

沈 丹, 杨 莉, 胡 威, 等. 柑橘胁迫响应基因 *WRKY47* 的克隆与表达分析[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(1): 129-138.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.01.017

柑橘胁迫响应基因 *WRKY47* 的克隆与表达分析

沈 丹, 杨 莉, 胡 威, 匡柳青, 郭文芳, 卢 婷, 刘德春, 刘 勇
(江西农业大学农学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 以柠檬[*Citrus limon* (L.) Burm.f.]、甜橙[*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]、芦柑(*Citrus reticulata* Blanco)、金柑[*Fortunella japonica* (Thunb.) Swingle]为试验材料, 基于甜橙基因组数据库中的甜橙基因碱基序列, 利用 RT-PCR 方法克隆获得 4 个 *WRKY* 家族基因 *ClWRKY47*、*CsWRKY47*、*CrWRKY47* 和 *FjWRKY47* 的 cDNA 全长碱基序列。序列分析结果表明, 这 4 个基因的 cDNA 全长都是 1 567 bp, 开放阅读框为 1 506 bp, 编码 501 个氨基酸。氨基酸序列和结构分析结果显示, 这 4 个基因编码的蛋白质属于 Group IIa+IIb 类 *WRKY* 蛋白。进化树分析结果显示, 所克隆的 4 个柑橘 *WRKY* 蛋白与克莱门柚 *WRKY47* 蛋白的亲缘关系最近。对 *CsWRKY47* 启动子顺式作用元件预测分析, 发现 *CsWRKY47* 启动子包含脱落酸响应元件(ABRE)、茉莉酸甲酯响应元件(CGTCA-motif)、抗氧化响应元件(ARE)、参与干旱诱导的 MYB 结合位点(MBS)等多个与胁迫相关的顺式作用元件。实时荧光定量表达分析结果表明, 柠檬 *ClWRKY47* 和甜橙 *CsWRKY47* 能被高盐、干旱、低温胁迫诱导表达; 芦柑 *CrWRKY47* 在干旱和低温胁迫下诱导表达, 高盐胁迫下表达量下调; 金柑 *FjWRKY47* 在高盐胁迫下诱导表达, 干旱和低温胁迫下下调表达。为进一步开展柑橘胁迫相关基因 *WRKY47* 的功能鉴定奠定了基础。

关键词: 柑橘; *WRKY*; 非生物胁迫; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021)01-0129-10

Cloning and expression analysis of stress response gene *WRKY47* in citrus

SHEN Dan, YANG Li, HU Wei, KUANG Liu-qing, GUO Wen-fang, LU Ting, LIU De-chun, LIU Yong
(College of Agriculture, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Based on the *Citrus sinensis* gene base sequences contained in the sweet orange genome database, the cDNAs sequences of four *WRKY* family genes *ClWRKY47*, *CsWRKY47*, *CrWRKY47* and *FjWRKY47* were cloned from lemon [*Citrus limon* (L.) Burm.f.], sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) and kumquat [*Fortunella japonica* (Thunb.) Swingle] by RT-PCR, respectively. The results of sequence analysis showed that the cDNA of these four genes were 1 567 bp in length, the open reading frame (ORF) was 1 506 bp, and 501 amino acids were encoded. The results of amino acid sequence and structure analysis demonstrated that the proteins encoded by these

收稿日期: 2020-10-13

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD1000100); 国家自然科学基金项目(31701896); 江西省自然科学基金面上项目(20202BAB205001); 江西省柑橘产业技术体系项目(JX-ARS-07-栽培岗位)

作者简介: 沈 丹(1996-), 女, 江苏溧阳人, 硕士研究生, 研究方向为果树抗逆生理。(E-mail) sd17751769221@163.com

通讯作者: 刘德春, (E-mail) ldc873380800@163.com; 刘 勇, (E-mail) liuyongjxau@163.com

four genes belonged to the Group IIa+IIb *WRKY* protein. Phylogenetic tree analysis results indicated that the four citrus *WRKY* proteins were closely related to the *Citrus clementine* *WRKY47* protein. Predictive cis-acting element analysis of *CsWRKY47* promoter revealed that *CsWRKY47* promoter contained abscisic acid response element (ABRE), methyljasmonic acid response element (CGTCA-motif), anaerobic response element (ARE), MYB binding site involved in drought-response (MBS) and

many other stress-related cis-acting elements. Real-time fluorescence quantitative PCR analysis suggested that the expression levels of *ClWRKY47* and *CsWRKY47* were induced by drought, low temperature and high salt. Besides, the expression of *CrWRKY47* was induced under drought and low temperature stress, but suppressed under high salt stress. However, the expression level of *FjWRKY47* was upregulated under high salt stress and suppressed under drought and low temperature stress. These results lay a foundation for further functional identification of the stress-related gene *WRKY47* in citrus.

Key words: citrus; *WRKY*; abiotic stress; gene cloning; expression analysis

植物的生长发育过程很大程度上受环境的影响,其中非生物胁迫主要为干旱、高盐以及低温。在非生物胁迫信号的感知以及生理和生化反应上,植物自身已经进化出应对胁迫的各种复杂的响应机制。简单的说,植物可以通过一系列胁迫信号转导和调控相关基因来响应非生物胁迫^[1-2]。这些非生物胁迫响应基因按功能可以分为两大类,即调控型基因和功能型基因。调控基因编码的转录因子(TFs)可以转导胁迫信号并调控功能基因的表达,而这些功能基因在减轻植物遭受胁迫带来的损害中起着直接作用^[3]。

研究发现, bZIP、WRKY、NAC、AP2/ERF 和 MYB 等转录因子家族都与植物响应逆境的过程相关^[4]。WRKY 是植物中最重要的转录因子家族之一。该家族蛋白质包含 1 到 2 个由约 60 个氨基酸组成的高度保守的 WRKY DNA 结合结构域,还含有 C₂H₂ 或 C₂HC 锌指结构,可与 DNA 序列 W-box (TTGACC/T) 结合,调控下游基因表达^[2]。自 1994 年首次在甜薯中克隆出 1 个 WRKY 家族转录因子基因 *SPF1* 之后^[5],又陆续在高等植物以及低等植物(如苔藓)中克隆出多个 WRKY 家族基因^[6]。在克隆出来的植物 WRKY 家族基因中,已有许多被验证能够响应非生物胁迫,并在这个过程中发挥调控作用^[7]。如 Qiu 等^[8]利用 Northern blotting 技术,对克隆获得的 13 个水稻 WRKY 基因进行分析,发现在这 13 个水稻 WRKY 基因中有 10 个基因能够被非生物胁迫(高盐、高温、干旱和低温)诱导表达。Jiang 等^[9]通过芯片谱分析法对高盐处理后的拟南芥根系进行分析,发现有 18 个 WRKY 家族基因能够被高盐处理诱导表达。同时,单个 WRKY 家族基因可以被多种非生物胁迫诱导表达。例如樱桃砧木 *PcWRKY1* 基因在渗透胁迫和高盐胁迫下均能被诱导表达^[10];芍药 *PLWRKY13* 可以被低温、高温、干旱和盐胁迫同时诱导表达,并且正向调节牡丹中番茄红素的产生^[11]。拟南芥 *AtWRKY47* 基因可以被晒

胁迫、镉胁迫诱导表达,并且 *AtWRKY47* 功能缺失型突变体对晒胁迫表现更敏感,但是对镉胁迫更耐受,其过表达植株也对镉胁迫表现出高度耐受^[12-13]。前人研究结果表明,水稻 *OsWRKY47* 功能缺失型突变体对干旱胁迫敏感并且产量下降,而 *OsWRKY47* 过表达植株对干旱胁迫更耐受,说明 *OsWRKY47* 基因是干旱胁迫响应的正调控因子^[14]。

柑橘是世界上最重要的水果种类之一,中国柑橘种植面积和产量一直在不断增长,但其产业发展一直受到非生物胁迫的影响和制约。目前,柑橘中的 WRKY 基因研究还不多,对柑橘 WRKY47 基因的研究未见报道。因此,本研究从柠檬、甜橙、金柑、芦柑 4 个不同柑橘种类中克隆得到 WRKY47 基因,对克隆出的基因的碱基序列及其编码蛋白质进行生物信息学分析,并使用实时荧光定量 PCR 分析这 4 个基因在非生物胁迫(高盐、干旱和低温)下的时空表达模式差异,以期柑橘抗逆分子育种提供候选基因资源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及材料的处理

将柠檬[*Citrus limon* (L.) Burm.f.]、甜橙[*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]、芦柑(*Citrus reticulata* Blanco)、金柑[*Fortunella japonica* (Thunb.) Swingle]种子消毒催芽后分别播种于 MS 固体培养基中,置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 28 d 左右,再转移至 Hoagland 培养液中预培养 2~3 d,然后进行胁迫处理。高盐、干旱处理时将 4 种幼苗分别转移至含有 250 mmol/L NaCl、20% PEG-6000 的 Hoagland 液体培养基中常温培养。低温处理时幼苗转移到干净的 Hoagland 液体培养基中并置于 4 ℃ 培养箱中培养。每种材料取 18~24 个植株进行胁迫处理,然后分别于处理 0 h(CK)、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 时取其叶片, -80 ℃ 储存,备用。

