西北植物学报,2023,43(9):1470-1477
Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.

doi:10.7606/j.issn.1000-4025.2023.09.1470 http://xbzwxb.alljournal.net

枇杷成花相关基因 *EjWRKY12* 序列特性及表达分析

张苇胤[1,2],王素琴[1,2],马崇坚[1],原　远[1],杨晓燕[1],蒋园园[1*]

(1 韶关学院 生物与农业学院,广东韶关 512005;2 华南农业大学 园艺学院,广州 510642)

摘　要:WRKY 家族是植物中特有且最大的基因家族之一,参与了植物生长发育的各个方面,但在枇杷中尚未见 *WRKY12* 的相关报道。研究采用同源克隆法从枇杷芽及叶中克隆得到枇杷 *EjWRKY12* 基因,利用生物信息学分析方法对该基因理化性质、蛋白质结构、进化关系、启动子区顺式作用元件等进行分析,并结合转录组数据对其表达模式进行分析。结果表明,枇杷 *EjWRKY12* 基因长度为 711 bp,共编码 236 个氨基酸;比对得到的同源基因大多与成花相关,暗示 *EjWRKY12* 可能参与枇杷成花;启动子区分析暗示其可能受到光、MeJA、生长素等因素的调控;EjWRKY12 蛋白定位在细胞核;外源 GA_3 处理后,叶片中处理组和对照组的 *EjWRKY12* 表达量及表达趋势变化不大,但顶芽中对照组的 *EjWRKY12* 在成花关键时期表达量最低,在 GA_3 处理后该基因表达量随着处理时间的延长一直上升,暗示其可能是一个抑制成花、促进营养生长的转录因子。本研究克隆得到 *EjWRKY12* 基因,对进一步解析枇杷成花调控的分子机制具有指导意义。

关键词:*EjWRKY12*;枇杷;基因克隆;表达分析

中图分类号:Q943.2; Q786; Q785　　**文献标志码**:A

Sequence Characteristics and Expression Analysis of Flowering-related Gene *EjWRKY12* in *Eriobotrya japonica*

ZHANG Weiyin[1,2], WANG Suqin[1,2], MA Chongjian[1], YUAN Yuan[1], YANG Xiaoyan[1], JIANG Yuanyuan[1*]

(1 College of Biology and Agriculture, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512005, China; 2 College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The WRKY family is one of the largest and unique gene families in plants, and it is involved in various aspects of plant growth and development, while there weren't reports on *WRKY12* in loquat. In this study, the *EjWRKY12* gene was cloned from loquat buds and leaves using homologous cloning, and its physical and chemical properties, protein structure, evolutionary relationship, and *cis*-acting elements in the promoter region were analyzed using bioinformatics. The expression pattern of the gene was also analyzed in combination with transcriptome data. The results showed that the *EjWRKY12* gene in loquat was 711 bp in length and encoded 236 amino acids. The homologous genes obtained by comparison were mostly related to flowering, suggesting that *EjWRKY12* may be involved in loquat flowering. Promoter

收稿日期:2023-03-31;**修改稿收到日期**:2023-05-22

基金项目:广东省自然科学基金项目(2021A1515011048);韶关市科技计划项目(200811094530739);广东省教育厅普通高校青年创新人才项目(2020KQNCX075)

作者简介:张苇胤(1999-),女,在读硕士研究生,主要从事果树种质资源创新与育种研究。E-mail:869407972@qq.com

* 通信作者:蒋园园,讲师,主要从事果树分子与发育生物学研究。E-mail:yyjiang613@163.com

analysis indicated that it might be regulated by light, MeJA, and auxin. EjWRKY12 protein was localized in the nucleus. After exogenous GA_3 treatment, there was no significant difference in the expression level and trend of *EjWRKY12* in leaves between the treatment group and the control group. However, in the apical bud, the expression level of *EjWRKY12* in the control group was the lowest during the critical period of flowering. After GA_3 treatment, the expression level of the gene increased continuously with the addition of treatment time, indicating that it may be a transcription factor that inhibits flowering and promotes vegetative growth. This study cloned the *EjWRKY12* gene and had guiding significance for further elucidating the molecular mechanism of loquat flowering regulation.

