

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2022.40513

倪辉, 孙维红, 丁乐, 曾伟伟, 邹双全. 香樟全基因组 *WRKY* 基因家族的鉴定分析[J]. 植物科学学报, 2022, 40(4): 513-523Ni H, Sun WH, Ding L, Zeng WW, Zou SQ. 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

香樟全基因组 *WRKY* 基因家族的鉴定与分析

倪辉^{1,2}, 孙维红^{1,2}, 丁乐^{1,2}, 曾伟伟^{1,2}, 邹双全^{1,2*}

(1. 福建农林大学林学院, 福州 350002; 2. 自然生物资源保育利用福建省高校工程研究中心, 福州 350002)

摘要: *WRKY* 转录因子基因家族是植物特有的一类基因, 在植物次生代谢、生物和非生物胁迫中起着重要的调节作用。本研究通过生物信息学方法, 在香樟(*Cinnamomum camphora* (L.) Presl.) 全基因组中鉴定了 60 个 *WRKY* 基因(*CcWRKY*), 并将其分为 Group I ~ III, 其中, Group I 和 III 的成员发生了收缩现象; 片段复制是 *CcWRKY* 基因扩张的主要驱动力; Group I 有完整的 *WRKY* 结构域和锌指基序, 但 Group II、III 存在结构域和锌指基序的丢失和变异现象; *CcWRKY* 基因的启动子区域具有激素类和胁迫类响应顺式作用元件; 基因表达分析结果显示, 在贫瘠环境(未施肥)中大多数 *CcWRKY* 基因在香樟各个组织中高表达, 而环境适宜(施肥)条件下, 基因表达量降低。

关键词: 香樟; *WRKY* 基因; 转录因子; 生物信息学; 表达谱

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2022)04-0513-11

Identification and analysis of the *WRKY* gene family in whole genome of *Cinnamomum camphora*(L.) Presl.

Ni Hui^{1,2}, Sun Wei-Hong^{1,2}, Ding Le^{1,2}, Zeng Wei-Wei^{1,2}, Zou Shuang-Quan^{1,2*}

(1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Natural Biological Resources Conservation and Utilization, Fujian University Engineering Research Center, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The *WRKY* transcription factor gene family is a class of plant-specific genes that play important regulatory roles in plant secondary metabolism and biotic and abiotic stresses. Through bioinformatic analysis, 60 *WRKY* genes were identified in the whole genome of *Cinnamomum camphora* (L.) Presl., which were divided into Groups I, II, and III. Genes in Group I and Group III were contracted, while segment duplication was the main cause of *CcWRKY* gene expansion. The C terminus and N terminus of Group I contained a complete *WRKY* domain and zinc finger motif, however there is loss and variation of the domain and zinc finger motif in members of Group II and Group III. There were many hormone- and stress-responsive *cis*-acting elements on the promoter of *CcWRKYs*, such as ABA, MeJA, SA, drought induction, and anaerobic-related stress response. Expression analysis showed that most *CcWRKY* genes were highly expressed in various tissues in barren environment (without fertilization), while under suitable environmental (fertilization) conditions, the level of gene expression decreased. This study analyzed the expression patterns of *CcWRKY* genes in response to abiotic stress and provided a theoretical basis for the subsequent functional

收稿日期: 2022-06-08, 修回日期: 2022-06-30。

基金项目: 中央财政林业科技推广示范项目(闽[2020]TG07号); 福建省林业科技项目(2021FKJ19)。

This work was supported by grants from the Central Finance Forestry Science and Technology Promotion Demonstration Project (Min [2020]TG07) and Fujian Forestry Science and Technology Project (2021FKJ19)。

作者简介: 倪辉(1995-)男, 硕士研究生, 研究方向为药用植物栽培与利用(E-mail: 1536195040@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: zou@fafu.edu.cn)。

verification of the *C. camphora* WRKY gene.

Key words: *Cinnamomum camphora*; WRKY; Transcription factor; Bioinformatics; Expression profile

香樟 (*Cinnamomum camphora* (L.) Presl.) 属于樟科、樟属常绿乔木, 主要分布在东亚地区^[1]。其枝叶茂密、冠大荫浓, 能吸烟滞尘、涵养水源、固土防沙和美化环境。香樟的枝、叶、果富含精油, 且精油主要成分是具有“液体黄金”美称的芳樟醇^[2]。同时, 香樟是我国传统中药材, 其根、茎、果等部位均可入药, 具有抗血栓、止痛、消炎、醒脑、抗氧化衰老等作用^[3]。由于香樟重要的经济、生态、园林价值, 其市场需求量很大。香樟生长于肥沃深厚的酸性土壤中, 耐寒性不强, 在生长过程中常遭受极端天气如冻害、干旱等的影响, 制约了其种植面积的扩张, 阻碍了其产业化发展。有研究表明, 对香樟进行合理施肥可提高香樟的生物量, 并增强其对水涝、干旱和病虫害的耐受性^[4]。

最近香樟基因组测序的完成^[5], 有利于我们从基因组层面解析香樟响应非生物胁迫的分子机制。WRKY 转录因子基因家族是植物特有的基因家族, 在生物或非生物胁迫下, WRKY 基因通过参与植物的生理过程对外界环境进行响应^[6]。根据 WRKY 结构域和锌指基序的数量, 可将 WRKY 分为 3 个组 (Group I~ III), Group I 包含两个 WRKY 结构域和 1 个 C2H2 (C-X4-5-C-X22-23-H-X1-H) 锌指基序; Group II 含有 1 个 WRKY 结构域和 C2H2, Group II 根据系统发育关系又可进一步分为 5 个亚组; Group III 也含有 1 个 WRKY 结构域和 C2HC (C-X7-C-X23-H-X1-C)^[7]。3 个组所有 WRKY 成员的 WRKYGQK 都形成了 β 链, 能够特异性结合 W-box^[8]。目前已在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)^[9]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[10]、小麦 (*Triticum aestivum* L.)^[11] 中分别鉴定到了 74、102 和 160 个 WRKY 基因, 在苹果 (*Malus pumila* Mill.)^[12]、毛果杨 (*Populus tomentosa* Carr.)^[13]、石榴 (*Punica granatum* L.)^[14] 中分别鉴定了 127、104、69 个 WRKY 基因。有研究表明, AtWRKY25 和 AtWRKY33 增加了拟南芥对盐胁迫的耐受程度, 同时也增加了对脱落酸的敏感性^[15]。水稻中 OsWRKY11 的异位表达提高了其对热胁迫和干旱胁迫的适应^[16]。TaWRKY2 和 TaWRKY19 在转基因