1.2 叶片总 RNA 提取及反转录

柠檬、甜橙、芦柑、金柑叶片总 RNA 提取方法

采用 Trizol 法。RNA 含量用超微量分光光度计检测, RNA 提取质量用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。用日本 TOYOBO 公司生产的 ReverTra Ace- α -TM 试剂盒将提取的总 RNA 反转录成 cDNA, 存放于 -20°C , 备用。

1.3 *CIWRKY47*、*CsWRKY47*、*CrWRKY47* 和 *FjWRKY47* 基因克隆

由华中农业大学构建的甜橙基因组数据库中含有大量甜橙基因序列, 通过序列搜索和拼接获得包含完整开放阅读框(ORF)的 *CsWRKY47* 转录因子基因序列。基于该序列用 Primer Premier5.0 软件设计了 1 对基因特异性引物 *CsWRKY47*-F 和 *CsWRKY47*-R(表 1)。以获得的 4 个物种的叶片 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得 *CIWRKY47*、*CsWRKY47*、*CrWRKY47*、*FjWRKY47* 基因碱基序列全长。PCR 扩增程序参考郭文芳^[15]的方法, 退火温度 56°C 30 s。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 切胶回收后的 PCR 目的片段用 DNA 回收试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司产品]回收并纯化, 然后与 pMD18-T 载体连接[宝日医生物技术(北京)有限公司产品]并转化到大肠杆菌中, 菌液 PCR 鉴定为阳性克隆后送上海生物工程有限公司测序。

1.4 生物信息学分析

利用 NCBI 中的 ORF Finder 工具对测序获得的 *CIWRKY47*、*CsWRKY47*、*CrWRKY47*、*FjWRKY47* 基因的 cDNA 碱基序列进行分析, 确定这 4 个基因的开放阅读框和所编码的氨基酸序列, 并对其碱基序列进行比对; 利用 ExPASy ProtParam 在线分析工具对蛋白质氨基酸序列及理化性质进行分析; 使用 DNAMAN 软件进行蛋白质一致性分析和不同植物蛋白质间的多序列比对分析; 利用 InterProScan 在线软件分析蛋白质结构功能域; 采用 MEGA5 软件构建 4 种蛋白质与其他植物蛋白质间的系统进化树; 通过 PlantCARE 在线网站进行基因的启动子顺式作用元件预测分析; 采用 TMpred 预测基因编码蛋白质的跨膜结构; 通过 ProtScale 在线软件预测蛋白质亲疏水性; 采用在线软件 PSORT II 对蛋白质进行亚细胞定位分析; 利用 SOPMA 软件预测蛋白质的二级结构并用 SWISS-MODEL 软件进行蛋白质三级结构预测建模。

1.5 实时荧光定量 PCR

采用 Primer Premier 5.0 设计 *CsWRKY47* 基因

的实时定量引物 *CsWRKY47*-Fq 和 *CsWRKY47*-Rq, 内参基因为柑橘 *CsActin* 基因(表 1)。非生物胁迫处理后 4 个物种 *WRKY47* 基因的表达量在 BIO-RAD CFX9 6 荧光定量 PCR 仪上进行检测。qRT-PCR 反应体系的总体积为 20.0 μl ; 10.0 μl 荧光染料[宝日医生物技术(北京)有限公司产品]、8.0 μl ddH₂O、1.0 μl F/R 引物、1.0 μl 总 cDNA。qRT-PCR 反应程序参照文献[15]。每处理样品设 3 次重复。相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。

表 1 试验中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>CsWRKY47</i> -F	CTACTACTACTCTTTTCGTTGGT
<i>CsWRKY47</i> -R	TATATATTATGCATAGCGTAGG
<i>CsWRKY47</i> -Fq	GCAATGCAAAAAGTGGCAC
<i>CsWRKY47</i> -Rq	TGATCCAACATGTTTCTCA
<i>CsActin</i> -F	AGAACTATGAAGTGCCTGATGGC
<i>CsActin</i> -R	GCTTGGAGCAAGTGTGTGATT

2 结果与分析

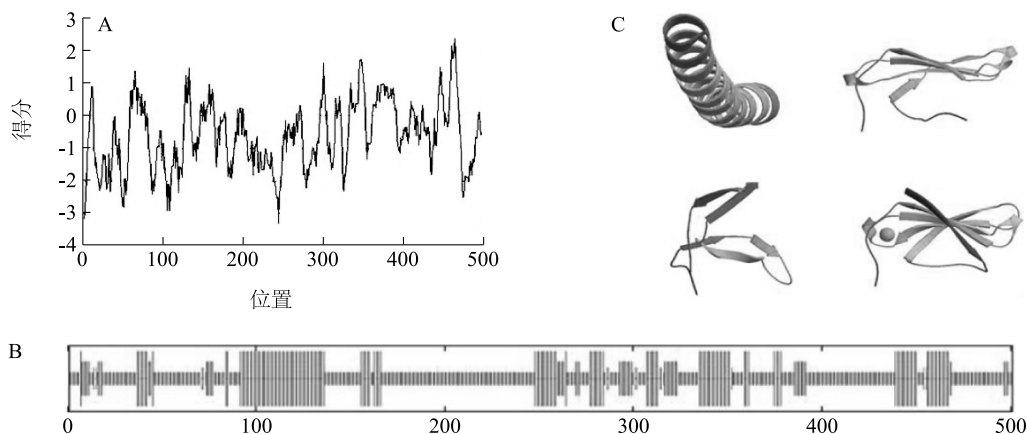
2.1 *CsWRKY47* 的克隆与分析

以甜橙为材料, 通过 RT-PCR 扩增克隆获得 *CsWRKY47* 基因碱基序列。测序和生物信息学分析结果显示, 该基因 cDNA 碱基序列全长 1 567 bp, 开放阅读框(ORF)为 1 506 bp, 编码 501 个氨基酸。ExPASy ProtParam 在线分析结果显示, *CsWRKY47* 蛋白分子式为 $\text{C}_{2\,327}\text{H}_{3\,727}\text{N}_{699}\text{O}_{757}\text{S}_{25}$, 其氨基酸组成有 20 种, 理论等电点(*PI*)为 8.58, *PI* 值大于 7 说明该蛋白质可能为碱性蛋白质; 预测相对分子质量约为 54 410, 脂肪系数为 64.93, 不稳定指数为 49.48, 总平均亲水性为 -0.637, 一般总平均亲水性的值小于 0 为亲水蛋白质, 因此推测该蛋白质属于弱稳定性亲水蛋白质。通过 ProtScale 在线软件预测 *CsWRKY47* 蛋白亲疏水性, 进一步证明其为亲水性蛋白质(图 1A)。

采用 TMpred 预测蛋白质跨膜结构, 结果显示, *CsWRKY47* 蛋白 *N* 端 343~363、376~396、461~480 这 3 个位点处具有跨膜结构。PSORT II 在线软件预测结果表明, *CsWRKY47* 蛋白亚细胞定位于细胞核上的可能性最高。利用 SOPMA 软件预测

CsWRKY47 蛋白的二级结构,结果显示,该蛋白质具有 27.94% α -螺旋、8.18% 延伸链、2.59% β -折叠以及 61.28% 无规则卷曲(图 1B)。使用 SWISS-MODEL 搜索并获得 CsWRKY47 蛋白同源模型,推

测出该蛋白质可能的 4 个三级结构模型(图 1C)。通过 NetPhos 2.0 Serve 预测 CsWRKY47 蛋白磷酸化位点,结果表明,CsWRKY47 蛋白含有 26 个丝氨酸(Ser)以及 2 个苏氨酸(Thr)磷酸化位点。



A: 亲疏水性分析; B: 二级结构预测; C: 三级结构预测模型。

图 1 CsWRKY47 蛋白分析

Fig.1 Analysis of CsWRKY47 protein

2.2 CsWRKY47 基因启动子序列预测分析

将从甜橙基因组数据库获取的 CsWRKY47 基因起始密码子 ATG 上游 1 500 bp 的 DNA 碱基序列作为该基因的启动子序列,并通过 PlantCARE 在线分析网站对该基因启动子序列进行顺式作用元件预测分析,分析结果(表 2)显示,CsWRKY47 基因启动子除了含有 16 个 CAAT-box 和 30 个 TATA-box 2 种基本的顺式作用元件外,还含有多个光响应元件,如 G-Box、Sp1、TCCC-motif 等;另外在 DNA 双链上分别有 1 个 WRKY 结构域专一结合的 W-box 元件,同时还包含多个与胁迫相关的顺式作用元件,如 8 个脱落酸响应元件(ABRE)、4 个茉莉酸甲酯响应元件(CGTCA-motif)、1 个赤霉素响应元件(TATC-box)、1 个抗氧化响应元件(ARE)、4 个参与干旱诱导的 MYB 结合位点(MBS)等。

