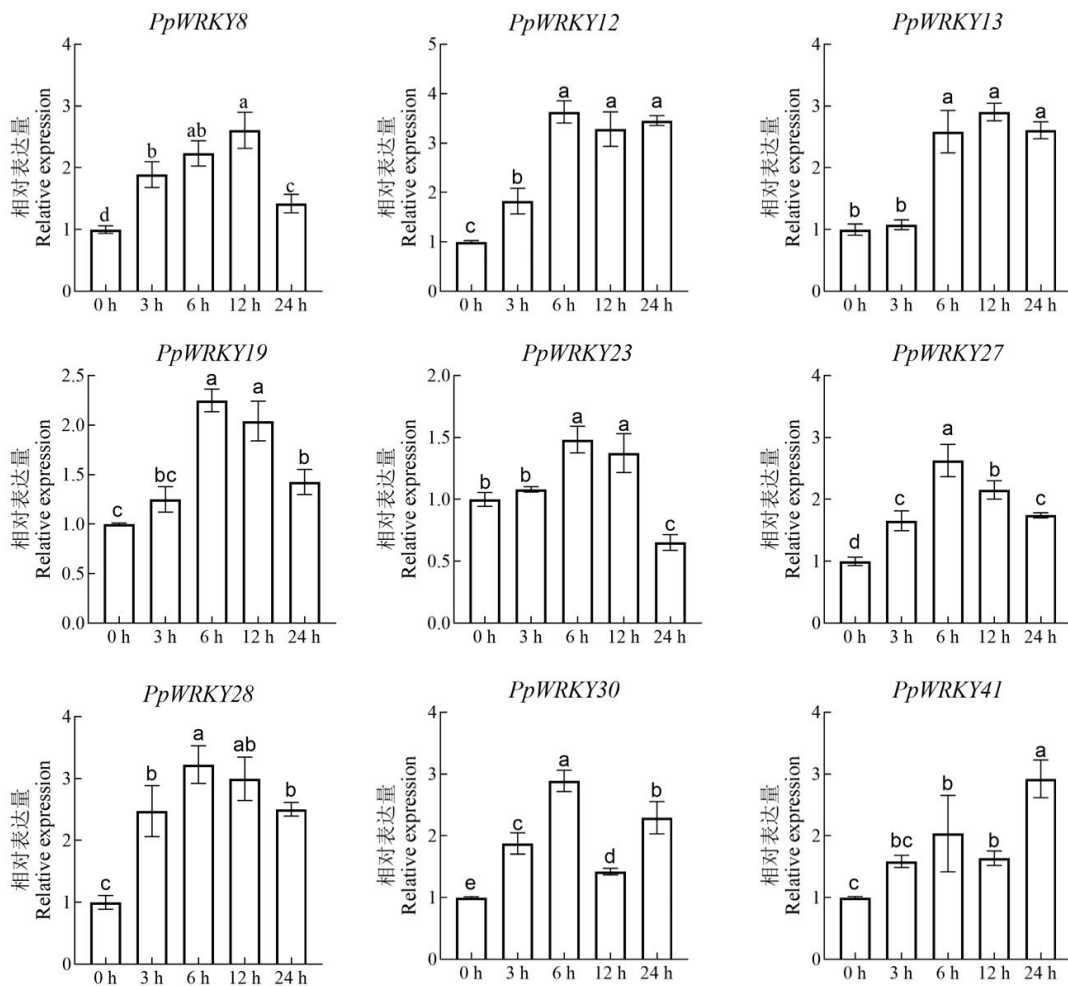
图 7 枳的 *WRKYs* 基因干旱胁迫下的表达模式

Fig. 7 Expression pattern of *WRKYs* gene in *Poncirus trifoliata* under drought stress

2.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 表达分析

为了进一步研究 *PpWRKY8*、*PpWRKY12*、*PpWRKY13*、*PpWRKY19*、*PpWRKY23*、*PpWRKY27*、*PpWRKY28*、*PpWRKY30* 和 *PpWRKY41* 基因在干旱胁迫下的表达特征，利用 20% 的 PEG-6000 模拟干旱