拟南芥中增强了其对干旱、盐和冷胁迫的耐受性^[17]。而苹果的 10 个 WRKY 基因在水涝和干旱中均有差异表达, 可能参与了水涝和干旱胁迫响应^[12]。但在香樟中的相关研究还很缺乏。

本研究从香樟基因组中挖掘了 WRKY 基因家族成员, 并对其进化关系、基因结构、共线性、顺式作用元件等进行了分析, 同时分析了这些基因在不同施肥处理下的组织表达模式, 以期为深入解析香樟应对非生物胁迫的分子机制、扩大香樟的种植范围、助推香樟产业的可持续发展提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 CcWRKY 基因家族成员的鉴定和蛋白结构域验证

香樟基因组数据由本课题组所测, 通过在 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 中下载 WRKY 基因家族的 HMM 3.1 版本的模型, Pfam (PF03106) 筛选香樟全基因组中的 WRKY 蛋白, E-value 值为 10^{-10} , 利用 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/domains-structures/>)、Pfam 和 SMART (<http://smart.embl.de/>) 等在线网站对 WRKY 基因家族蛋白序列进行结构域验证, 保留含有 WRKY 结构域的基因, 最终从香樟全基因组蛋白文件中筛选出 60 个 CcWRKY 基因家族成员。

1.2 CcWRKY 家族成员蛋白的基础分析

利用 ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/) 对 CcWRKY 家族成员进行等电点、相对分子质量、氨基酸长度等理化性质分析; 利用 Prabi (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 在线软件进行蛋白质二级结构分析; 利用 Euk-mPLoc2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>) 网站进行亚细胞定位, 利用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 网站进行信号肽预测。

1.3 CcWRKY 家族的进化分析

从拟南芥官网 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 中下载拟南芥 WRKY 家族的蛋白序列, 利用 Clustal W 软件, 对 72 个拟南芥 WRKY 蛋白

序列和 60 个香樟 *WRKY* 蛋白序列进行多序列比对; 采用 MEGA 7.0 软件基于邻接法 NJ (Neighbor-joining) 构建进化树, 利用 Evolview (<https://evolgenius.info//evolview-v2/login>) 网站对进化树进行美化。根据拟南芥已有的分组对 *CcWRKY* 家族成员进行聚类分析。

1.4 *CcWRKY* 基因家族保守基序与基因结构分析

利用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>) 网站对 *CcWRKY* 家族 60 个成员蛋白序列进行保守 Motif 预测, Motif 个数设为 15 个, 对预测的 *WRKY* Motif 用 WEBLOGO (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) 进行示意图绘制, 采用 Tbtools 软件对保守 Motif 进行可视化; 利用 GSDS (Gene Structure Display Server, <http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) 网站绘制基因结构示意图。

1.5 共线性分析

从 Ensemble (<https://plants.ensembl.org/index.html>) 网站分别下载拟南芥、水稻、葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 和毛果杨的全基因数据, 用 MC-ScanX 软件进行物种间共线性分析, 采用 Tbtools 软件进行可视化。

1.6 启动子顺式作用元件分析

利用 Perl 脚本提取香樟基因组文件 1500 bp 的启动子序列, 通过 Plant Care (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对顺式作用元件进行分析, 利用 TBtools1.098726 软件对其结果进行可视化。

1.7 施肥处理

在福建省安溪国有林场 (24°55'N, 117°57'E) 进行施肥试验。样地理化性质为: 全钾 4.27 g/kg, 速效钾 23.03 mg/kg, 碱解氮 24.43 mg/kg, 有效磷 32.33 mg/kg, 全磷 0.68 g/kg, pH 值 5.66, 有机质 4.95 g/kg。样地养分低于南方土壤养分的各指标平均值, 较为贫瘠。以厦门牡丹香化实业公司培育的香樟优质品系‘芳香樟无性系 MD1’2 年生种苗作为实验材料, 香樟地径 14.7~15.9 mm, 树高 75~77 cm, 冠幅 80 cm 左右。根据前期研究结果, 确定香樟最适生物炭配施氮磷钾肥配方进行施肥试验, 配方为: 生物炭 3.40 g (购自

四川省久晟农业有限责任公司)、尿素 115.00 g (总氮含量 $\geq 46\%$; 购自安阳中盈化肥有限公司)、过磷酸钙 15.00 g (过磷酸钙含量 $\geq 16\%$; 购自瓮福有限责任公司)、氯化钾 15.00 g (氯化钾 $\geq 60\%$; 购自中国农业生产资料集团公司)。

于 2020 年 6 月中旬进行一次施肥处理, 施肥量为 148.4 g/株, 共 3 个处理, 每个处理 15 株, 对照组不施肥。4 个月后分别取施肥和未施肥的生长健壮无病虫害的茎、嫩叶和老叶的混样进行转录组测序。利用 Tbtools 软件对转录组 FPKM 数据进行可视化。

2 结果与分析

2.1 *CcWRKY* 的鉴定及其编码蛋白的理化性质

本研究从香樟基因组鉴定了 60 个 *CcWRKY* 基因, 根据基因在染色体上的分布位置, 依次将其命名为 *CcWRKY*1~60 (附表 1¹⁾)。理化性质分析结果表明, *CcWRKY* 基因家族编码产物的氨基酸数量在 111 (*CcWRKY*31)~916 (*CcWRKY*2); 蛋白质分子量在 12558.1 (*CcWRKY*31)~100435.6 Da (*CcWRKY*2); 等电点在 4.53 (*CcWRKY*29)~10.65 (*CcWRKY*43); α 螺旋在 7.38% (*CcWRKY*6)~32.77% (*CcWRKY*3), 无规则卷曲在 45.11% (*CcWRKY*1)~78.07% (*CcWRKY*6), β 转角在 0.99% (*CcWRKY*52)~9.13% (*CcWRKY*33), 延伸链在 5.81% (*CcWRKY*38)~21.62% (*CcWRKY*31); *CcWRKY* 家族所有成员均无信号肽; 经亚细胞定位预测, 除了 *CcWRKY*16 定位于细胞核和细胞质中, 其余 59 个 *CcWRKY* 均定位于细胞核中。