Key words: *EjWRKY12*; loquat; gene cloning; expression analysis

枇杷（*Eriobotrya japonica* Lindl.）原产于我国[1]，属蔷薇科枇杷属常绿果树，主要分布于福建、江苏、四川、浙江、陕西等省区。枇杷营养价值高，市场前景广阔，有“早熟第一果”的美誉。蔷薇科植物的成花转变时间和开花时间通常不在同一年内发生，这种现象在苹果、梨、草莓等植物中都会出现，它们在夏秋季节花芽的分化，花芽在经过休眠后第 2 年春季开花[2]。虽然枇杷花芽分化的起始时间与苹果和梨相同，均发生在 6 月至 7 月，但是枇杷花芽的发育是连续的，不经历休眠，于秋冬开花[3]。枇杷这种特殊的开花习性，暗示其在进化过程中可能产生了不同于其他木本植物的成花调控机制。

植物可以准确地感知周围环境的光周期变化并调节开花时间[4]；此外，温度、植物年龄和赤霉素（GA）信号也会影响植物开花[5]。这些信号之间不是独立的，它们由许多成花整合因子整合，如 *FLOWERING LOCUS T*（*FT*）和 *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*（*SOC1*）、*WRKY12*。*WRKY12* 是植物生长发育过程中一个重要的转录因子，可以通过整合光信号、赤霉素信号、年龄信号调控植物成花[6-7]。WRKY12 是典型的 WRKY 家族成员，其 N 端含有保守的 WRKYGQK 功能域，C 端含有 1 个 C_2H_2 结构域[8-10]。*WRKY* 基因家族仅在植物中被发现，是最大的转录因子家族之一，在拟南芥中约有 74 个成员，水稻中则有 100 多个成员[11]。

在光周期途径中，*AtWRKY12* 参与拟南芥的开花调控，可以在短日照条件下促进开花[7]；在赤霉素途径中，AtWRKY12 与 RGA-LIKE1（RGL1）和 GA INSENSITIVE（GAI）互作并作用于 *FUL*（*FRUITFULL*）启动子区域的 W-box，促进 *FUL* 表达并诱导植物开花[7]。*SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE10*（*SPL10*）可通过 GTAC-motif 与 *WRKY12* 的 2 个启动子片段结合并诱导其表达[6]；同时，*WRKY12* 和 *WRKY13* 都可以与 *SPL10* 发生相互作用，*WRKY12* 和 *WRKY13* 拮抗作用于 *SPL10*，进而调控 miR172b 的表达，控制短日照条件下的开花[6]。另外，研究发现芒属植物南荻中 *MlWRKY12* 基因在转入拟南芥中后可以促进拟南芥的开花[12]。这些结果表明，*WRKY12* 基因能通过响应不同的信号调控植物成花。

枇杷的开花习性明显区别于蔷薇科其他植物，但关于它的报道很少。迄今，已从栽培的枇杷中克隆了几种花相关基因，如 *EjAP1*[13]、*EjFT*[14]、*EjLFY*[15]、*EjTFL1*[16]、*EjRAV1/2*[17]、*EjWUSa*[18]、*EjbHLH79*[19]、*EjAGL6*[20]、*EjFRI*[21]、*EjAGL17*[22]、*EjSPLs*[23-24]、*EjSOC1*[25] 和 *EjSVP*[26] 等。在野生台湾枇杷恒春变型（*E. deflexa* Nakai f. *koshunensis*）中也克隆得到了 *EdCO*、*EdGI*、*EdFT* 和 *EdFD*[27-28]。在这些研究中枇杷中的同源基因功能相对保守，但是尚未见枇杷中的 *WRKY12* 同源基因相关报道，*EjWRKY12* 基因是否参与枇杷成花还不清楚。本研究拟通过生物信息学和分子生物学技术分析和鉴定 *EjWRKY12* 的功能，为深入解析 *EjWRKY12* 调控枇杷成花的分子机制奠定基础，也为进一步揭示枇杷成花的调控网络提供参考。