实验, 分别检测这 9 个基因在干旱胁迫处理后 0 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 的表达水平。结果显示, 与对照 (0 h) 相比, *PpWRKY8* 在干旱处理后 3 h 表达量开始显著上调, 在 12 h 后达到峰值, 为对照的 2.6 倍; *PpWRKY12*、*PpWRKY27*、*PpWRKY28* 和 *PpWRKY30* 在干旱处理后 3 h 表达量开始显著上调, 在 6 h 后达到峰值, 分别为对照的 3.63 倍、2.63 倍、3.22 倍和 2.89 倍; *PpWRKY19* 和 *PpWRKY23* 在干旱处理后 6 h 和 12 h 表达量显著上调, 其中在 6 h 时表达水平最高, 分别为对照的 2.25 倍和 1.48 倍; *PpWRKY13* 在干旱处理后 6 h 表达量开始显著上调, 并在 12 h 后达到峰值, 为对照的 2.9 倍; *PpWRKY41* 在干旱处理后 6 h 表达量开始显著上调, 在 24 h 后达到峰值, 为对照的 2.92 倍(图 8)。以上结果表明, *PpWRKY8*、*PpWRKY12*、*PpWRKY13*、*PpWRKY19*、*PpWRKY23*、*PpWRKY27*、*PpWRKY28*、*PpWRKY30*、和 *PpWRKY41* 基因均受干旱胁迫诱导表达, 进一步证明这 9 个 *WRKY* 基因可能参与富民枳对于干旱胁迫的防御反应。



小写字母表示不同处理时间在0.05水平上差异显著。

Lowercase letters indicate that the different processing times differ significantly at the level of 0.05.

图 8 *PpWRKYs* 基因在干旱胁迫下的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of *PpWRKYs* gene under drought stress

2.8 PpWRKY 蛋白互作网络预测

为了探索 PpWRKY 蛋白之间潜在的调控网络, 笔者利用 STRING 11.5 在线软件构建 46 个 PpWRKY 蛋白与调控植物耐旱性的 MYB 蛋白 (AtMYB15、AtMYB44 和 AtMYB96) 之间的蛋白质-蛋白质相互

作用网络。预测结果显示，共有 41 个 PpWRKY 蛋白相互作用，其中 AtWRKY40 (PpWRKY12, 36) 属于网络中的中心节点，与 17 个 AtWRKY 蛋白相互作用 (图 9)。AtWRKY33 (PpWRKY13, 43)、AtWRKY28 (PpWRKY27)、AtWRKY11 (PpWRKY41) 和 AtWRKY22 (PpWRKY3, 8) 等蛋白均至少与 8 个蛋白相互作用。此外，还预测到 AtWRKY22 (PpWRKY3, 8) 和 AtWRKY41 (PpWRKY4, 25) 与 AtMYB44 蛋白相互作用，AtWRKY46 (PpWRKY5) 和 AtWRKY48 (PpWRKY26) 与 AtMYB15 蛋白相互作用，而 AtWRKY33 (PpWRKY13, 43)、AtWRKY40 (PpWRKY12, 36) 和 AtWRKY70 (PpWRKY33, 42) 蛋白与 AtMYB44 和 AtMYB15 蛋白均可相互作用。上述结果表明，PpWRKY 蛋白在富民枳对于干旱胁迫的调控中发挥重要作用。