2.2 *CcWRKY* 的系统进化分析

对 74 个拟南芥和 60 条香樟 *WRKY* 家族成员构建系统进化树, 结果显示它们可分为 3 大组 (图 1)。其中, Group I 包含 11 个 *CcWRKY* 成员, 均含有 2 个 BDB 和 C2H2 的锌指基序, 根据结构域又可分为 Group I-N 和 Group I-C 端; Group II 组有 42 个 *CcWRKY* 成员, 可继续分为 5 个亚组 (Group II-a ~ Group II-e); 剩下的 7 个 *CcWRKY* 成员划分在 Group III。

蛋白序列比对分析结果显示, 大部分 *CcWRKY* 结构域比较保守, 但仍存在一些特异的变异 (图 2)。

1) 如需查阅附表内容请登录《植物科学学报》网站 (<http://www.plantscience.cn>) 查看本期文章。

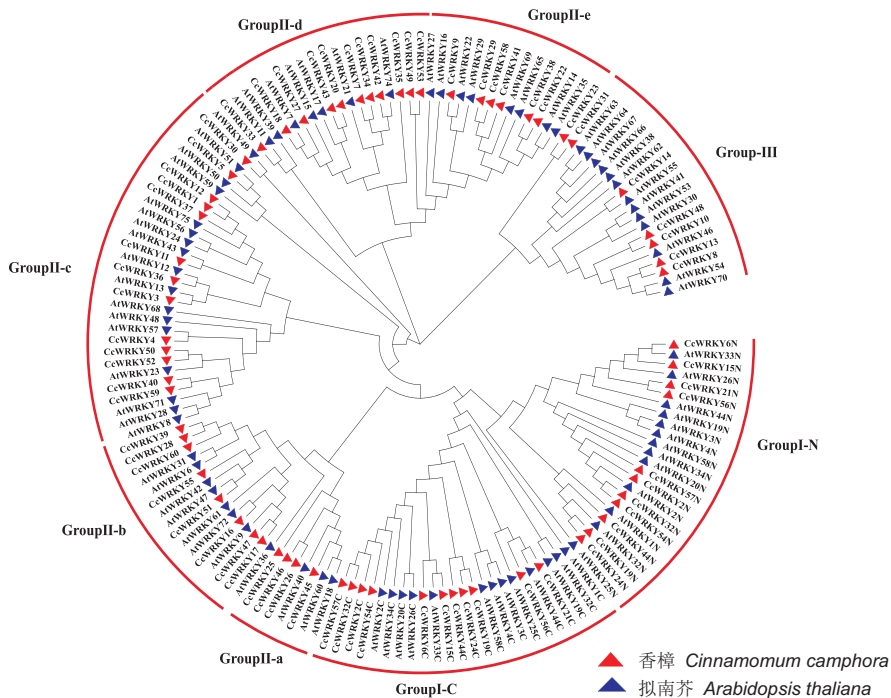
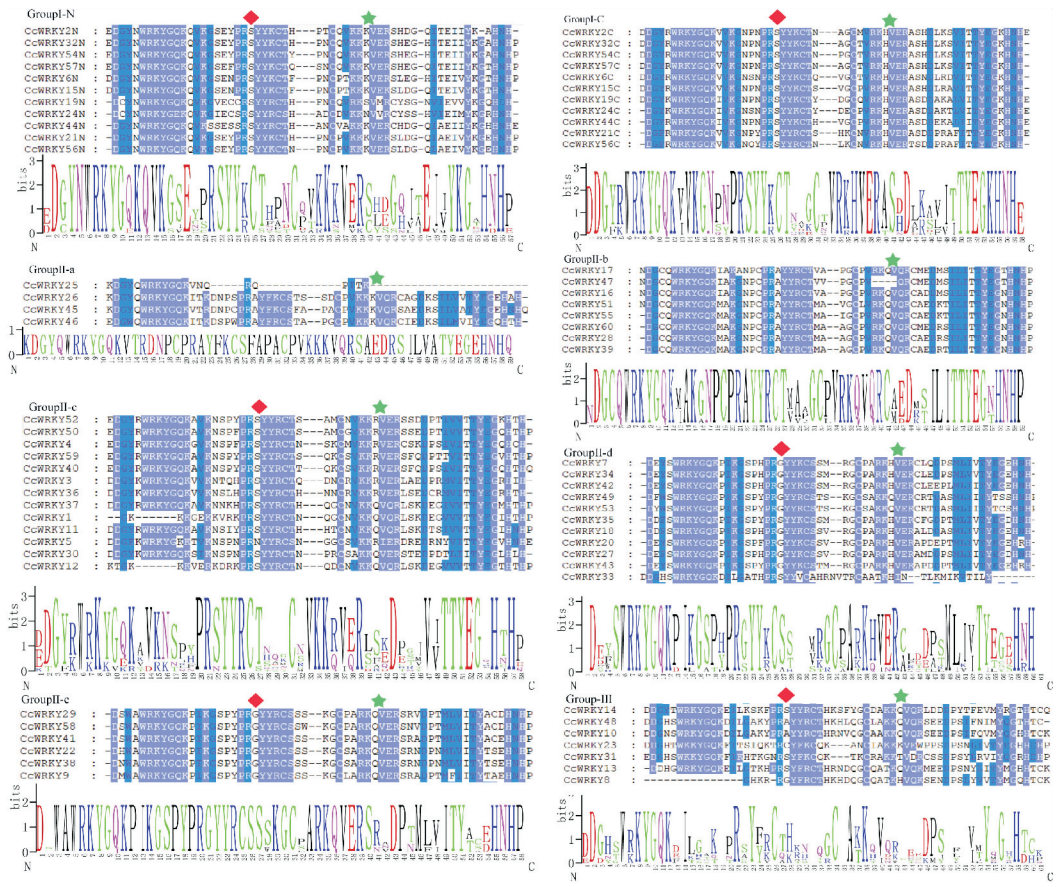


图 1 AtWRKY 与 CcWRKY 家族成员进化树构建
Fig. 1 Coustruction of evolutionary tree with AtWRKY and CcWRKY family members



红色菱形代表 R 型内含子；绿色星形代表 V 型内含子。
Red diamonds represent R-type introns; Green stars represent V-type introns.