2.3 不同种类柑橘 WRKY47 蛋白的同源性及进化分析

为了解不同种类柑橘中 WRKY47 蛋白的差异和功能,通过 RT-PCR 扩增,分别从柠檬、芦柑、金柑 3 个柑橘种类中克隆出 WRKY47 基因,并分别命名为 ClWRKY47、CrWRKY47 和 FjWRKY47。测序结果表明,这 3 个基因的碱基序列与 CsWRKY47 的 cDNA 碱基序列长度一致,均为 1 567 bp,生物信息学分析

发现开放阅读框为 1 506 bp 并且编码 501 个氨基酸;对 4 个基因的碱基序列进行比对发现,这 4 个基因 cDNA 碱基序列有 16 个碱基存在差异,相似性达 99.68%(图 2)。

通过 NCBI 数据库将 ClWRKY47、CsWRKY47、CrWRKY47、FjWRKY47 的碱基序列翻译成氨基酸序列,并用 DNAMAN 对这 4 条氨基酸序列进行比对,结果显示,这 4 条氨基酸序列有 7 个位点存在差异,序列一致性达 99.55%。进一步通过与其他植物 WRKY47 蛋白进行多序列比对分析(图 3)发现,这 4 个蛋白质在 N 端 267~333 位点都含有 1 个高度保守的 WRKY 结构域,并且在该结构域的 N 末端有 1 个 WRKYGQK 保守氨基酸序列和 1 个 C 端锌指结构基序 C₂H₂(CX₄₋₅CX₂₂₋₂₃HX₁H),说明这 4 个蛋白质都属于 WRKY 转录因子家族的 Group IIa+IIb 类。

为了验证 ClWRKY47、CsWRKY47、CrWRKY47 和 FjWRKY47 的蛋白质进化关系,使用 MEGA 6.0 软件中的最大似然法构建系统进化树,结果(图 4)显示,这 4 个新蛋白质与克莱门柚 WRKY47(XP_006444621.1)蛋白亲缘关系最近,并且都聚集在同一分支上,与龙眼 WRKY47(AE031517.2)蛋白亲缘关系较近,与葡萄 WRKY47(XP_002281194.1)蛋白亲缘关系最远。

表 2 PlantCARE 预测 *CsWRKY47* 启动子区顺式作用元件Table 2 Cis-acting regulatory elements in promoter of *CsWRKY47* predicted by PlantCARE

顺式元件	数目 (+/-)	序列	特性
ABRE	4/4	ACGTG	脱落酸响应元件
ARE	1/0	AAACCA	抗氧化响应元件
Box 4	1/0	ATTAAT	涉及光响应性的保守 DNA 模块的一部分
CAAT-box	10/6	CAAAT	启动子和增强子区域常见的顺式作用元件
CCAAT-box	0/1	CAACGG	<i>MYB11</i> 结合位点
CGTCA-motif	2/2	CGTCA	茉莉酸甲酯响应元件
G-Box	1/2	CACGTT	光响应元件
G-box	0/6	CACGTC	光响应元件
MBS	2/2	CAACTG	参与干旱诱导的 MYB 结合位点
O2-site	2/1	GTTGACGTGA	玉米醇溶蛋白质代谢调控中涉及的顺式调控元件
Sp1	1/0	GGGCGG	光响应元件
TATA-box	24/6	TATAA	转录启动子周围-30 左右的核心启动子元件
TATC-box	1/0	TATCCA	赤霉素响应元件
TCCC-motif	1/0	TCTCCCT	光响应元件的一部分
W-box	1/1	TTGACC	WRKY 结构域专一结合的序列
WUN-motif	1/2	TAATTACTC	创伤反应元件

2.4 非生物胁迫处理对不同种类柑橘 *WRKY47* 基因表达的影响

分别对甜橙、柠檬、芦柑和金柑分别进行 250 mmol/L NaCl、20% PEG-6000 和 4 °C 低温处理,取其叶片进行实时荧光定量表达分析。由图 5a 可知,250 mmol/L NaCl 胁迫处理植株时,甜橙 *CsWRKY47* 在叶片中表达量逐渐升高,24 h 时达到最大值,为对照的 3 倍左右,整体变化较大;柠檬 *ClWRKY47* 表达量在 1 h 时最低,此后逐渐升高,在 6 h 时达到最高,整体变化趋势为先升后降;芦柑 *CrWRKY47* 在高盐处理后,与对照相比,整体表达是下调的,表达量表现出受高盐处理的抑制;金柑 *FjWRKY47* 表达量整体呈现缓慢升高的趋势,在 6 h 时达到最大值。

由图 5b 可知,20% PEG6000 模拟干旱胁迫处理时,甜橙 *CsWRKY47* 表达量在 24 h 内缓慢升高,在 6 h 和 24 h 时出现 2 次表达高峰;柠檬 *ClWRKY47* 的表达量呈现先升高后下降的趋势,在 6 h 时表达量达到最高;芦柑 *CrWRKY47* 在 24 h 内表达量变化趋势较平缓,在 1 h、6 h 以及 12 h 时表达量高于对

照;金柑 *FjWRKY47* 对干旱胁迫也有响应,但其表达量低于对照,表明干旱胁迫对金柑 *FjWRKY47* 的表达有一定的抑制作用。

由图 5c 可知,4 °C 低温处理时,甜橙 *CsWRKY47* 表达量整体呈现先升高后下降的趋势,在 12 h 时表达量最高,为对照的 2.7 倍左右;柠檬 *ClWRKY47* 表达量与对照相比总体上变化不大,但在 1 h 和 6 h 时其表达量高于对照,说明低温能诱导其表达;芦柑 *CrWRKY47* 表达量在前 12 h 处于缓慢升高的趋势,但在 24 h 时表达量降低到最低;金柑 *FjWRKY47* 的表达量在 24 h 内都低于对照,说明低温胁迫抑制 *FjWRKY47* 的表达。

以上结果表明,在高盐、干旱和低温处理下,*ClWRKY47*、*CsWRKY47*、*CrWRKY47* 和 *FjWRKY47* 的表达量都发生了改变。柠檬 *ClWRKY47* 和甜橙 *CsWRKY47* 均能被 3 种非生物胁迫诱导表达;芦柑 *CrWRKY47* 在干旱和低温胁迫下也能被诱导表达,但在高盐胁迫下表达量下调;金柑 *FjWRKY47* 可以响应高盐胁迫,但在干旱和低温胁迫下,表达都低于对照,尤其是低温胁迫下,*FjWRKY47* 明显下调表达。