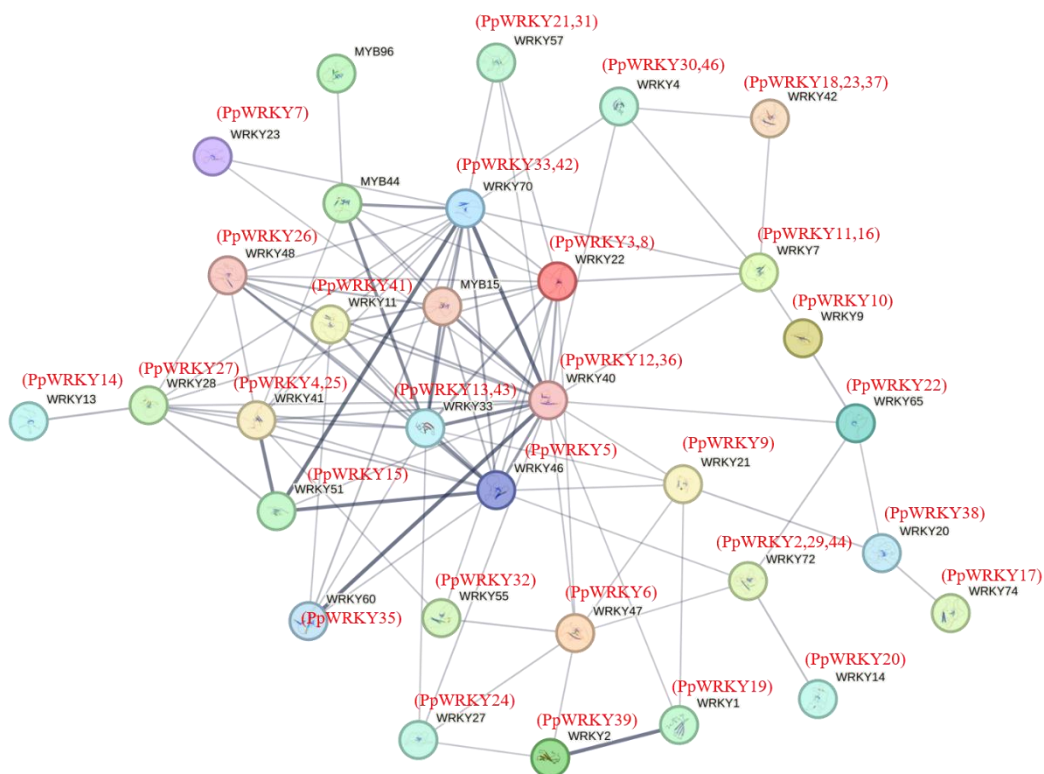


图 9 PpWRKYs 蛋白互作网络

Fig. 9 PpWRKYs protein interaction network

3 讨论

3.1 PpWRKY 基因家族的结构特征

WRKY 基因家族大小具有物种特异性，尤其是草本植物中的 WRKY 基因数量比木本植物高^[30]。例如，茶树中只有 50 个 WRKY 基因^[30]，而在假俭草中却有 92 个^[31]。本研究对象富民枳为落叶小乔木，共鉴定出 46 个 WRKY 基因家族成员，与黄连^[32] (41 个)、梔子^[33] (47 个) 及杜仲^[34] (51 个) 等木本植物中的 WRKY 基因数量差距不大，但与拟南芥^[6] (74 个)、水稻^[7] (98 个) 和大豆^[35] (188 个) 等草本植物相比，富民枳中的 WRKY 基因数量明显减少，此结果在一定程度上支持 Wu 等^[30]的观点。II 组 WRKY 转录因子在植物中的数量相对较多，且在进化上显示出较高的多样性，可使植物具有更强的环境适应性^[36]。本研究中富民枳的 46 个 PpWRKY 被分为 I、II 和 III 共 3 组，其中 II 组成员同样最多，

占比最大（67%），并可分为 5 个亚组，这有可能是富民枳抵抗干旱胁迫的重要原因。研究发现，短舌野生稻（*Oryza barthii* A.Chev.）、南方野生稻（*Oryza meridionalis* Ng）和普通野生稻（*Oryza rufipogon* Griff.）等植物的 WRKY 转录因子中都含有 I b 亚组成员^[37]，但富民枳中未鉴定到 I b 亚组的 WRKY 转录因子，推测富民枳的 WRKY 基因家族进化速度较为缓慢。

相同或相似的基序是维系蛋白质结构域进而发挥生物学功能的重要前提^[38]。富民枳 PpWRKY 蛋白同一亚组基序分布基本一致，而各组间存在差异。基因结构分析发现，各亚组的 WRKY 基因的外显子数量有所不同，但 II d、II e 亚组和 III 组 WRKY 基因的外显子数量是相同的，而 I a、II a 和 II b 亚组的外显子数量也较为相似。因此，推测这些外显子数量相同或相似的基因在功能上可能相同。WRKYGQK 序列的变异可能会导致 WRKY 转录因子与 DNA 结合能力的改变^[39]。保守结构域多序列比对分析发现，富民枳 46 个 WRKY 蛋白都含有完整的 WRKY 结构域，具备与 DNA 序列中的顺式作用元件 W-box 结合的能力。然而，PpWRKY 家族中 II c 亚组的 2 个蛋白的 WRKYGQK 七肽序列分别变异为 WRKYGKK（PpWRKY15）和 WKKYGQK（PpWRKY21），这两个基因与 DNA 结合的能力可能会发生变化。本研究中 PpWRKY 基因家族存在 4 对串联重复基因和 20 对片段复制基因，说明片段复制是富民枳 WRKY 基因家族的主要扩增方式，这与香樟和绿豆 WRKY 基因家族的扩增方式相似^[9-10]。 $Ka/Ks > 1$ 表示正选择， $Ka/Ks = 1$ 表示中性选择， $Ka/Ks < 1$ 表示纯化选择。富民枳 20 对片段复制基因的 Ka/Ks 比值均低于 1，证明这些基因在其进化历程中，可能借助纯化选择消除了有害的突变位点^[40]。

3.2 PpWRKY 基因家族的功能分析及表达特点

植物遭受干旱胁迫时会引起脱落酸（ABA）水平的增高^[41-42]。ABA 作为响应逆境胁迫的内源激素，在植物抵抗干旱胁迫中起到重要作用^[43]。ABA 依赖性途径是植物响应干旱胁迫的信号转导途径之一^[44]。在 ABA 依赖性途径中，启动子区存在 ABRE 的基因通常会被 ABA 诱导，从而调控植物对干旱胁迫的响应^[44]。在富民枳中，80.4%的 PpWRKY 基因启动子区含有 132 个 ABRE，说明大部分 PpWRKY 基因可能通过 ABA 依赖性途径参与干旱响应。启动子区含有干旱诱导元件（MBS）的基因可参与植物对干旱胁迫的响应^[45]。例如，启动子区含有 MBS 元件的 *AtMYC2* 基因，其表达受干旱和 ABA 的诱导，并且过表达 *AtMYC2* 的转基因植物对 ABA 具有更高的敏感性。在富民枳 WRKY 基因启动子区存在 38 个 MBS 元件，进而推测富民枳通过 MBS 元件响应干旱胁迫。