图 2 CcWRKY 家族成员多序列比对
Fig. 2 Multiple sequences alignment of CcWRKY family

其中, Group I 所有成员拥有 N 和 C 类结构域; 而 Group II-c 中的 *CcWRKY1*、*CcWRKY12* 和 Group III 中的 *CcWRKY8* 存在结构域丢失现象。*CcWRKY* 保守位点的 *WRKYGQK* 变成了 *GRKYGKK*, 推测这种变异可能产生了一些新的生物学功能^[13]。此外, *WRKY* 结构内存在 R 型和 V 型内含子。R 型内含子用于编码 R 位点, 主要位于三联子密码 *AGG* 的 *GG* 之间(图 2), V 型内含子主要位于 C2H2 锌指结构第 2 个 C 后 6 个位点(图 2)。在锌指基序方面, *CcWRKY33* 的锌指基序 C2H2 发生了丢失, Group III 的锌指基序为 C2HC, 但 *CcWRKY23* 和 *CcWRKY31* 发生了变异现象, 由原来的 C2HC 变成了 C2H2。

2.3 *CcWRKY* 保守基序和基因结构

通过 MEME 网站对香樟 *CcWRKY* 家族的 Motif 进行在线预测, 共鉴定出 15 个保守 Motif, 其中 Motif3 和 Motif1 分别位于 Group I 组的 N 端和 C 端。Motif10、Motif12、Motif6 和 Motif13 都在

WRKY 结构域附近, 而其他 Motif 如 Motif14、Motif2、Motif4、Motif7 和 Motif9 位于 *WRKY* 结构域; Motif1 和 Motif2 成对出现, 表明它们在功能上和亚组相关; 而 Motif14、Motif15 在 7 个亚组中无规律分布。总的来说同一亚组成员具有共同的 Motif。

基因结构分析结果显示, Group II-e 中所有成员均含有 3 个外显子, 基因结构保守。但不同组之间外显子个数存在差异, 如 Group I 大多数成员有 7 个外显子, Group II-c 成员多有 3 个外显子。此外, 大部分 Group II-d 成员拥有 2 个内含子。相应地, 不同组之间的内含子个数也存在差异, 如 Group II-e 含有 2 个内含子, Group I 含有 4 ~ 7 个内含子; Group II -c 的 *CcWRKY12*、*CcWRKY37*、*CcWRKY11* 和 Group III 的 *CcWRKY31* 仅有 1 个内含子(图 3)。由此可见, 同组内 *CcWRKY* 的基因内含子和外显子结构相似, 不同组间的内含子和外显子结构差异较大。



从左到右依次为香樟 *WRKY* 基因家族进化树、保守基序、基因结构。
From left to right is evolutionary tree, conserved motifs, and gene structure of *CcWRKY* gene family.

图 3 *CcWRKY* 基因家族基因结构分析
Fig. 3 Gene structure analysis of *CcWRKY* gene family

2.4 CcWRKY 的染色体分布及基因复制事件

对基因进行染色体定位分析, 结果显示, 60 个香樟 *CcWRKY* 基因非均匀分布在 12 条染色体上。Chr2 上最多, 有 11 个, 其次是 Chr4 (9 个), Chr9 上最少, 仅 1 个 (图 4)。根据 Holub^[18] 的描述, 200 kb 内包含两个及以上基因的染色体区域可以定义为基因簇, 位于同一染色体上的两个或多个相邻同源基因被认为是串联复制事件, 而位于不同染色体上的同源基因对被定义为片段复制。本研究发现, 位于 Chr2 上的 *CcWRKY13* 和 *CcWRKY14* 为串联重复基因; 除 Chr9 外, 其余 11 条染色体上均存在着大量的片段复制基因 (图 4)。为了了解 *CcWRKY* 在进化过程是否受到自然选择作用, 对串联重复基因和片段复制基因进行 K_a/K_s 分析。 $K_a/K_s > 1$, 说明基因受到正向选择; $K_a/K_s = 1$, 认为基因发生了中性选择; 而 $K_a/K_s < 1$ 表明基因进行了纯化选择。在香樟的 *CcWRKY*

基因中, 发生复制的基因的 K_a/K_s 均 < 1 , 因此推测香樟在进化过程中通过纯化选择消灭了有害突变位点。

此外, 对香樟与水稻、拟南芥、葡萄和毛果杨等 4 个代表性模式植物进行了共线性分析。结果表明, 香樟有 36 个 *CcWRKY* 基因与水稻形成共线性基因对, 与拟南芥有 33 对共线性基因, 与葡萄有 56 对共线性基因, 与毛果杨有 106 对共线性基因 (图 5)。在香樟和毛果杨的共线染色体上可以找出至少 3 对及以上的共线性基因, 如香樟 2 号染色体上的 *CcWRKY7* 和 *CcWRKY15*。香樟和毛果杨的共线性基因对被锚定在高度保守的区块间, 这些区块跨越 100 多个基因。而香樟和水稻、拟南芥之间的共线区块的基因则少于 40 对。此外, 4 个物种的直系同源 *WRKY* 基因的 K_a/K_s 均 < 1 , 表明 *CcWRKY* 基因家族和其直系同源基因对进行了强烈的纯化选择。