<i>CIWRKY47</i>	CTACTACTACTCTTTCTGTTATCGAAAAACAACAGCAACCCCGTGAAGTCCGACTCTTCCACTCCCGTCACTTTCTCCCGCAAACTCTGATCATCG	100
<i>CsWRKY47</i>	CTACTACTACTCTTTCTGTTATCGAAAAACAACAGCAACCCCGTGAAGTCCGACTCTTCCACTCCCGTCACTTTCTCCCGCAAACTCTGATCATCG	100
<i>CrWRKY47</i>	CTACTACTACTCTTTCTGTTATCGAAAAACAACAGCAACCCCGTGAAGTCCGACTCTTCCACTCCCGTCACTTTCTCCCGCAAACTCTGATCATCG	100
<i>FjWRKY47</i>	CTACTACTACTCTTTCTGTTATCGAAAAACAACAGCAACCCCGTGAAGTCCGACTCTTCCACTCCCGTCACTTTCTCCCGCAAACTCTGATCATCG	100
<i>CIWRKY47</i>	CATGATCGACAATTCAATCAATCGTGATAACCCACCGATCCAAGAAATCGATTCTTTTCTACTAACAATAATCAATTCCATCATCAAGAAACAAAGATC	200
<i>CsWRKY47</i>	CATGATCGACAATTCAATCAATCGTGATAACCCACCGATCCAAGAAATCGATTCTTTTCTACTAACAATAATCAATTCCATCATCAAGAAACAAAGATC	200
<i>CrWRKY47</i>	CATGATCGACAATTCAATCAATCGTGATAACCCACCGATCCAAGAAATCGATTCTTTTCTACTAACAATAATCAATTCCATCATCAAGAAACAAAGATC	200
<i>FjWRKY47</i>	CATGATCGACAATTCAATCAATCGTGATAACCCACCGATCCAAGAAATCGATTCTTTTCTACTAACAATAATCAATTCCATCATCAAGAAACAAAGATC	200
<i>CIWRKY47</i>	GAATCCTCAACTCTAGTTCTTGATTCTCGTGTCAACATACGATTAAATCTCCACTTTCATGTTCTCGGAATTTCAACAACACCAATGATGATAAATCGA	300
<i>CsWRKY47</i>	GAATCCTCAACTCTAGTTCTTGATTCTCGTGTCAACATACGATTAAATCTCCACTTTCATGTTCTCGGAATTTCAACAACACCAATGATGATAAATCGC	300
<i>CrWRKY47</i>	GAATCCTCAACTCTAGTTCTTGATTCTCGTGTCAACATACGATTAAATCTCCACTTTCATGTTCTCGGAATTTCAACAACACCAATGATGATAAATCGC	300
<i>FjWRKY47</i>	GAATCCTCAACTCTAGTTCTTGATTCTCGTGTCAACATACGATTAAATCTCCACTTTCATGTTCTCGGAATTTCAACAACACCAATGATGATAAATCGA	300
<i>CIWRKY47</i>	ACACACAAGTGAAGTACCTTAAAGCCGAGTTACAACGTTGACAGGAAGACAACAGAACTGAGAAACATGTTGGATCAGACAACCAAAAGTTACAATGA	400
<i>CsWRKY47</i>	ACACACAAGTGAAGTACCTTAAAGCCGAGTTACAACGTTGACAGGAAGACAACAGAACTGAGAAACATGTTGGATCAGACAACCAAAAGTTACAATGA	400
<i>CrWRKY47</i>	ACACACAAGTGAAGTACCTTAAAGCCGAGTTACAACGTTGACAGGAAGACAACAGAACTGAGAAACATGTTGGATCAGACAACCAAAAGTTACAATGA	400
<i>FjWRKY47</i>	ACACACAAGTGAAGTACCTTAAAGCCGAGTTACAACGTTGACAGGAAGACAACAGAACTGAGAAACATGTTGGATCAGACAACCAAAAGTTACAATGA	400
<i>CIWRKY47</i>	TTTCCAGAGTCAACTACTCTTCCAAATGCAAAAAGTCCACATGCGAGCCCTCAAGCCGAGTGAATTTGAAGCCCTGCTCTTCAATGCCATGCCAAGT	500
<i>CsWRKY47</i>	TTTCCAGAGTCAACTACTCTTCCAAATGCAAAAAGTCCACATGCGAGCCCTCAAGCCGAGTGAATTTGAAGCCCTGCTCTTCAATGCCATGCCAAGT	500
<i>CrWRKY47</i>	TTTCCAGAGTCAACTACTCTTCCAAATGCAAAAAGTCCACATGCGAGCCCTCAAGCCGAGTGAATTTGAAGCCCTGCTCTTCAATGCCATGCCAAGT	500
<i>FjWRKY47</i>	TTTCCAGAGTCAACTACTCTTCCAAATGCAAAAAGTCCACATGCGAGCCCTCAAGCCGAGTGAATTTGAAGCCCTGCTCTTCAATGCCATGCCAAGT	500
<i>CIWRKY47</i>	CCCTTTAATGTTACCTCAACAATTTATGACCCACCCCTTCTCTCCATTGAATGTCAACGACCCCTTCCGTATCCGATGATAAGACACGAGACCTGTGAG	600
<i>CsWRKY47</i>	CCCTTTAATGTTACCTCAACAATTTATGACCCACCCCTTCTCTCCATTGAATGTCAACGACCCCTTCCGTATCCGATGATAAGACACGAGACCTGTGAG	600
<i>CrWRKY47</i>	CCCTTTAATGTTACCTCAACAATTTATGACCCACCCCTTCTCTCCATTGAATGTCAACGACCCCTTCCGTATCCGATGATAAGACACGAGACCTGTGAG	600
<i>FjWRKY47</i>	CCCTTTAATGTTACCTCAACAATTTATGACCCACCCCTTCTCTCCATTGAATGTCAACGACCCCTTCCGTATCCGATGATAAGACACGAGACCTGTGAG	600
<i>CIWRKY47</i>	CTTCTCCAGCAAAATCTCCTGAAGTAATTTCAAAGACCTTGACCATCTTTGACTAAGAATAATATTCCAGCGAACCAAGTTTCTAATAGTCAAGATCG	700
<i>CsWRKY47</i>	CTTCTCCAGCAAAATCTCCTGAAGTAATTTCAAAGACCTTGACCATCTTTGACTAAGAATAATATTCCAGCGAACCAAGTTTCTAATAGTCAAGATCG	700
<i>CrWRKY47</i>	CTTCTCCAGCAAAATCTCCTGAAGTAATTTCAAAGACCTTGACCATCTTTGACTAAGAATAATATTCCAGCGAACCAAGTTTCTAATAGTCAAGATCG	700
<i>FjWRKY47</i>	CTTCTCCAGCAAAATCTCCTGAAGTAATTTCAAAGACCTTGACCATCTTTGACTAAGAATAATATTCCAGCGAACCAAGTTTCTAATAGTCAAGATCG	700
<i>CIWRKY47</i>	TCCCGAAACGTCTCAGAGTTCGCCCTCTCCTAAAAGTCTTAACTTGATCATCAACCAAGAACGATGACCAAGTTTCTGAAGTCCCTTTTCGTAAACCT	800
<i>CsWRKY47</i>	TCCCGAAACGTCTCAGAGTTCGCCCTCTCCTAAAAGTCTTAACTTGATCATCAACCAAGAACGATGACCAAGTTTCTGAAGTCCCTTTTCGTAAACCT	800
<i>CrWRKY47</i>	TCCCGAAACGTCTCAGAGTTCGCCCTCTCCTAAAAGTCTTAACTTGATCATCAACCAAGAACGATGACCAAGTTTCTGAAGTCCCTTTTCGTAAACCT	800
<i>FjWRKY47</i>	TCCCGAAACGTCTCAGAGTTCGCCCTCTCCTAAAAGTCTTAACTTGATCATCAACCAAGAACGATGACCAAGTTTCTGAAGTCCCTTTTCGTAAACCT	800
<i>CIWRKY47</i>	ACCGTTTCTCTAAGACCAAGATCAGAACCTCTTTGATCAGTATCGATCTCAATCGAGAAATATCGTCAAAAGATGCCCAACCGTAACCTTTGTCCAC	900
<i>CsWRKY47</i>	ACCGTTTCTCTAAGACCAAGATCAGAACCTCTTTGATCAGTATCGATCTCAATCGAGAAATATCGTCAAAAGATGCCCAACCGTAACCTTTGTCCAC	900
<i>CrWRKY47</i>	ACCGTTTCTCTAAGACCAAGATCAGAACCTCTTTGATCAGTATCGATCTCAATCGAGAAATATCGTCAAAAGATGCCCAACCGTAACCTTTGTCCAC	900
<i>FjWRKY47</i>	ACCGTTTCTCTAAGACCAAGATCAGAACCTCTTTGATCAGTATCGATCTCAATCGAGAAATATCGTCAAAAGATGCCCAACCGTAACCTTTGTCCAC	900
<i>CIWRKY47</i>	CCCCCTACTATCCGTCCACCATGCCCGTTGGATCCCCAGTTCCCAAGCAGTCAACAGATGCCCTGAGGATACGACCATTTCTCATCAAACTTATGAACG	1 000
<i>CsWRKY47</i>	CCCCCTACTATCCGTCCACCATGCCCGTTGGATCCCCAGTTCCCAAGCAGTCAACAGATGCCCTGAGGATACGACCATTTCTCATCAAACTTATGAACG	1 000
<i>CrWRKY47</i>	CCCCCTACTATCCGTCCACCATGCCCGTTGGATCCCCAGTTCCCAAGCAGTCAACAGATGCCCTGAGGATACGACCATTTCTCATCAAACTTATGAACG	1 000
<i>FjWRKY47</i>	CCCCCTACTATCCGTCCACCATGCCCGTTGGATCCCCAGTTCCCAAGCAGTCAACAGATGCCCTGAGGATACGACCATTTCTCATCAAACTTATGAACG	1 000
<i>CIWRKY47</i>	AAACCACAATCACCCTCTCCACCACCAACAGCCATGCCCAATACAACCTCACTCCGCCCCCATCTCTCTGTACGTTCCGACCAACCAAGAC	1 100
<i>CsWRKY47</i>	AAACCACAATCACCCTCTCCACCACCAACAGCCATGCCCAATACAACCTCACTCCGCCCCCATCTCTCTGTACGTTCCGACCAACCAAGAC	1 100
<i>CrWRKY47</i>	AAACCACAATCACCCTCTCCACCACCAACAGCCATGCCCAATACAACCTCACTCCGCCCCCATCTCTCTGTACGTTCCGACCAACCAAGAC	1 100
<i>FjWRKY47</i>	AAACCACAATCACCCTCTCCACCACCAACAGCCATGCCCAATACAACCTCACTCCGCCCCCATCTCTCTGTACGTTCCGACCAACCAAGAC	1 100
<i>CIWRKY47</i>	CGTCTAACAAGTCTCGTTCTTTCTCACTCCGTGCCATTTGCCATCAACAATGCCAATCTATCTCTTCTCCACCATTTCCCAACCATACCCCTTGACTTAA	1 200
<i>CsWRKY47</i>	CGTCTAACAAGTCTCGTTCTTTCTCACTCCGTGCCATTTGCCATCAACAATGCCAATCTATCTCTTCTCCACCATTTCCCAACCATACCCCTTGACTTAA	1 200
<i>CrWRKY47</i>	CGTCTAACAAGTCTCGTTCTTTCTCACTCCGTGCCATTTGCCATCAACAATGCCAATCTATCTCTTCTCCACCATTTCCCAACCATACCCCTTGACTTAA	1 200
<i>FjWRKY47</i>	CGTCTAACAAGTCTCGTTCTTTCTCACTCCGTGCCATTTGCCATCAACAATGCCAATCTATCTCTTCTCCACCATTTCCCAACCATACCCCTTGACTTAA	1 200
<i>CIWRKY47</i>	CCGACACCCCAAAACCAATGCAATTCTCCGCGGACCTTCTTCTGCTGTCACATTTCTCTACCTTTGATCGTTACCCACAACCTTTTAAAGTACGCCCC	1 300
<i>CsWRKY47</i>	CCGACACCCCAAAACCAATGCAATTCTCCGCGGACCTTCTTCTGCTGTCACATTTCTCTACCTTTGATCGTTACCCACAACCTTTTAAAGTACGCCCC	1 300
<i>CrWRKY47</i>	CCGACACCCCAAAACCAATGCAATTCTCCGCGGACCTTCTTCTGCTGTCACATTTCTCTACCTTTGATCGTTACCCACAACCTTTTAAAGTACGCCCC	1 300
<i>FjWRKY47</i>	CCGACACCCCAAAACCAATGCAATTCTCCGCGGACCTTCTTCTGCTGTCACATTTCTCTACCTTTGATCGTTACCCACAACCTTTTAAAGTACGCCCC	1 300
<i>CIWRKY47</i>	TCCCTCCCGGATGCCCAATATATGCAATTACCCCAACCCATCTCTCAATCGTTGAGACGGTCAACCCACCCATTACTTCCGACCCGAATTTACAGCT	1 400
<i>CsWRKY47</i>	TCCCTCCCGGATGCCCAATATATGCAATTACCCCAACCCATCTCTCAATCGTTGAGACGGTCAACCCACCCATTACTTCCGACCCGAATTTACAGCT	1 400
<i>CrWRKY47</i>	TCCCTCCCGGATGCCCAATATATGCAATTACCCCAACCCATCTCTCAATCGTTGAGACGGTCAACCCACCCATTACTTCCGACCCGAATTTACAGCT	1 400
<i>FjWRKY47</i>	TCCCTCCCGGATGCCCAATATATGCAATTACCCCAACCCATCTCTCAATCGTTGAGACGGTCAACCCACCCATTACTTCCGACCCGAATTTACAGCT	1 400
<i>CIWRKY47</i>	CCCTTACCTCCACCAATCTCAACGATAATTCCGACCAATAACCCGAAACATCGTAATAACCCGAC	1 500
<i>CsWRKY47</i>	CCCTTACCTCCACCAATCTCAACGATAATTCCGACCAATAACCCGAAACATCGTAATAACCCGAC	1 500
<i>CrWRKY47</i>	CCCTTACCTCCACCAATCTCAACGATAATTCCGACCAATAACCCGAAACATCGTAATAACCCGAC	1 500
<i>FjWRKY47</i>	CCCTTACCTCCACCAATCTCAACGATAATTCCGACCAATAACCCGAAACATCGTAATAACCCGAC	1 500
<i>CIWRKY47</i>	AATCTTCCACTACTTTCTCCACAATTAACCTAAGTACGCCCCCCCCCTACCTATGCATAATATAT	1 566
<i>CsWRKY47</i>	AATCTTCCACTACTTTCTCCACAATTAACCTAAGTACGCCCCCCCCCTACCTATGCATAATATAT	1 566
<i>CrWRKY47</i>	AATCTTCCACTACTTTCTCCACAATTAACCTAAGTACGCCCCCCCCCTACCTATGCATAATATAT	1 566
<i>FjWRKY47</i>	AATCTTCCACTACTTTCTCCACAATTAACCTAAGTACGCCCCCCCCCTACCTATGCATAATATAT	1 566