植物受到干旱胁迫时，WRKY 基因可被快速诱导表达，从而触发一个信号级联网络，最终增强植物的抗逆性^[46]。如玉米 *ZmWRKY40* 基因的表达会受干旱、盐害、高温和 ABA 诱导^[47]。甘蔗 *ScWRKY5* 基因能够被盐胁迫和干旱胁迫诱导表达^[48]。杜梨 *PbrWRKY53* 基因被干旱和 ABA 诱导大幅上调表达，并且在烟草和杜梨中过表达 *PbrWRKY53* 基因都能显著增强对干旱胁迫的抗性^[49]。本研究中，富民枳近缘种“枳”的大部分 WRKY 基因在干旱胁迫下表达量上调，表明这些 WRKY 基因在枳对干旱胁迫的响应中可能起到了正向调控的作用。虽然在本研究中富民枳未测干旱胁迫下的转录组数据，但枳与富民枳亲缘关系近^[22]，因此利用枳同源 WRKY 基因在干旱胁迫下的表达情况筛选富民枳的抗旱基因成为一种可能。PpWRKY12、PpWRKY13 和 PpWRKY23 分别与拟南芥中的 *AtWRKY40*（AT1G80840）、*AtWRKY33*（AT2G38470）和 *AtWRKY6*（AT1G62300）聚在一起。研究发现，*AtWRKY40* 在干旱胁迫下会被诱导

表达, 并且它能够通过调节植株的抗氧化能力和渗透调节能力来参与拟南芥对干旱胁迫的响应过程^[50]; *AtWRKY33* 受渗透胁迫和 ABA 诱导表达, 并参与调控包括干旱在内的多种逆境胁迫^[51]; *AtWRKY6* 的表达受到 ABA 的诱导, 并且其编码蛋白可通过直接抑制 *RAV1* 基因的表达来增强 ABA 信号转导途径中的关键基因 *ABI3*、*ABI4* 和 *ABI5* 的表达^[52]。因此, 推测富民枳中的 *PpWRKY12*、*PpWRKY13* 和 *PpWRKY23* 也具有响应干旱胁迫的功能。本研究发现 *PpWRKY12*、*PpWRKY13* 和 *PpWRKY23* 基因的启动子中均存在 ABA 响应元件, 其中, *PpWRKY12* 和 *PpWRKY23* 分别还含有胁迫响应元件和干旱诱导元件, 并且 qRT-PCR 实验证明这 3 个基因均受干旱胁迫诱导表达。这些结果说明 *PpWRKY12*、*PpWRKY13* 和 *PpWRKY23* 基因可参与富民枳抵御干旱胁迫的过程。此外, *PpWRKY8*、*PpWRKY19*、*PpWRKY27*、*PpWRKY28*、*PpWRKY30* 和 *PpWRKY41* 基因分别与拟南芥中的 *AtWRKY22*、*AtWRKY1*、*AtWRKY71*、*AtWRKY75*、*AtWRKY4* 和 *AtWRKY17* 基因的序列相似性较高, 但拟南芥的这 6 个基因在抗旱方面的研究未见报道。本研究发现 *PpWRKY8*、*PpWRKY19*、*PpWRKY27*、*PpWRKY28*、*PpWRKY30* 和 *PpWRKY41* 基因均含脱落酸响应元件, 除此以外, *PpWRKY8*、*PpWRKY19*、*PpWRKY30* 和 *PpWRKY41* 基因还存在干旱诱导元件, 而 *PpWRKY28* 基因还含有胁迫响应元件。因此, 推测这 6 个基因可能直接或间接被干旱诱导表达。为验证这 6 个基因是否能被干旱胁迫诱导, 本研究检测了它们在干旱胁迫处理后的表达水平, 结果发现这 6 个基因确实受干旱胁迫诱导表达, 且其中 *PpWRKY19*、*PpWRKY27*、*PpWRKY28* 和 *PpWRKY30* 基因在干旱处理 6 h 后表达量达到峰值, 说明这 4 个 *PpWRKY* 基因可能在干旱胁迫早期发挥关键作用。