1　材料和方法

1.1　材　料

供试芽和叶均采自韶关学院生态园中正常生长的枇杷品种‘解放钟’成年树。

RNA 提取试剂盒 EASY spin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒购于北京艾德莱生物科技有限公司，逆转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Polymerase 购于宝日医生物技术（北京）有限公司，荧光定量试剂盒 iTaq™ universal SYBR® Green Supermix 试剂盒购于 Bio-Rad 公司。

1.2　方　法

1.2.1　*EjWRKY12* 基因 cDNA 序列的克隆

根据 EASY spin Plus 植物 RNA 快速提取试

剂盒说明书，从‘解放钟’枇杷的芽及叶中提取RNA。在对RNA进行琼脂糖凝胶电泳检测以确保其完整性，并使用超微量紫外分光光度计检测其浓度和质量后，用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Polymerase进行反转录，得到cDNA第一链。

根据拟南芥tair(https://www.arabidopsis.org/index.jsp)数据库获取*AtWRKY12*（AT2G44745）序列信息，然后使用TB-tools工具[29]，比对到已发表枇杷基因组[30]，得到*AtWRKY12*的同源基因*EjWRKY12*，设计特异克隆引物见表1，利用PrimeSTAR® Max DNA Polymerase(Takara)以cDNA为模板进行PCR扩增。经琼脂糖凝胶电泳检测条带正确后使用凝胶DNA微量回收试剂盒(Magen)进行回收，回收产物与pGEM-T Easy载体(Promega)连接后转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞中，挑选阳性克隆进行菌液PCR检测，选取含目的条带菌液送至生工生物公司测序，得到*EjWRKY12*基因序列信息。

表1 *EjWRKY12*克隆和载体构建所用引物序列

Table 1 Primer sequences used for cloning and vector construction of *EjWRKY12*

引物名称 Primer name	序列 Sequence(5′→3′)
EjWRKY12-F	ATGGAAGGAGATCAAAGAGG
EjWRKY12-R	CTAGAAAGAGCTAAAGCATTC
EjWRKY12-GFP-F	GTCGACGGTATCGATAAGCTTATGGAAG-GAGATCAAAGAGG
EjWRKY12- GFP-R	TCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGAAAGAGC-TAAAGCATTC

1.2.2 *EjWRKY12*基因生物信息学分析

利用ExPASy Translate tool(https://web.expasy.org/translate/)对*EjWRKY12*基因进行翻译，并利用ExPASy ProtParam tool(https://web.expasy.org/protparam/)分析该氨基酸序列的等电点(pI)、分子量(MW)、蛋白不稳定性指数等。用在线网站https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl? page=npsa_gor4.html对蛋白的二级结构进行预测分析，使用https://swissmodel.expasy.org/预测蛋白的三级结构模型，利用软件Chimera分析获得该蛋白的三级结构。

利用NCBI数据库(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)查找与EjWRKY12蛋白有较高同源性的氨基酸，并将EjWRKY12氨基酸序列与同源蛋白进行比对，利用MEGA7软件构建进化树。

1.2.3 *EjWRKY12*基因启动子区分析

利用TB-tools软件[29]，从枇杷基因组中获取*EjWRKY12*起始密码子上游2 000 bp启动子区域，利用在线网站PlantCARE(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/ plantcare/html/)预测该基因启动子序列的保守顺式元件基序以进一步分析。

1.2.4 EjWRKY12亚细胞定位分析

Cell-PLoc 2.0在线网站(http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/)进行蛋白质亚细胞定位预测，将不含终止密码子的*EjWRKY12*编码区克隆到35S-GFP载体中，将构建好的载体质粒通过农杆菌侵染法将重组的质粒转化到烟草叶片中(载体构建引物见表1)。

1.2.5 *EjWRKY12*基因表达分析

利用已发表的枇杷成花过程中的转录组数据[31]，对*EjWAKY12*基因在外源GA_3处理后于枇杷芽、叶中的表达情况进行分析。转录组数据样品获取方法：树木喷洒含有0.1%(*V*/*V*)磷酸、0.025%(*V*/*V*)曲拉通X-100(表面活性剂)以及300 mg/L GA_3的水溶液。对照组植株则喷洒含有0.1%(*V*/*V*)磷酸和0.025%(*V*/*V*)曲拉通X-100的溶液，每2周喷洒1次(2019年5月18日至8月10日)，对所有叶片和顶部芽进行喷洒(整株喷施，所有叶片开始滴水)。枇杷花芽的分化开端发生在6月底至7月初[3]。因此，GA_3处理组和对照组的取样时间为5月25日、6月29日和8月17日。