图2 *CIWRKY47*、*CsWRKY47*、*CrWRKY47*、*FjWRKY47* 基因碱基位点对Fig.2 Base site alignment of *CIWRKY47*, *CsWRKY47*, *CrWRKY47* and *FjWRKY47*

柠檬 (<i>CIWRKY47</i>)	NEKCCC...RRELALLFSC...DFLRRNSCH...RMVENS...INRDKPPI...CEMEFFSSNNCLHE...CERKI ES...STLVLES	68
甜橙 (<i>CSWRKY47</i>)	NEKCCC...RRELALLFSC...DFLRRNSCH...RMVENS...INRDKPPI...CEMEFFSSNNCLHE...CERKI ES...STLVLES	68
柚子 (<i>CrWRKY47</i>)	NEKCCC...RRELALLFSC...DFLRRNSCH...RMVENS...INRDKPPI...CEMEFFSSNNCLHE...CERKI ES...STLVLES	68
金桔 (<i>FjWRKY47</i>)	NEKCCC...RRELALLFSC...DFLRRNSCH...RMVENS...INRDKPPI...CEMEFFSSNNCLHE...CERKI ES...STLVLES	68
柠檬门柚 (<i>Citrus clementine</i> XP 006444621.1)	NEKCCC...RRELALLFSC...DFLRRNSCH...RMVENS...INRDKPPI...CEMEFFSSNNCLHE...CERKI ES...STLVLES	68
龙眼 (<i>Dimocarpus longan</i> AEO31517.2)	NEKCCC...RRELALLFSC...DFLRRNSCH...RMVENS...INRDKPPI...CEMEFFSSNNCLHE...CERKI ES...STLVLES	67
榴莲 (<i>Durio zibethinus</i> XP 022759640.1)	NEKCCC...RRELALLFSC...DFLRRNSCH...RMVENS...INRDKPPI...CEMEFFSSNNCLHE...CERKI ES...STLVLES	72
陆地棉 (<i>Gossypium hirsutum</i> XP 016743736.1)	NEKCCC...RRELALLFSC...DFLRRNSCH...RMVENS...INRDKPPI...CEMEFFSSNNCLHE...CERKI ES...STLVLES	77
大豆 (<i>Glycine max</i> XP 006604764.1)	NEKCCC...RRELALLFSC...DFLRRNSCH...RMVENS...INRDKPPI...CEMEFFSSNNCLHE...CERKI ES...STLVLES	80
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_192081.1)	NEKCCC...RRELALLFSC...DFLRRNSCH...RMVENS...INRDKPPI...CEMEFFSSNNCLHE...CERKI ES...STLVLES	71
柠檬 (<i>CIWRKY47</i>)	CYNICL...LHTSCS...SRTANDCKSHTEL...SEIKGELCR...HEENRKR...NMLDCTTKSYNDLCSCLLLANCKLAHSPCCVNLKAGA	153
甜橙 (<i>CSWRKY47</i>)	CYNICL...LHTSCS...SRTANDCKSHTEL...SEIKGELCR...HEENRKR...NMLDCTTKSYNDLCSCLLLANCKLAHSPCCVNLKAGA	153
柚子 (<i>CrWRKY47</i>)	CYNICL...LHTSCS...SRTANDCKSHTEL...SEIKGELCR...HEENRKR...NMLDCTTKSYNDLCSCLLLANCKLAHSPCCVNLKAGA	153
金桔 (<i>FjWRKY47</i>)	CYNICL...LHTSCS...SRTANDCKSHTEL...SEIKGELCR...HEENRKR...NMLDCTTKSYNDLCSCLLLANCKLAHSPCCVNLKAGA	153
柠檬门柚 (<i>Citrus clementine</i> XP 006444621.1)	CYNICL...LHTSCS...SRTANDCKSHTEL...SEIKGELCR...HEENRKR...NMLDCTTKSYNDLCSCLLLANCKLAHSPCCVNLKAGA	153
龙眼 (<i>Dimocarpus longan</i> AEO31517.2)	CYNICL...LHTSCS...SRTANDCKSHTEL...SEIKGELCR...HEENRKR...NMLDCTTKSYNDLCSCLLLANCKLAHSPCCVNLKAGA	148
榴莲 (<i>Durio zibethinus</i> XP 022759640.1)	CYNICL...LHTSCS...SRTANDCKSHTEL...SEIKGELCR...HEENRKR...NMLDCTTKSYNDLCSCLLLANCKLAHSPCCVNLKAGA	153
陆地棉 (<i>Gossypium hirsutum</i> XP 016743736.1)	CYNICL...LHTSCS...SRTANDCKSHTEL...SEIKGELCR...HEENRKR...NMLDCTTKSYNDLCSCLLLANCKLAHSPCCVNLKAGA	158
大豆 (<i>Glycine max</i> XP 006604764.1)	CYNICL...LHTSCS...SRTANDCKSHTEL...SEIKGELCR...HEENRKR...NMLDCTTKSYNDLCSCLLLANCKLAHSPCCVNLKAGA	159
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_192081.1)	CYNICL...LHTSCS...SRTANDCKSHTEL...SEIKGELCR...HEENRKR...NMLDCTTKSYNDLCSCLLLANCKLAHSPCCVNLKAGA	150
柠檬 (<i>CIWRKY47</i>)	FNCMPSP...LACCFMCP...PSP...VNEPSVSEDKT...RELSASPANT...AEVI SKEL...HPLTKNNI...PKRCVSN...SEDCAETSO	231
甜橙 (<i>CSWRKY47</i>)	FNCMPSP...LACCFMCP...PSP...VNEPSVSEDKT...RELSASPANT...AEVI SKEL...HPLTKNNI...PKRCVSN...SEDCAETSO	231
柚子 (<i>CrWRKY47</i>)	FNCMPSP...LACCFMCP...PSP...VNEPSVSEDKT...RELSASPANT...AEVI SKEL...HPLTKNNI...PKRCVSN...SEDCAETSO	231
金桔 (<i>FjWRKY47</i>)	FNCMPSP...LACCFMCP...PSP...VNEPSVSEDKT...RELSASPANT...AEVI SKEL...HPLTKNNI...PKRCVSN...SEDCAETSO	231
柠檬门柚 (<i>Citrus clementine</i> XP 006444621.1)	FNCMPSP...LACCFMCP...PSP...VNEPSVSEDKT...RELSASPANT...AEVI SKEL...HPLTKNNI...PKRCVSN...SEDCAETSO	231
龙眼 (<i>Dimocarpus longan</i> AEO31517.2)	FNCMPSP...LACCFMCP...PSP...VNEPSVSEDKT...RELSASPANT...AEVI SKEL...HPLTKNNI...PKRCVSN...SEDCAETSO	226
榴莲 (<i>Durio zibethinus</i> XP 022759640.1)	FNCMPSP...LACCFMCP...PSP...VNEPSVSEDKT...RELSASPANT...AEVI SKEL...HPLTKNNI...PKRCVSN...SEDCAETSO	229
陆地棉 (<i>Gossypium hirsutum</i> XP 016743736.1)	FNCMPSP...LACCFMCP...PSP...VNEPSVSEDKT...RELSASPANT...AEVI SKEL...HPLTKNNI...PKRCVSN...SEDCAETSO	235
大豆 (<i>Glycine max</i> XP 006604764.1)	FNCMPSP...LACCFMCP...PSP...VNEPSVSEDKT...RELSASPANT...AEVI SKEL...HPLTKNNI...PKRCVSN...SEDCAETSO	229
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_192081.1)	FNCMPSP...LACCFMCP...PSP...VNEPSVSEDKT...RELSASPANT...AEVI SKEL...HPLTKNNI...PKRCVSN...SEDCAETSO	204
WRKY结构域		
C₂H₂ 锌指结构		
柠檬 (<i>CIWRKY47</i>)	SWG...SPKSPK...LHCPKNEECV...SEVPERKARVS...VRARS...EAPLI...SDCCCWRKYCCKAKCNPCPRAYRYCTMAVCCPVRCVCRC	313
甜橙 (<i>CSWRKY47</i>)	SWG...SPKSPK...LHCPKNEECV...SEVPERKARVS...VRARS...EAPLI...SDCCCWRKYCCKAKCNPCPRAYRYCTMAVCCPVRCVCRC	313
柚子 (<i>CrWRKY47</i>)	SWG...SPKSPK...LHCPKNEECV...SEVPERKARVS...VRARS...EAPLI...SDCCCWRKYCCKAKCNPCPRAYRYCTMAVCCPVRCVCRC	313