3.3 PpWRKY 蛋白互作预测

蛋白互作预测有助于研究 PpWRKY 蛋白的调控机制和功能。*AtWRKY40* (PpWRKY12, 36) 属于网络中的中心节点, 与多个蛋白相互作用, 可能在富民枳生长发育及生物和非生物胁迫中发挥关键作用。先前研究发现, 拟南芥的 MYB44 和 MYB15 蛋白通过 ABA 信号可以促进气孔关闭, 提高植物对干旱的耐受性^[53]。本研究中, 蛋白互作预测发现 *AtWRKY22* (PpWRKY3, 8) 和 *AtWRKY41* (PpWRKY4, 25) 可与 *AtMYB44* 蛋白相互作用, *AtWRKY46* (PpWRKY5) 和 *AtWRKY48* (PpWRKY26) 可与 *AtMYB15* 蛋白相互作用, 而 *AtWRKY33* (PpWRKY13, 43)、*AtWRKY40* (PpWRKY12, 36) 和 *AtWRKY70* (PpWRKY33, 42) 蛋白与这两个 MYB 蛋白均可相互作用, 推测 PpWRKY3、PpWRKY4、PpWRKY5、PpWRKY8、PpWRKY12、PpWRKY13、PpWRKY25 和 PpWRKY26、PpWRKY33、PpWRKY36、PpWRKY42 和 PpWRKY43 可能与 MYB 蛋白互作, 从而通过 ABA 信号参与调控气孔运动来影响植物的耐旱性。*AtMYB96* 的过表达可以促进表皮蜡质生物合成上调, 从而提高拟南芥的耐旱性^[54]。*AtMYB96* 虽然未与 WRKY 蛋白直接互作, 但通过与 *AtMYB44* 互作, 间接参与 WRKY 蛋白对干旱的调控。综上所述, 本研究为进一步探索 WRKY 转录因子在富民枳中的抗旱机制提供理论依据。

4 结论

本研究从富民枳中鉴定到 46 个 WRKY 基因, 不均匀的分布在 9 条染色体上, 以片段复制作为基因家族扩张的主要方式。PpWRKY 基因家族可能与植物抵御逆境胁迫密切相关。qRT-PCR 实验证明 *PpWRKY8*、*PpWRKY12*、*PpWRKY13*、*PpWRKY19*、*PpWRKY23*、*PpWRKY27*、*PpWRKY28*、*PpWRKY30*

和 *PpWRKY41* 可能参与富民枳对干旱胁迫的响应。蛋白互作结果表明有 12 个 *PpWRKY* 蛋白可能通过 MYB 转录因子介导 ABA 信号参与调控气孔运动来影响植物的耐旱性。研究结果可为后续进行 *PpWRKY* 基因的抗旱功能和调控机制研究提供参考依据。

参考文献 References:

- [1] 杜超. WRKY 转录因子家族在植物响应逆境胁迫中的功能及应用[J]. 草业科学, 2021, 38(7): 1287-1300.
DU Chao. Function and application of the WRKY transcription factor superfamily in plant response to stresses[J]. Pratacultural Science, 2021, 38(7): 1287-1300.
- [2] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, SOMSSICH I E. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(5): 199-206.
- [3] WU K L, GUO Z J, WANG H H, LI J. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins[J]. DNA Research, 2005, 12(1): 9-26.
- [4] 阮孙美, 张攀, 张敏, 曾千春, 张慧, 罗琼. 疣粒野生稻 WRKY 基因家族全基因组鉴定和分析[J]. 植物遗传资源学报, 2024, 25(4): 629-646.
RUAN Sunmei, ZHANG Pan, ZHANG Min, ZENG Qianchun, ZHANG Hui, LUO Qiong. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of WRKY gene family in wild rice species, *Oryza granulata*[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2024, 25(4): 629-646.
- [5] 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, 1994, 244(6): 563-571.
- [6] EULGEM T, SOMSSICH I E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10(4): 366-371.
- [7] ROSS C A, LIU Y, SHEN Q J. The *WRKY* gene family in rice (*Oryza sativa*)[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2007, 49(6): 827-842.
- [8] GARRIDO-GALA J, HIGUERA J J, RODRÍGUEZ-FRANCO A, MUÑOZ-BLANCO J, AMIL-RUIZ F, CABALLERO J L. A comprehensive study of the WRKY transcription factor family in strawberry[J]. Plants, 2022, 11(12): 1585.
- [9] 倪辉, 孙维红, 丁乐, 曾伟伟, 邹双全. 香樟全基因组 WRKY 基因家族的鉴定与分析[J]. 植物科学学报, 2022, 40(4): 513-523.
NI Hui, SUN Weihong, DING Le, ZENG Weiwei, ZOU Shuangquan. Identification and analysis of the *WRKY* gene family in whole genome of *Cinnamomum camphora* (L.) Presl.[J]. Plant Science Journal, 2022, 40(4): 513-523.
- [10] 郝青婷, 高伟, 闫虎斌, 张泽燕, 朱慧珺, 王茜, 赵雪英, 张耀文. 绿豆 WRKY 基因家族的全基因组鉴定及生物信息学分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2023, 51(5): 59-71.
HAO Qingting, GAO Wei, YAN Hubin, ZHANG Zeyan, ZHU Huijun, WANG Qian, ZHAO Xueying, ZHANG Yaowen. Genome-wide identification and bio-informatics analysis of *WRKY* gene family in *Vigna radiata*[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2023, 51(5): 59-71.
- [11] 赵爽, 葛朝红, 石鹤飞, 闵卓, 王广鹏, 李伟明. 板栗 WRKY 基因家族鉴定及其在干旱胁迫下的表达分析[J]. 华北农学报, 2024, 39(1): 72-82.
ZHAO Shuang, GE Chaohong, SHI Hefei, MIN Zhuo, WANG Guangpeng, LI Weiming. Identification and expression analysis of the chestnut WRKY gene family under drought stress[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2024, 39(1): 72-82.
- [12] 欧阳梦真, 朱磊, 孙治强, 李胜利, 吴帼秀, 李阳, 何富豪, 李严曼. 西瓜 *CIWRKY54* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析[J]. 中国瓜菜, 2019, 32(12): 8-14.