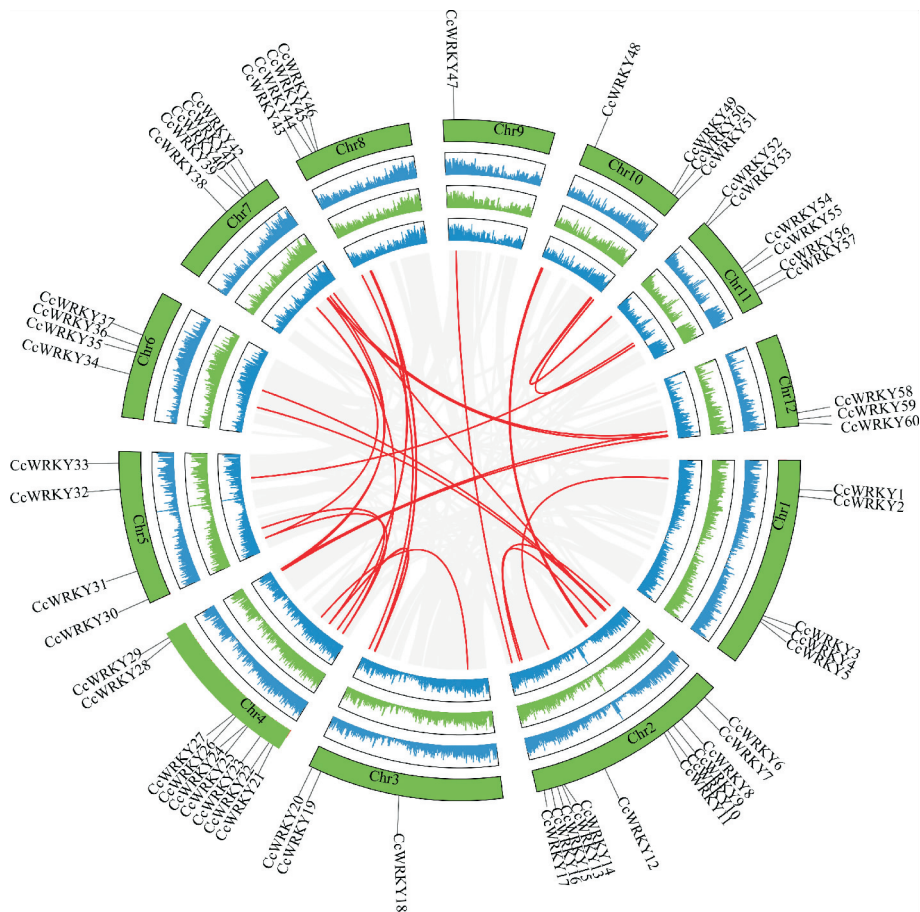


图 4 *CcWRKY* 基因家族片段复制事件
Fig. 4 *CcWRKY* gene family segment duplication events

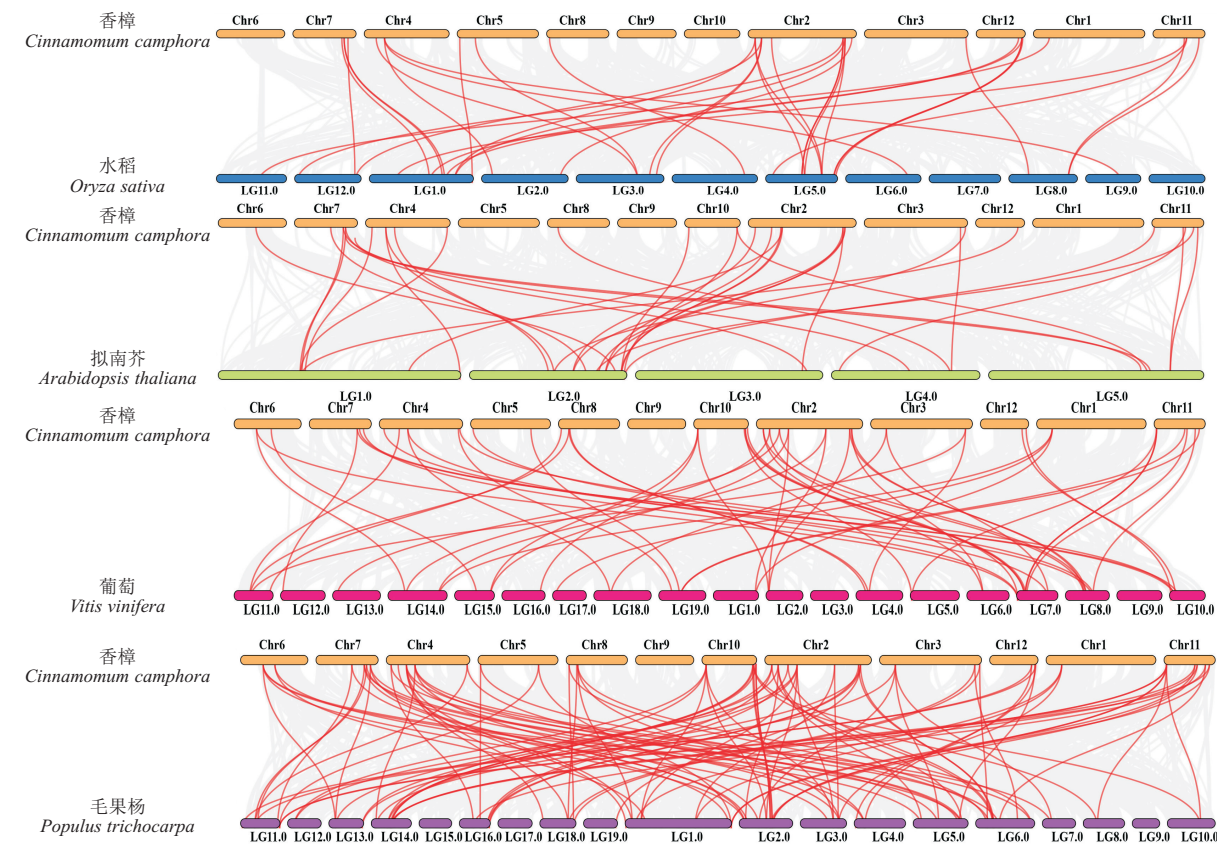


图 5 香樟与其他模式植物 *WRKY* 基因家族的共线性分析

Fig. 5 Collinearity analysis of *WRKY* gene family between *Cinnamomum camphora* and other model plants

2.5 *CcWRKY* 基因家族启动子顺式作用元件分析

提取香樟 *CcWRKY* 基因上游 1500 bp 的启动子区域，进行顺式作用元件分析。结果显示，启动子区域除核心的增强元件、转录起始元件和 *WRKY* 结合位点元件之外，还存在 12 种顺式作用元件。其中 5 种是激素类响应相关元件，分别为脱落酸 (ABA)、茉莉酸甲酯 (MeJA)、赤霉素 (GA)、生长素 (IAA) 和水杨酸 (SA) 响应元件 (图 6)。在 60 个 *CcWRKY* 成员中，有 41 个含有 ABA 响应相关的元件，37 个含有 MeJA 响应相关的元件，20 个含有与 GA 响应有关的顺式作用元件，10 个含有 IAA 响应相关的作用元件，19 个含有和 SA 响应有关的顺式作用元件。此外，49 个基因含有厌氧诱导元件，28 个基因含有干旱诱导性元件，40 个基因含有光响应作用元件，16 个基因含有低温响应作用元件，10 个基因存在节律相关的作用元件。这些结果表明 *CcWRKY* 的大多数顺式作用元件都和胁迫有关，*CcWRKY* 在参与逆境胁迫应答中可能发挥重要作用。