金桔 (<i>FjWRKY47</i>)	SWG...SPKSPK...LHCPKNEECV...SEVPERKARVS...VRARS...EAPLI...SDCCCWRKYCCKAKCNPCPRAYRYCTMAVCCPVRCVCRC	313
柠檬门柚 (<i>Citrus clementine</i> XP 006444621.1)	SWG...SPKSPK...LHCPKNEECV...SEVPERKARVS...VRARS...EAPLI...SDCCCWRKYCCKAKCNPCPRAYRYCTMAVCCPVRCVCRC	313
龙眼 (<i>Dimocarpus longan</i> AEO31517.2)	SWG...SPKSPK...LHCPKNEECV...SEVPERKARVS...VRARS...EAPLI...SDCCCWRKYCCKAKCNPCPRAYRYCTMAVCCPVRCVCRC	308
榴莲 (<i>Durio zibethinus</i> XP 022759640.1)	SWG...SPKSPK...LHCPKNEECV...SEVPERKARVS...VRARS...EAPLI...SDCCCWRKYCCKAKCNPCPRAYRYCTMAVCCPVRCVCRC	306
陆地棉 (<i>Gossypium hirsutum</i> XP 016743736.1)	SWG...SPKSPK...LHCPKNEECV...SEVPERKARVS...VRARS...EAPLI...SDCCCWRKYCCKAKCNPCPRAYRYCTMAVCCPVRCVCRC	316
大豆 (<i>Glycine max</i> XP 006604764.1)	SWG...SPKSPK...LHCPKNEECV...SEVPERKARVS...VRARS...EAPLI...SDCCCWRKYCCKAKCNPCPRAYRYCTMAVCCPVRCVCRC	314
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_192081.1)	SWG...SPKSPK...LHCPKNEECV...SEVPERKARVS...VRARS...EAPLI...SDCCCWRKYCCKAKCNPCPRAYRYCTMAVCCPVRCVCRC	279
柠檬 (<i>CIWRKY47</i>)	AEDRTIL...TTYECNHN...PLPPA...AATANA...TTTAAA...MLLSCSSTS...GLTSSCFHHS...VPFASTATLSASAPFPPTI	388
甜橙 (<i>CSWRKY47</i>)	AEDRTIL...TTYECNHN...PLPPA...AATANA...TTTAAA...MLLSCSSTS...GLTSSCFHHS...VPFASTATLSASAPFPPTI	388
柚子 (<i>CrWRKY47</i>)	AEDRTIL...TTYECNHN...PLPPA...AATANA...TTTAAA...MLLSCSSTS...GLTSSCFHHS...VPFASTATLSASAPFPPTI	388
金桔 (<i>FjWRKY47</i>)	AEDRTIL...TTYECNHN...PLPPA...AATANA...TTTAAA...MLLSCSSTS...GLTSSCFHHS...VPFASTATLSASAPFPPTI	388
柠檬门柚 (<i>Citrus clementine</i> XP 006444621.1)	AEDRTIL...TTYECNHN...PLPPA...AATANA...TTTAAA...MLLSCSSTS...GLTSSCFHHS...VPFASTATLSASAPFPPTI	388
龙眼 (<i>Dimocarpus longan</i> AEO31517.2)	AEDRTIL...TTYECNHN...PLPPA...AATANA...TTTAAA...MLLSCSSTS...GLTSSCFHHS...VPFASTATLSASAPFPPTI	383
榴莲 (<i>Durio zibethinus</i> XP 022759640.1)	AEDRTIL...TTYECNHN...PLPPA...AATANA...TTTAAA...MLLSCSSTS...GLTSSCFHHS...VPFASTATLSASAPFPPTI	383
陆地棉 (<i>Gossypium hirsutum</i> XP 016743736.1)	AEDRTIL...TTYECNHN...PLPPA...AATANA...TTTAAA...MLLSCSSTS...GLTSSCFHHS...VPFASTATLSASAPFPPTI	391
大豆 (<i>Glycine max</i> XP 006604764.1)	AEDRTIL...TTYECNHN...PLPPA...AATANA...TTTAAA...MLLSCSSTS...GLTSSCFHHS...VPFASTATLSASAPFPPTI	392
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_192081.1)	AEDRTIL...TTYECNHN...PLPPA...AATANA...TTTAAA...MLLSCSSTS...GLTSSCFHHS...VPFASTATLSASAPFPPTI	362
柠檬 (<i>CIWRKY47</i>)	TLLELTCS...PMGFLRCP...SSSTFPLPHG...YPCLLR...YCP...AACVPNN...MLCCRHASVETVIAAI...TSCPNTAALA	462
甜橙 (<i>CSWRKY47</i>)	TLLELTCS...PMGFLRCP...SSSTFPLPHG...YPCLLR...YCP...AACVPNN...MLCCRHASVETVIAAI...TSCPNTAALA	462
柚子 (<i>CrWRKY47</i>)	TLLELTCS...PMGFLRCP...SSSTFPLPHG...YPCLLR...YCP...AACVPNN...MLCCRHASVETVIAAI...TSCPNTAALA	462
金桔 (<i>FjWRKY47</i>)	TLLELTCS...PMGFLRCP...SSSTFPLPHG...YPCLLR...YCP...AACVPNN...MLCCRHASVETVIAAI...TSCPNTAALA	462
柠檬门柚 (<i>Citrus clementine</i> XP 006444621.1)	TLLELTCS...PMGFLRCP...SSSTFPLPHG...YPCLLR...YCP...AACVPNN...MLCCRHASVETVIAAI...TSCPNTAALA	462
龙眼 (<i>Dimocarpus longan</i> AEO31517.2)	TLLELTCS...PMGFLRCP...SSSTFPLPHG...YPCLLR...YCP...AACVPNN...MLCCRHASVETVIAAI...TSCPNTAALA	461
榴莲 (<i>Durio zibethinus</i> XP 022759640.1)	TLLELTCS...PMGFLRCP...SSSTFPLPHG...YPCLLR...YCP...AACVPNN...MLCCRHASVETVIAAI...TSCPNTAALA	461
陆地棉 (<i>Gossypium hirsutum</i> XP 016743736.1)	TLLELTCS...PMGFLRCP...SSSTFPLPHG...YPCLLR...YCP...AACVPNN...MLCCRHASVETVIAAI...TSCPNTAALA	470
大豆 (<i>Glycine max</i> XP 006604764.1)	TLLELTCS...PMGFLRCP...SSSTFPLPHG...YPCLLR...YCP...AACVPNN...MLCCRHASVETVIAAI...TSCPNTAALA	477
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_192081.1)	TLLELTCS...PMGFLRCP...SSSTFPLPHG...YPCLLR...YCP...AACVPNN...MLCCRHASVETVIAAI...TSCPNTAALA	439
柠檬 (<i>CIWRKY47</i>)	AAI...STII...CSNNGN...CN...GTSCK...CPSPOLPCSCITFS...TN...	501
甜橙 (<i>CSWRKY47</i>)	AAI...STII...CSNNGN...CN...GTSCK...CPSPOLPCSCITFS...TN...	501
柚子 (<i>CrWRKY47</i>)	AAI...STII...CSNNGN...CN...GTSCK...CPSPOLPCSCITFS...TN...	501
金桔 (<i>FjWRKY47</i>)	AAI...STII...CSNNGN...CN...GTSCK...CPSPOLPCSCITFS...TN...	501
柠檬门柚 (<i>Citrus clementine</i> XP 006444621.1)	AAI...STII...CSNNGN...CN...GTSCK...CPSPOLPCSCITFS...TN...	501
龙眼 (<i>Dimocarpus longan</i> AEO31517.2)	AAI...STII...CSNNGN...CN...GTSCK...CPSPOLPCSCITFS...TN...	510
榴莲 (<i>Durio zibethinus</i> XP 022759640.1)	AAI...STII...CSNNGN...CN...GTSCK...CPSPOLPCSCITFS...TN...	512
陆地棉 (<i>Gossypium hirsutum</i> XP 016743736.1)	AAI...STII...CSNNGN...CN...GTSCK...CPSPOLPCSCITFS...TN...	528
大豆 (<i>Glycine max</i> XP 006604764.1)	AAI...STII...CSNNGN...CN...GTSCK...CPSPOLPCSCITFS...TN...	516
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_192081.1)	AAI...STII...CSNNGN...CN...GTSCK...CPSPOLPCSCITFS...TN...	489