- OUYANG Mengzhen, ZHU Lei, SUN Zhiqiang, LI Shengli, WU Guoxiu, LI Yang, HE Fuhao, LI Yanman. Cloning, subcellular localization and expression analysis of *ClWRKY54* in *Citrullus lanatus*[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2019, 32(12): 8-14.
- [13] SHAFFIQUE S, KHAN M A, IMRAN M, KANG S M, PARK Y S, WANI S H, LEE I J. Research progress in the field of microbial mitigation of drought stress in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 870626.
- [14] ZHANG J W, HUANG D Z, ZHAO X J, ZHANG M, WANG Q, HOU X Y, DI D L, SU B B, WANG S K, SUN P. Drought-responsive *WRKY* transcription factor genes *IgWRKY50* and *IgWRKY32* from *Iris germanica* enhance drought resistance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 983600.
- [15] CAI H Y, YANG S, YAN Y, XIAO Z L, CHENG J B, WU J, QIU A L, LAI Y, MOU S L, GUAN D Y, HUANG R H, HE S L. CaWRKY6 transcriptionally activates CaWRKY40, regulates *Ralstonia solanacearum* resistance, and confers high-temperature and high-humidity tolerance in pepper[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(11): 3163-3174.
- [16] QIAO Z, LI C L, ZHANG W. WRKY1 regulates stomatal movement in drought-stressed *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Molecular Biology, 2016, 91(1/2): 53-65.
- [17] QIU Y P, YU D Q. Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. Environmental and Experimental Botany, 2009, 65(1): 35-47.
- [18] NIU C F, WEI W, ZHOU Q Y, TIAN A G, HAO Y J, ZHANG W K, MA B, LIN Q, ZHANG Z B, ZHANG J S, CHEN S Y. Wheat WRKY genes TaWRKY2 and TaWRKY19 regulate abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. Plant, Cell & Environment, 2012, 35(6): 1156-1170.
- [19] CHEN W, ZHENG C, YAO M Z, CHEN L. The tea plant *CsWRKY26* promotes drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. Beverage Plant Research, 2021, 1: 3.
- [20] JIA H H, WANG C, WANG F, LIU S C, LI G L, GUO X Q. GhWRKY68 reduces resistance to salt and drought in transgenic *Nicotiana benthamiana*[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120646.
- [21] 张珊珊, 甘云浩, 杨文忠, 段宗亮, 丁红茜, 康红梅, 诺苏那玛. 富民枳种质资源的SSR遗传多样性研究[J]. 西部林业科学, 2018, 47(4): 14-20.
- ZHANG Shanshan, GAN Yunhao, YANG Wenzhong, DUAN Zongliang, DING Hongqian, KANG Hongmei, NUO Sunama. Genetic diversity of *Poncirus polyandra* resources[J]. Journal of West China Forestry Science, 2018, 47(4): 14-20.
- [22] 张余, 龚洵, 冯秀彦. 利用DNA片段测序方法探究枳属和富民枳的分类地位[J]. 广西植物, 2021, 41(1): 114-122.
- ZHANG Yu, GONG Xun, FENG Xiuyan. Phylogenetic position of *Poncirus* and *Poncirus polyandra* by DNA sequencing[J]. Guihaia, 2021, 41(1): 114-122.
- [23] 周开兵, 夏仁学. 中国柑橘砧木选择研究进展与展望[J]. 中国农学通报, 2005, 21(1): 213-218.
- ZHOU Kaibing, XIA Renxue. The proceedings and tendencies in the study on the choice of rootstocks for citrus in China[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(1): 213-218.
- [24] 吴玉, 陶晓宁, 袁河清, 易敏, 王辉, 杨利平. 基于4个核基因系统发育树分析华中枳和富民枳的分类地位[J]. 果树学报, 2024, 41(10): 1979-1989.
- WU Yu, TAO Xiaoning, YUAN Heqing, YI Min, WANG Hui, YANG Liping. Taxonomic status of *Citrus × pubinervia* and *Citrus × polytrifolia* based on the phylogenetic trees reconstructed by four nuclear genes[J]. Journal of Fruit Science, 2024, 41(10): 1979-1989.
- [25] PENG Z, BREDESON J V, WU G A, SHU S Q, RAWAT N, DU D L, PARAJULI S, YU Q B, YOU Q, ROKHSAR D S, Jr GMITTER F G, DENG Z N. A chromosome-scale reference genome of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) provides insights into disease resistance, cold tolerance and genome evolution in *Citrus*[J]. The Plant Journal, 2020, 104(5): 1215-1232.
- [26] YU X, REN Y L, LIU X F, JIANG D, ZHU S P, SHEN W X, ZHAO W T, ZHAO X C, CAO L. Whole transcriptome analysis of trifoliate orange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] under osmotic stress[J]. Scientia Horticulturae, 2023, 317: 112045.