2.6 施肥处理对 *CcWRKY* 基因家族的表达影响

对 *CcWRKY* 基因在施肥前后香樟不同部位的表达水平进行分析，结果显示，未施肥对照组中，每个 *CcWRKY* 基因至少在 1 个组织部位表达，在茎和嫩叶中高表达的基因数量比在老叶中的多 (图 7: a)。嫩叶中有 34 个高表达的基因，主要分布在 Group III、Group II-b ~ Group II-e 中；茎中有 24 个基因高表达，主要分布于 Group I、Group II-b 和 Group II-d；老叶中有 14 个高表达的基因。以生物炭配施氮磷钾肥 4 个月后，*CcWRKY* 基因的表达量整体下调，大多数基因仍在茎和嫩叶中表达，与未施肥处理形成了鲜明的对比 (图 7: b)。如 Group III 中的 *CcWRKY48*、*CcWRKY10*、*CcWRKY33*、*CcWRKY8*、*CcWRKY13*、*CcWRKY14*、*CcWRKY31* 和 *CcWRKY23* 等基因在施肥后的嫩叶里表达量均显著下调；Group I 里的多数基因在施肥后表达量也降低，如 *CcWRKY32*、*CcWRKY21*、*CcWRKY44* 和 *CcWRKY19* 等。

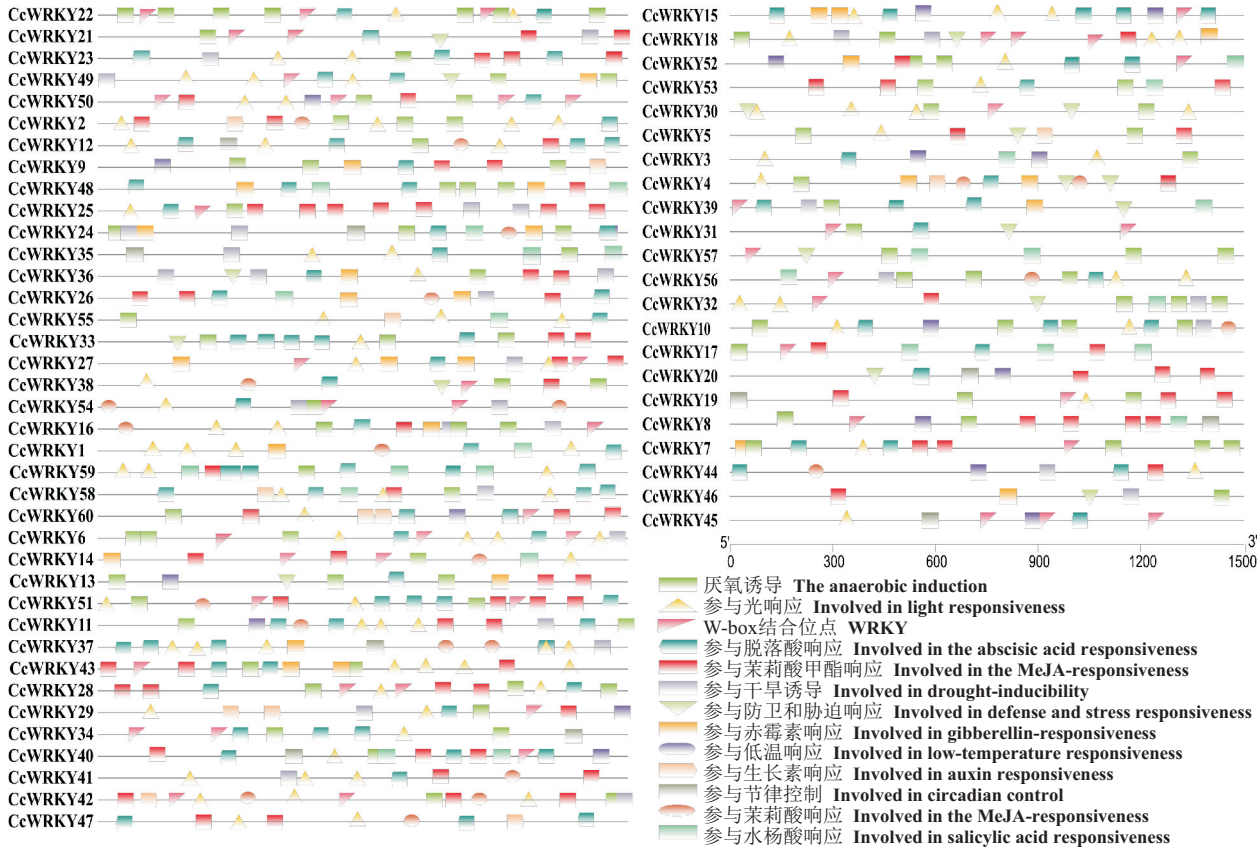
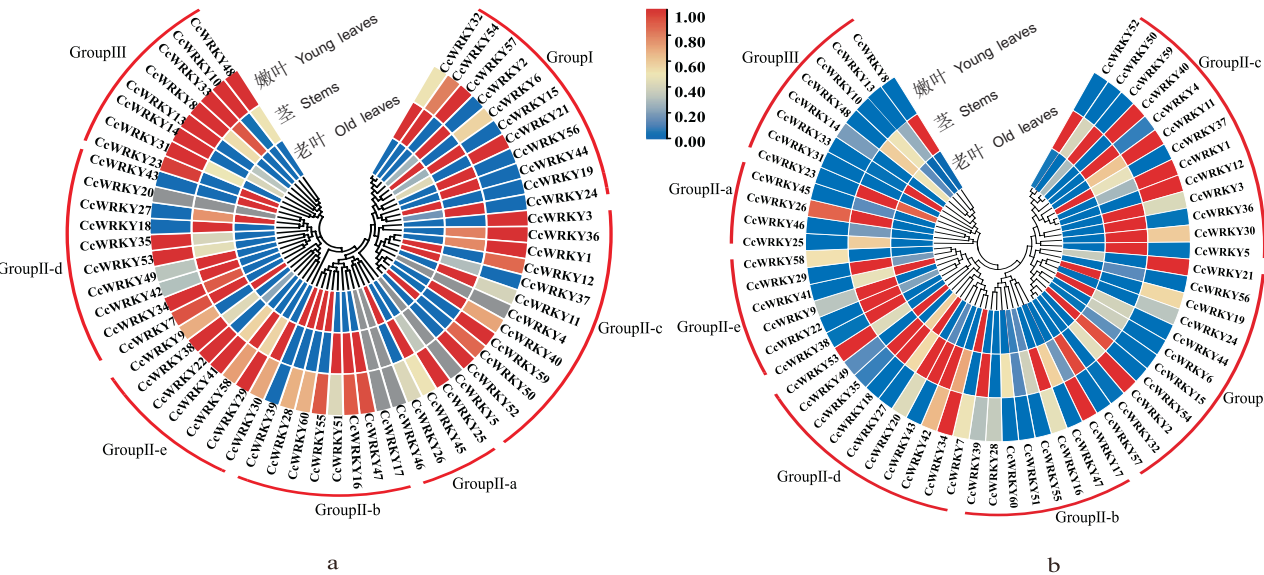


图 6 *CcWRKY* 基因家族顺式作用元件分析
Fig. 6 Analysis of *cis*-acting elements of *CcWRKY* gene family



a: 未施肥的香樟 *WRKY* 基因的表达水平; b: 施肥后香樟 *WRKY* 基因的表达水平。
a: Expression of *CcWRKY* gene before fertilization; b: Expression of *CcWRKY* gene after fertilization.