图3 多种植物 WRKY47 蛋白氨基酸序列比对

Fig.3 Amino acid sequence alignment of WRKY47 protein in various plants

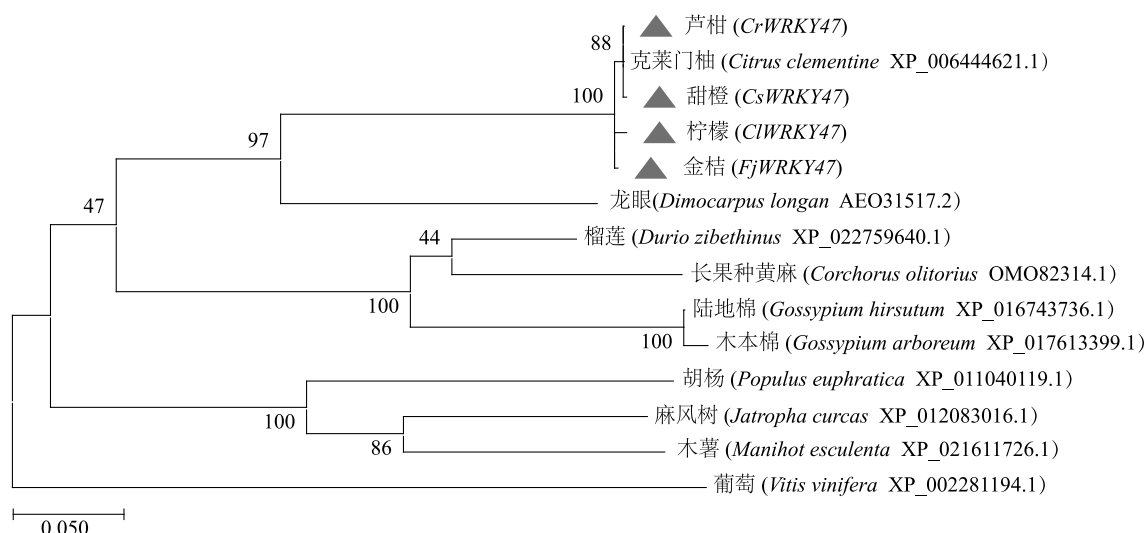
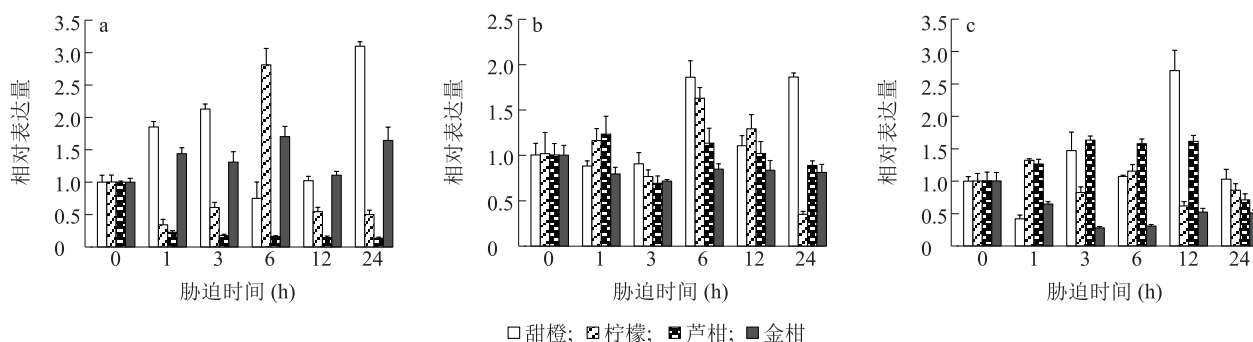


图 4 *ClWRKY47*、*CsWRKY47*、*CrWRKY47* 和 *FjWRKY47* 与其他植物 *WRKY47* 蛋白的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of *ClWRKY47*, *CsWRKY47*, *CrWRKY47* and *FjWRKY47* and *WRKY47* protein in other plants



a: 250 mmol/L NaCl 胁迫处理; b: 20% PEG6000 胁迫处理; c: 低温胁迫处理。

图 5 不同胁迫处理后 *WRKY47* 基因在甜橙、柠檬、芦柑、金柑叶中的表达

Fig.5 Expression of *WRKY47* gene in leaves of sweet orange, lemon, citrus and kumquat after different stress treatments

3 讨论

WRKY 家族转录因子具有调控植物生长发育和响应非生物胁迫等多种功能。但是,目前有关柑橘中 *WRKY* 转录因子的研究较少。为了初步验证柑橘中 *WRKY47* 基因对逆境的响应机制以及在不同柑橘种类中的差异,我们从柠檬、甜橙、芦柑、金柑中分别克隆出 *ClWRKY47*、*CsWRKY47*、*CrWRKY47* 和 *FjWRKY47* 基因。根据所含有的保守结构域的差异,*WRKY* 转录因子可分为 Group I、Group II 和 Group III 3 类^[16]。Group II 最初又被分为 IIa、IIb、IIc、IId 和 IIe 5 个亚组,但最近的系统发育分析结果表明,IIa 和 IIb, IId 和 IIe 分别被合并为 IIa + IIb 和 IId + IIe^[17]。在本研究中,多序列比对分析结果表明,这 4 种蛋白质与其他植物 *WRKY47* 蛋白都具有

高度保守的 *WRKY* 结构域和 C_2H_2 锌指结构,这与前人研究结果^[2]相吻合。同时,有研究表明,At*WRKY47* 蛋白属于 Group IIb 类^[11],推测 *ClWRKY47*、*CsWRKY47*、*CrWRKY47* 和 *FjWRKY47* 蛋白属于 *WRKY* 转录因子家族的 Group IIa + IIb 类。此外,通过系统进化树可以明显看出这 4 个蛋白质具有种属特异性,与克莱门柚 *WRKY47* 蛋白这个同属植物蛋白质亲缘关系最近且都聚集在进化树的同一个分支上,这与植物系统分类学的进化趋势是一致的。另外,通过对甜橙 *CsWRKY47* 氨基酸序列的分析发现,该蛋白质定位在细胞核上的可能性最高,符合转录因子的一般特征,即亚细胞定位于细胞核上^[18-20],该结果还需要通过试验进一步验证。