2 结果与分析

2.1 *EjWRKY12*基因克隆

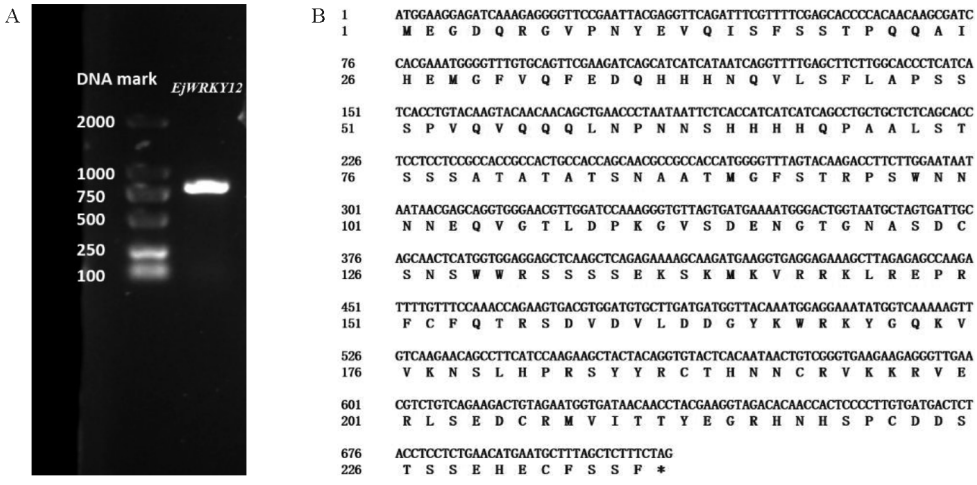
以‘解放钟’枇杷为材料，取顶芽及叶片提取总RNA，以反转录合成得到的cDNA为模板，利用PCR扩增*EjWRKY12*的CDS全长序列。经凝胶电泳检测，PCR产物条带大小与基因组组装该基因的长度一致(图1，A)。连接pMD19-T载体后转化大肠杆菌感受态细胞(DH5α)，测序获得*EjWRKY12*CDS全长序列，结果显示*EjWRKY12*基因CDS区长度为711 bp，编码236个氨基酸(图1，B)。

2.2 EjWRKY12进化分析

为了进一步探究EjWRKY12结构和功能的特性，将EjWRKY12与已经报道的同源蛋白进行进化分析，结果显示，推导的EjWRKY12氨基酸序列与来自苹果梨、烟草、大豆及拟南芥等其他WRKY12直系同源物结构相对保守，都具有高度保守的

WRKY 结构域（图 2，A）。结果显示，EjWRKY12 蛋白与苹果、梨等苹果亚科聚在同一小支，且其与大多数蔷薇科植物如桃、蔷薇等聚在同一大支，说明亲缘关系最为接近，亦印证枇杷属蔷薇科苹果亚科的植物学分类。