图 7 *CcWRKY* 基因家族在香樟施肥前后的表达量热图

Fig. 7 Heat map of *CcWRKY* gene family expression under different fertilization treatments

3 讨论

本研究从香樟中鉴定了 60 个 *CcWRKY* 基因家族成员, 与可可 (*Theobroma cacao* L.)^[19] (61 个)、葡萄^[20] (59 个) 中数量相近, 但比拟南芥^[7] (74 个)、水稻^[8] (102 个) 中少。研究表明, 草本植物的 *WRKY* 基因数量比木本多, 可能与物种的生长环境不同有关^[21]。本研究根据 N 端和 C 端具有的平行结构域构建了拟南芥和香樟 *WRKY* 基因的无根树, 将 *CcWRKY* 分为 3 组, 其中 Group II 有 5 个亚家族。水稻^[8] 和毛果杨^[9] *WRKY* 基因系统发育分析中将 Group I 分为 Group I a 和 Group I b 端, 是以 N 端结构域丢失、C 端都含有 1 个保守的内含子作为分组依据。而本研究鉴定的 Group I 的 11 个成员在 N 端均没有发生结构域丢失现象。香樟中有 11 个 *WRKY* 基因划分在 Group I 中, 而拟南芥、水稻、毛果杨分别有 34、32 和 26 个; 香樟仅有 7 个基因划分在 Group III 中, 而拟南芥、水稻、毛果杨分别为 14、36 和 10 个^[8, 9]。这些结果说明香樟 Group I 和 Group III 的成员发生了收缩。此外, 基于染色体定位分析, 认为 *CcWRKY* 基因家族中片段复制是其扩张的主要驱动力, 类似事件在毛果杨和石榴中也有发现^[9, 10]。

多序列比对结果表明, *CcWRKY* 家族在 N 端和 C 端具有保守的 *WRKYGQK* 七肽位点, 在其 C 端有 C2H2 和 C2HC 的锌指基序。其中, Group I 的 C 端和 N 端均有完整的 *WRKY* 结构域和锌指基序, 但 Group II 和 Group III 存在结构域和锌指基序的丢失和变异现象, 如 Group II-c 中 *CcWRKY1*、*CcWRKY12* 和 Group III 中 *CcWRKY8* C 端的结构域丢失。有关研究表明 Group III 的 *WRKY* 基因只存在于有花高等植物中, 且在植物进化过程中 Group II 和 Group III 中的成员由 Group I 的 C 端和 N 端结构域和锌指基序丢失或变异演变而来^[4]。因此, *CcWRKY1*、*CcWRKY12* 和 *CcWRKY8* 结构域的丢失可能促进了香樟 *CcWRKY* 基因家族的扩张。此外, *CcWRKY5* 编码产物的保守七肽位点 *WRKYGQK* (Gln 残基) 变成了 *WRKYGKK* (Lys 残基); 烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 中 *NtWRKY12* 编码产物变成了 *WRKYGKK* 后, 通过水杨酸和病原体的诱导后发现原本能结合

W-box (TTGACT/C) 的区域却与 TTTTCCAC 结合, 从而产生新的功能^[22]。香樟的 *CcWRKY5* 变异也可采用上述方法验证其潜在的新功能。锌指基序的作用相当于螯合剂, 缺少锌指基序会降低 W-box 结合能力或产生新的生物学功能^[5]。香樟 *CcWRKY33*、*CcWRKY23* 和 *CcWRKY31* 的锌指基序发生了丢失或变异, 可能因此丧失了原先结合结构域的功能而产生新的生物学功能。

WRKY 基因参与多种植物的冷、干旱、盐等非生物胁迫响应。在香樟 *CcWRKY* 基因 1500 bp 的启动子区域内存在大量的激素类响应和胁迫类响应顺式作用元件, 如 ABA、MeJA、SA 和干旱诱导、厌氧相关胁迫类响应等, 表明香樟 *WRKY* 基因可能参与非生物胁迫响应^[23]。本研究发现, *CcWRKY45* 与 *AtWRKY18*、*AtWRKY60* 聚在一起, 而 *AtWRKY18*、*AtWRKY60* 通过互作可抑制 *ABI4* 和 *ABI5* 的活性, 从而弱化 ABA 的信号^[24]。*CcWRKY45* 在香樟老叶中高表达, 可能介导 ABA 代谢通路, 延长老叶的生长期, 积累更多的光合产物。

基因表达分析结果显示, 在未施肥处理中, *CcWRKY* 基因主要在香樟茎和嫩叶中表达, 施肥后在嫩叶和茎中高表达的基因比施肥前的数量和表达量都有所减少和下调。这可能因为较嫩的组织能迅速感应胁迫信号并做出相应的反应。未施肥处理中, *CcWRKY33* 和 *CcWRKY52* 在嫩叶中高表达, *CcWRKY51* 在茎中高表达, *CcWRKY43* 在老叶中高表达; 而施肥处理中, 这些基因的表达水平均下降。*CcWRKY33* 和 *CcWRKY52* 分别是 *AtWRKY11* 和 *AtWRKY23* 的同源基因, 而 *AtWRKY11* 能够增强拟南芥对干旱、盐等非生物胁迫的耐受性^[25], *AtWRKY23* 可以增强拟南芥对囊胞线虫的抵御^[26]。因此, 推测 *CcWRKY33* 和 *CcWRKY52* 可能在香樟嫩叶中也响应非生物胁迫或生物胁迫。*CcWRKY51* 是 *AtWRKY47* 的同源基因, 抑制 *AtWRKY47* 可增加拟南芥对硼的拮抗作用, 提高植株的耐受程度^[27]; *CcWRKY43* 是 *AtWRKY17* 的同源基因, *AtWRKY17* 具有抑制 ABA 合成和提高拟南芥盐胁迫的能力^[25], 因此推测 *CcWRKY51*、*CcWRKY43* 可能也具有响应硼和盐等非生物胁迫的功能。由此可见, 香樟在贫瘠的环境 (未施肥) 中, 大多数 *CcWRKY* 基因就会进行高表达来抵御