顺式作用元件存在于基因的启动子中,一般是由 5~20 个碱基序列组成的特异性 DNA 序列,具有

转录调节功能^[21]。对玉米基因 *ZmCIPK10* 和 *ZmZIP71* 启动子序列进行分析,发现两者启动子序列中含有大量的逆境相关元件,如脱落酸、低温等响应元件,进一步通过非生物胁迫处理植株后,发现在干旱、低温和高盐胁迫下,*ZmCIPK10* 和 *ZmZIP71* 基因表达量上升,表明两者在植物应对逆境的过程中起调控作用^[22-23]。在本试验中,对 *CsWRKY47* 基因启动子顺式作用元件进行预测分析,结果表明,该基因启动子包含多个光响应元件和植物逆境胁迫应答相关作用元件。由此推测,*CsWRKY47* 基因可能受到光、激素及其他非生物胁迫的诱导,参与了植物非生物胁迫响应过程。欧芹在受到病原菌侵染时,*PcWRKY1* 基因在短时间内会迅速表达且表达量显著增加,对其启动子序列分析发现,其自身启动子具有 3 个 W-box 元件,*PcWRKY1* 蛋白不仅可以通过自身的启动子 W-box 元件与其他 WRKY 蛋白结合以行使功能,还可以通过该元件与自身结合并形成自我调节^[24]。本研究中,*CsWRKY47* 基因启动子也含有 W-box 元件,猜测 *CsWRKY47* 蛋白可能可以与自身启动子结合以自我调节,或者与其他 WRKY 蛋白结合以调控其对逆境的响应表达。

前人研究结果表明,WRKY 转录因子在植物响应非生物胁迫中扮演着重要的角色,例如在拟南芥中,*AtWRKY25* 和 *AtWRKY33* 的表达受到 NaCl 和干旱处理的诱导并显著提高^[25];蔡荣号等^[26]在模式植物拟南芥中通过异源表达玉米 *ZmWRKY114* 基因发现转基因植株在高盐胁迫下绿苗率低于野生型植株,并且其根系生长也受到了抑制,*ZmWRKY114* 基因在调控植物应对高盐胁迫的过程中可能起负调控作用。Zou 等^[27]对拟南芥的研究结果证实低温诱导了野生型拟南芥中 *AtWRKY34* 基因的表达。本研究结果表明,柠檬 *ClWRKY47* 和甜橙 *CsWRKY47* 都能被 3 种非生物胁迫诱导表达,但是芦柑 *CrWRKY47* 与金柑 *FjWRKY47* 对不同的胁迫表现出了差异表达。芦柑 *CrWRKY47* 在盐胁迫后表达下调,在干旱和低温胁迫下表达上调,金柑 *FjWRKY47* 在盐胁迫后上调表达,在干旱和低温胁迫后表达下调。植物在应对干旱胁迫和高盐胁迫的过程中,有很多基因参与响应胁迫,并在这 2 个胁迫过程中同一个基因起着相反的作用^[28-29];也有基因在调控植物应对盐胁迫、低温胁迫和机械损伤过程中作用相反,例如杨树中,*PtrWRKY75* 基因和 *PtrWRKY80* 基

因的表达能被盐胁迫诱导,从而上调表达,但这 2 个基因对低温胁迫和机械损伤没有响应;*PtrWRKY61* 基因和 *PtrWRKY88* 基因则特异性响应盐胁迫和机械伤害,对低温胁迫不响应^[30]。因此,芦柑 *CrWRKY47* 与金柑 *FjWRKY47* 在不同的非生物胁迫处理后出现差异表达的原因可能是芦柑和金柑这 2 个柑橘种类自身遗传特性导致的,也可能是由于植物在不同的胁迫条件下,与不同柑橘种类 *WRKY47* 基因启动子结合的上游调控因子不同导致的。

综上所述,本研究克隆获得的 *ClWRKY47*、*CsWRKY47*、*CrWRKY47* 和 *FjWRKY47* 基因编码的转录因子属于 WRKY 转录因子家族的 Group IIa+IIb 类。顺式作用元件预测发现 *CsWRKY47* 基因启动子含有多种逆境相关元件。qRT-PCR 表达分析结果揭示,*CrWRKY47* 与 *FjWRKY47* 对不同非生物胁迫的响应不同。这些结果表明柑橘 *WRKY47* 可以响应多种非生物胁迫,可能在柑橘抵御非生物胁迫过程中发挥重要的作用。

参考文献:

- [1] HIRAYAMA T, SHINOZAKI K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future [J]. The Plant Journal, 2010, 61(6): 1041-1052.
- [2] LIU J H, PENG T, DAI W. Critical cis-acting elements and interacting transcription factors: key players associated with abiotic stress responses in plants [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2014, 32(2): 303-317.
- [3] REN X, CHEN Z, LIU Y, et al. ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in arabidopsis [J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2010, 63(3): 417-429.
- [4] XU Z S, CHEN M, LI L C, et al. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement [J]. J Integr Plant Biol, 2011, 53(7): 570-585.
- [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 Mgg, 1994, 244(6): 563-571.
- [6] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors. [J]. Trends in Plant science, 2000, 5(5): 199-206.
- [7] CHEN L G, SONG Y, LI S J, et al. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1819(2): 120-128.
- [8] QIU Y, JING S, FU J, et al. Cloning and analysis of expression

- profile of 13 *WRKY* genes in rice [J]. Chinese Science Bulletin, 2004, 49(20):2159-2168.
- [9] JIANG Y, DEYHOLOS M K. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed arabidopsis roots reveals novel classes of responsive genes [J]. BMC Plant Biol, 2006, 6:25.
- [10] 徐丽, 陈新, 宗晓娟, 等. 樱桃砧木 *PcWRKY1* 基因的克隆与表达分析 [J]. 江苏农业学报, 2018, 34(3):636-641.
- [11] WANG X, LI J, GUO X, et al. PIWRKY13: a transcription factor involved in abiotic and biotic stress responses in paeonia lactiflora [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23):5953.
- [12] 钱靓雯. *WRKY47* 在植物硒富集及耐受中的作用研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2018.
- [13] 孟云. 拟南芥 *WRKY47* 基因在镉胁迫应答中的作用机理研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019.
- [14] RAINERI J, WANG S, PELEG Z, et al. The rice transcription factor OsWRKY47 is a positive regulator of the response to water deficit stress [J]. Plant Molecular Biology, 2015, 88(4/5):401-413.
- [15] 郭文芳. 柑橘抗逆相关基因 *NAC83*、*MYB15* 和 *COR15a* 的克隆与表达分析 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2015.
- [16] LLORCA C M, POTSCHIN M, ZENTGRAF U. bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies [J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5:169.
- [17] RUSHTON D L, TRIPATHI P, RABARA R C, et al. WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signaling [J]. Plant Biotechnol, 2012, 10:2-11.
- [18] LIU Y, YANG T, LIN Z, et al. A WRKY transcription factor PbrWRKY53 from *Pyrus betulaefolia* is involved in drought tolerance and AsA accumulation [J]. Plant Biotechnol J, 2019, 17:1770-1787.
- [19] GUO H, WANG Y, WANG L, et al. Expression of the MYB transcription factor gene *BplMYB46* affects abiotic stress tolerance and secondary cell wall deposition in *Betula platyphylla* [J]. Plant Biotechnol J, 2017, 15:107-121.
- [20] 魏鑫, 王寒涛, 魏恒玲, 等. 陆地棉 *GhWRKY33* 的克隆及抗旱功能分析 [J]. 中国农业科学, 2020, 53(22):4537-4549.
- [21] 郭晋艳, 郑晓瑜, 邹翠霞, 等. 植物非生物胁迫诱导启动子顺式元件及转录因子研究进展 [J]. 生物技术通报, 2011(4):16-20.
- [22] 赵晋锋, 余爱丽, 王寒玉, 等. 非生物逆境胁迫下 *ZmCIPK10* 基因表达分析 [J]. 生物技术进展, 2011, 1(2):130-134.
- [23] 刘彦丹, 英生, 张登峰, 等. 玉米逆境胁迫响应基因 *ZmbZIP71* 的克隆与表达分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(5):775-781.
- [24] TURCK F, ZHOU A, SOMSSICH I E. Stimulus-dependent, promoter-specific binding of transcription factor WRKY1 to its native promoter and the defense-related gene *PcPRI-1* in Parsley [J]. Plant Cell, 2004, 16:2573-2585.
- [25] LI S, FU Q, CHEN L, et al. Arabidopsis thaliana *WRKY25*, *WRKY26*, and *WRKY33* coordinate induction of plant thermotolerance [J]. Planta, 2011, 233(6):1237-1252.
- [26] 蔡荣号, 李尉, 陈浩伟, 等. 异源表达玉米 *ZmWRKY114* 基因增强拟南芥对盐胁迫的敏感性 [J]. 安徽农业大学学报, 2019, 46(6):1040-1047.
- [27] ZOU C, JIANG W, YU D. Male gametophyte-specific WRKY34 transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in Arabidopsis [J]. J Exp Bot, 2010, 61(14):3901-3914.
- [28] XIANG Y, HUANG Y, XIONG L. Characterization of stress-responsive *CIPK* genes in rice for stress tolerance improvement [J]. Plant physiology, 2007, 144(3):1416.
- [29] LEE S K, KIM B G, KWON T R, et al. Overexpression of the mitogen-activated protein kinase gene *OsMAPK33* enhances sensitivity to salt stress in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. J Biosci, 2011, 36(1):139-151.
- [30] JIANG Y Z, DUAN Y J, YIN J, et al. Genome-wide identification and characterization of the populus WRKY transcription factor family and analysis of their expression in response to biotic and abiotic stresses [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 9(22):22.

(责任编辑:陈海霞)