此外，比对得到的同源基因大多与成花相关，暗示 EjWRKY12 蛋白可能功能保守，推测其参与枇杷成花过程。

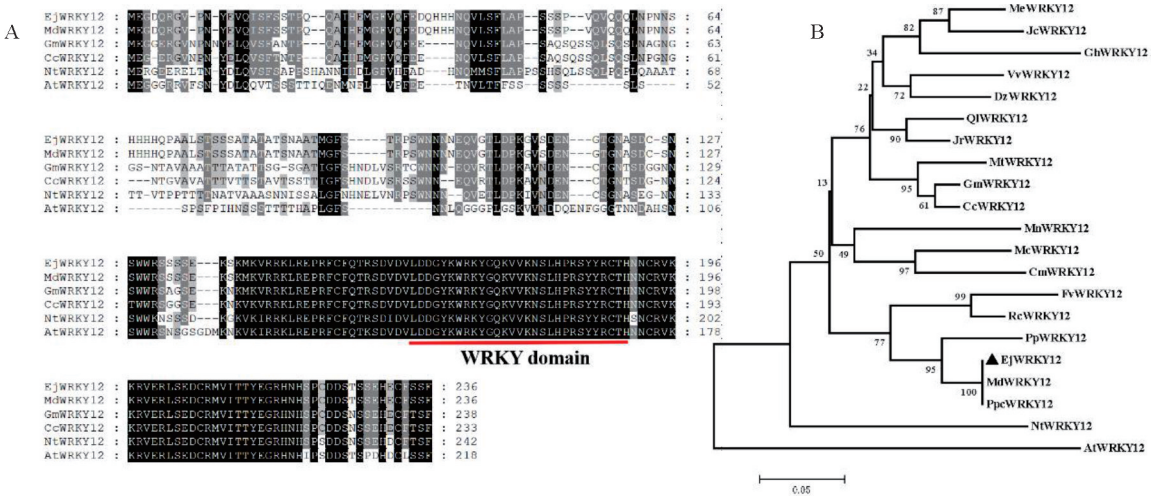


A. 克隆得到 *EjWRKY12* 的电泳图；B. *EjWRKY12* 的 CDS 序列及其翻译的氨基酸序列。

图 1　*EjWRKY12* 基因克隆结果

A. Gel electrophoresis of the cloned *EjWRKY12* gene; B. CDS sequence and its translated amino acid sequence of *EjWRKY12*.

Fig. 1　Gene cloning results of *EjWRKY12*



A. 几种植物 EjWRKY12 蛋白的氨基酸序列比对，红色线条标注的是 WRKY 结构域；

B. 来自不同物种的 EjWRKY12 同源蛋白的系统发育分析。

图 2　EjWRKY12 氨基酸序列和系统发育分析

A. Amino acid sequence alignment of WRKY12 proteins from different plant species, the WRKY domains are marked by red lines; B. Phylogenetic analysis of homologous proteins of WRKY12 from different species.

Fig. 2　EjWRKY12 amino acid sequence and phylogenetic analysis

2.3　*EjWRKY12* 基因生物信息学分析

2.3.1　*EjWRKY12* 基因理化性质分析

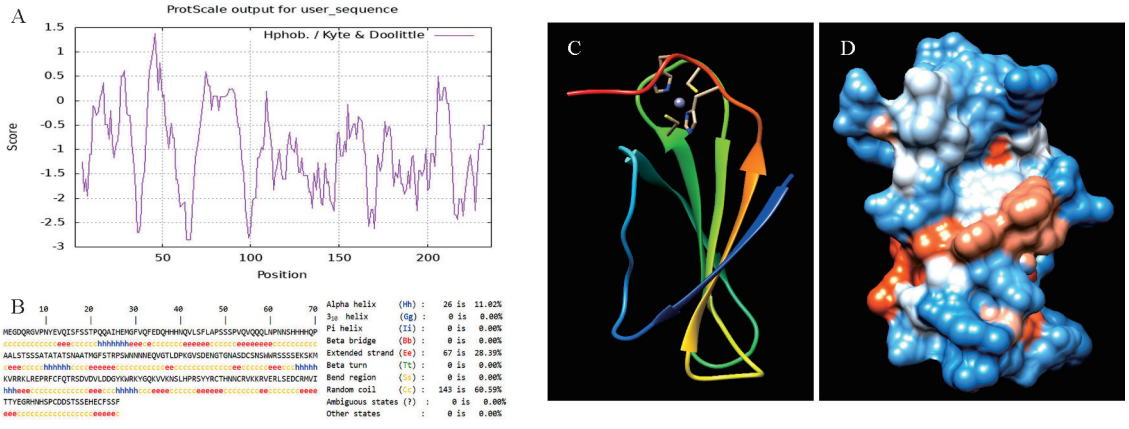
利用 ExPASy ProtParam tool（https://web.expasy.org/protparam/）网站对 *EjWRKY12* 编码的氨基酸序列进行结构分析，EjWRKY12 蛋白质相对分子质量为 26.8 kD，等电点为 8.17，负电荷的残基总数（Asp＋Glu）为 25，正电荷残基总数（Arg＋Lys）为 27。其原子总数为 3 629，分子式为 $C_{1138}H_{1749}N_{357}O_{373}S_{12}$，估算半衰期为 30 h，不稳定系数［instability index（II）］为 48.78，表明该蛋白质不稳定。