- [27] ZHANG S S, CHEN J, ZHANG C G, ZHANG S Q, ZHANG X L, GAO L J, YANG W Z. Insights into identifying resistance genes for cold and disease stresses through chromosome-level reference genome analyses of *Poncirus polyandra*[J]. Genomics, 2023, 115(3): 110617.
- [28] YU G C. Using ggtree to visualize data on tree-like structures[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2020, 69(1): e96.
- [29] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [30] WU Z J, LI X H, LIU Z W, LI H, WANG Y X, ZHUANG J. Transcriptome-wide identification of *Camellia sinensis* WRKY transcription factors in response to temperature stress[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2016, 291(1): 255-269.
- [31] 于元平, 蒋宇佳, 孙向一, 吴春妍, 周敏, 刘明稀. 假俭草WRKY家族基因鉴定及其响应干旱胁迫表达分析[J]. 草地学报, 2024, 32(5): 1378-1391.
- YU Yuanping, JIANG Yujia, SUN Xiangyi, WU Chunyan, ZHOU Min, LIU Mingxi. Identification of the *WRKY* family genes and their expression analysis in response to drought stress in centipedegrass[J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(5): 1378-1391.
- [32] 刘微, 蒋莉萍, 池玉洁, 刘义飞, 陈士林, 刘迪. 黄连WRKY基因家族鉴定及表达分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(4): 1369-1380.
- LIU Wei, JIANG Liping, CHI Yujie, LIU Yifei, CHEN Shilin, LIU Di. Identification and expression analysis of WRKY gene family in *Coptis chinensis*[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2022, 24(4): 1369-1380.
- [33] 陈啸, 陈淑颖, 朱渊铭, 倪林, 邹双全. 梔子WRKY基因家族鉴定及其响应盐胁迫的表达模式[J]. 西南农业学报, 2024, 37(3): 503-512.
- CHEN Xiao, CHEN Shuying, ZHU Yuanming, NI Lin, ZOU Shuangquan. Identification of *WRKY* gene family in *Gardenia jasminoides* and its expression patterns in response to salt stress[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2024, 37(3): 503-512.
- [34] 庆军, 杜庆鑫, 朱利利, 何凤, 杜红岩. 杜仲全基因组WRKY转录因子基因家族鉴定及表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(增刊1): 2276-2289.
- QING Jun, DU Qingxin, ZHU Lili, HE Feng, DU Hongyan. Genome-wide identification and expression analysis of WRKY transcription factor family in *Eucommia ulmoides*[J]. Genomics and Applied Biology, 2021, 40(Suppl. 1): 2276-2289.
- [35] 陈林英, 李佳佳, 王博, 杜婉清, 高梦雪, 刘慧, 檀淑琴, 邱丽娟, 王晓波. WRKY转录因子在大豆响应生物和非生物胁迫中的功能研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(2): 323-332.
- CHEN Linying, LI Jiajia, WANG Bo, DU Wanqing, GAO Mengxue, LIU Hui, TAN Shuqin, QIU Lijuan, WANG Xiaobo. Research progress on the function of WRKY transcription factor response to biotic and abiotic stresses in soybean[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23(2): 323-332.
- [36] GOYAL P, DEVI R, VERMA B, HUSSAIN S, ARORA P, TABASSUM R, GUPTA S. WRKY transcription factors: evolution, regulation, and functional diversity in plants[J]. Protoplasma, 2023, 260(2): 331-348.
- [37] VILLACASTIN A J, ADAMS K S, BOONJUE R, RUSHTON P J, HAN M, SHEN J Q. Dynamic differential evolution schemes of WRKY transcription factors in domesticated and wild rice[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 14887.
- [38] 吴圳, 张明英, 闫锋, 李依民, 高静, 颜永刚, 张岗. 掌叶大黄 (*Rheum palmatum* L.) WRKY基因家族鉴定与分析[J]. 生物技术通报, 2024, 40(1): 250-261.
- WU Zhen, ZHANG Mingying, YAN Feng, LI Yimin, GAO Jing, YAN Yonggang, ZHANG Gang. Identification and analysis of WRKY gene family in *Rheum palmatum* L.[J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(1): 250-261.
- [39] CHEN F, HU Y, VANNOZZI A, WU K C, CAI H Y, QIN Y, MULLIS A, LIN Z G, ZHANG L S. The WRKY transcription factor family in model plants and crops[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2017, 36(5/6): 311-335.