不利的外界环境,而环境适宜(施肥)时,大多数 *CcWRKY* 基因的表达量降低。

参考文献:

- [1] 龙汉利,梁国平,辜云杰,李晓清,罗建勋. 四川香樟人工林生长特性研究[J]. 四川林业科技, 2011, 32(4): 1–4.
Long HL, Liang GP, Gu YJ, Li XQ, Luo JX. Study of growing characteristics of *Cinnamomum camphora* plantations in Sichuan[J]. *Journal of Sichuan Forestry Science and Technology*, 2011, 32(4): 1–4.
- [2] 石皖阳,何伟,文光裕,郭德选,龙光远,刘银苟. 樟精油成分和类型划分[J]. 植物学报, 1989, 31(3): 209–214.
- [3] 江燕,章银柯,应求是. 我国芳香植物资源、开发应用现状及其利用对策[J]. 中国林副特产, 2007(5): 64–67.
Jiang Y, Zhang YK, Ying QS. The aroma plant resources, current development and utilization measures in China[J]. *Forest By-Product and Speciality in China*, 2007(5): 64–67.
- [4] 余盛. 不同施肥处理对香樟造林生长的影响[J]. 安徽农学通报, 2021, 27(16): 75–76.
- [5] Shen TF, Qi HR, Luan XY, Xu WL, Yu FX, *et al.* The chromosome-level genome sequence of the camphor tree provides insights into Lauraceae evolution and terpene biosynthesis[J]. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20(2): 244–246.
- [6] Ulker B, Somssich IE. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7(5): 491–498.
- [7] Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(5): 196–206.
- [8] Yamasaki K, Kigawa TK, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S. DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution [J]. *Trends Plant Sci*, 2013, 18(5): 267–276.
- [9] Eulgem T, Somssich IE. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 4(10): 366–371.
- [10] Ross CA, Liu Y, Shen QJ. The *WRKY* gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. *J Integr Plant Biol*, 2007, 6(49): 827–842.
- [11] Gupta S, Mishra VK, Kumari S, Raavi, Chand R, *et al.* Deciphering genome-wide *WRKY* gene family of *Triticum aestivum* L. and their functional role in response to abiotic stress[J]. *Genes genom*, 2019, 41(1): 79–94.
- [12] Meng D, Li YY, Bai Y, Cheng LL. Genome-wide identification and characterization of *WRKY* transcriptional factor family in apple and analysis of their responses to waterlogging and drought stresses [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016(103): 71–83.
- [13] He HS, Dong Q, Shao YH, Jiang HY, Zhu SW, *et al.* Genome-wide survey and characterization of the *WRKY* gene family in *Populus trichocarpa* [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(7): 1199–1217.
- [14] 任媛,赵玉洁,张心慧,招雪晴,苑兆和. 石榴 *WRKY* 基因家族全基因组鉴定与表达分析[J]. 西北植物学报, 2020, 2(40): 218–231.
Ren Y, Zhao YJ, Zhang XH, Zhao XQ, Yuan ZH. Genome-wide identification and expression analysis of *WRKY* gene family in *Pomegranate* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, 2(40): 218–231.
- [15] Jiang YQ, Deyholos MK. Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible *WRKY25* and *WRKY33* transcription factors in abiotic stresses [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 69(1–2): 91–105.
- [16] Lee HY, Cha JY, Choi CY, Choi NY, Ji HY, *et al.* Rice *WRKY11* plays a role in pathogen defense and drought tolerance[J]. *Rice*, 2018, 11(1): 1–12.
- [17] Niu CF, Wei W, Zhou QY, Tian AG, Hao YJ, *et al.* Wheat *WRKY* genes *TaWRKY2* and *TaWRKY19* regulate abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Plant Cell Environ*, 2012, 35(6): 1156–1170.
- [18] Holub EB. The arms race is ancient history in *Arabidopsis*, the wildflowers [J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(7): 516–27.
- [19] Almeida DSMD, Amaral DOJ, Del-Bem LE, Santos EBD, Silva RJS, *et al.* Genome-wide identification and characterization of cacao *WRKY* transcription factors and analysis of their expression in response to witches' broom disease [J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0187346.
- [20] Guo CL, Guo RG, Xu XZ, Gao M, Li XP, *et al.* Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) *WRKY* gene family [J]. *J Exp Bot*, 2014, 65(6): 1513–1528.
- [21] Wu ZJ, Li XH, Liu ZW, Li H, Wang YX, *et al.* Transcriptome-wide identification of *Camellia sinensis* *WRKY* transcription factors in response to temperature stress [J]. *Mol Genet Genomics*, 2016, 291(1): 255–269.
- [22] Van V, Marcel C, Pappaioannou D, Neeleman L, Bol JF, Linthorst HJM. A novel *WRKY* transcription factor is required for induction of *PR-1a* gene expression by salicylic acid and bacterial elicitors [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146(4): 1983–1995.
- [23] Wang PJ, Yue C, Chen D, Zheng YC, Zhang Q, *et al.* Genome-wide identification of *WRKY* family genes and their response to abiotic stresses in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Genes Genom*, 2019, 41(1): 17–33.

- [24] Liu ZQ, Yan L, Wu Z, Mei C, Lu K, *et al.* Cooperation of three WRKY-domain transcription factors WRKY18, WRKY40, and WRKY60 in repressing two ABA responsive genes *ABI4* and *ABI5* in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(2): 695–709.
- [25] Ali MA, Azeem F, Nawaz MA, Acet TB, Abbas AJ, *et al.* Transcription factors WRKY11 and WRKY17 are involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis* [J]. *J Plant Physiol*, 2018 (226): 12–21.
- [26] Grunewald W, Karimi M, Wiecezorek K, Cappelle EVD, Wischnitzki E, *et al.* A role for AtWRKY23 in feeding site establishment of plant-parasitic nematodes [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(1): 358–368.
- [27] Feng YG, Cui R, Huang YP, Shi L, Wang SL, *et al.* Repression of transcription factor AtWRKY47 confers tolerance to boron toxicity in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 220(6): 112406.

(责任编辑：李惠英)