- [40] 郭纯, 宋桂梅, 闫艳, 邸鹏, 王英平. 西洋参*bZIP*基因家族全基因组鉴定和表达分析[J]. 生物技术通报, 2024, 40(4): 167-178.
- GUO Chun, SONG Guimei, YAN Yan, DI Peng, WANG Yingping. Genome wide identification and expression analysis of the *bZIP* gene family in *Panax quinquefolius*[J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(4): 167-178.
- [41] ZHANG J H, JIA W S, YANG J C, ISMAIL A M. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses[J]. Field Crops Research, 2006, 97(1): 111-119.
- [42] LATA C R, PRASAD M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(14): 4731-4748.
- [43] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. Cell, 2016, 167(2): 313-324.
- [44] 王冰, 程宪国. 干旱、高盐及低温胁迫下植物生理及转录因子的应答调控[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(6): 1565-1574.
- WANG Bing, CHENG Xianguo. Physiological responses and regulatory pathways of transcription factors in plants under drought, high-salt, and low temperature stresses[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2017, 23(6): 1565-1574.
- [45] ABE H, URAO T, ITO T, SEKI M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. *Arabidopsis* AtMYC₂ (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling[J]. The Plant Cell, 2003, 15(1): 63-78.
- [46] JIANG J J, MA S H, YE N H, JIANG M, CAO J S, ZHANG J H. WRKY transcription factors in plant responses to stresses[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2017, 59(2): 86-101.
- [47] WANG C T, RU J N, LIU Y W, YANG J F, LI M, XU Z S, FU J D. The maize WRKY transcription factor ZmWRKY40 confers drought resistance in transgenic *Arabidopsis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(9): 2580.
- [48] WANG D J, WANG L, SU W H, REN Y J, YOU C H, ZHANG C, QUE Y X, SU Y C. A class III WRKY transcription factor in sugarcane was involved in biotic and abiotic stress responses[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 20964.
- [49] LIU Y, YANG T Y, LIN Z K, GU B J, XING C H, ZHAO L Y, DONG H Z, GAO J Z, XIE Z H, ZHANG S L, HUANG X S. A WRKY transcription factor PbrWRKY53 from *Pyrus betulaefolia* is involved in drought tolerance and AsA accumulation[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(9): 1770-1787.
- [50] 车永梅, 孙艳君, 卢松冲, 赵方贵, 侯丽霞, 刘新. AtWRKY40参与拟南芥干旱胁迫响应过程[J]. 植物生理学报, 2018, 54(3): 456-464.
- CHE Yongmei, SUN Yanjun, LU Songchong, ZHAO Fanggui, HOU Lixia, LIU Xin. AtWRKY40 functions in drought stress response in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiology Journal, 2018, 54(3): 456-464.
- [51] CHEN Y H, ZHANG J. Multiple functions and regulatory networks of WRKY33 and its orthologs[J]. Gene, 2024, 931: 148899.
- [52] HUANG Y, FENG C Z, YE Q, WU W H, CHEN Y F. *Arabidopsis* WRKY6 transcription factor acts as a positive regulator of abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development[J]. PLoS Genetics, 2016, 12(2): e1005833.
- [53] WANG X P, NIU Y L, ZHENG Y. Multiple functions of MYB transcription factors in abiotic stress responses[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 6125.
- [54] LEE S B, KIM H, KIM R J, SUH M C. Overexpression of *Arabidopsis* MYB96 confers drought resistance in *Camelina sativa* via cuticular wax accumulation[J]. Plant Cell Reports, 2014, 33(9): 1535-1546.