脂溶系数(aliphatic index)为 43.73，总平均亲水性(grand average of hydropathy，GRAVY)评估值为 −1.022，表明 EjWRKY12 蛋白为亲水蛋白。通过 ProtScale (https://web.expasy.org/protscale/)在线网站对该蛋白疏水性进行分析，其亲水部分大于疏水部分(图 3，A)，同时验证了 ExPASy ProtParam tool 的分析结果。

2.3.2 EjWRKY12 蛋白结构分析

对 EjWRKY12 蛋白质二级结构进行分析可知，该蛋白二级结构主要由 α-螺旋、β-折叠和无规则卷曲组成(图 3，B)。EjWRKY12 蛋白质二级结构最多的结构为无规则卷曲，占 60.59%；其次为 β-折叠，占 28.39%；另外，α-螺旋则较少，占比 11.02%。对 EjWRKY12 的氨基酸序列进行建模(图 3，C)后，再利用软件 Chimera 分析获得该蛋白的三级结构表面结构(图 3，D)，其表面结构的蓝色表示亲水氨基酸，白色表示疏水氨基酸。

通过对 EjWRKY12 的二级结构和三级结构的分析，可以预测蛋白的功能位点。通过对氨基酸理化性质分析，预测该蛋白是亲水蛋白，但白色的疏水氨基酸位点可能会进一步形成疏水空间，有可能与其他生物分子结合从而发挥其功能。



A. EjWRKY12 疏水性分析，Score 负值为亲水部分，正值为疏水部分；B. 蛋白二级结构示意图，其中蓝色字母 h 表示 α-螺旋，红色字母 e 表示 β-折叠，其余的黄色字母 c 表示无规卷曲；C. 蛋白三级结构示意图；D. 蛋白三级结构的表面结构。

图 3 EjWRKY12 蛋白疏水性、二级结构和三级结构分析

A. Hydrophobicity analysis of EjWRKY12. Negative scores indicate hydrophilic regions and positive scores indicate hydrophobic regions; B. A schematic diagram of the protein secondary structure, in the sequence, the blue letters 'h' represent α-helix, the red letters 'e' represent β-sheet, and the remaining yellow letters 'c' represent random coils. C. A schematic diagram of the protein tertiary structure; D. Surface structure of the protein tertiary structure.

Fig. 3 Secondary and tertiary structure analysis of EjWRKY12 protein

2.3.3 *EjWRKY12* 基因启动子区分析

使用 TB-tools 软件[29]从枇杷基因组序列中获取 *EjWRKY12* 起始密码子 ATG 上游 2 000 bp 的启动子区域，序列信息见 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)，序列 ID 为 OR476020。经 PLACE 数据库预测该基因启动子序列的保守顺式元件基序。*EjWRKY12* 基因的启动子序列包含 125 个保守的顺式结构元件，其中包括 33 个与转录起始频率相关的 CAAT-box，以及 23 个真核生物 RNA 聚合酶 II 识别位点 TATA-box 启动子核心元件。见表 2。此外，其含有 TCT-motif、GATA -motif、I-box、Box 4、AE-box 等 12 个光响应元件，8 个茉莉酸甲酯(Methyl Jasmonate，MeJA)诱导元件 TGACG-motif(4 个)和 CGTCA-motif(4 个)，以及 MYB 结合位点和识别位点、参与生长素反应的顺式作用调节元件 AuxRR-core 等。该预测结果暗示 *EjWRKY12* 基因可能受到光、MeJA、生长素等内外因素的调控。

2.4 EjWRKY12 蛋白亚细胞定位分析

EjWRKY12 的氨基酸序列在在线网站 CellPLoc 2.0 进行蛋白质亚细胞定位预测，结果显示 EjWRKY12 定位在细胞核，符合一般转录因子特征。为了验证预测结果，笔者构建了 35S:EjWRKY12-GFP 载体，将构建好的载体质粒通过农杆菌侵染法将重组质粒转化到烟草叶片中。在荧光显微镜下，可以看到，35S:GFP 空载(对照)绿色荧光信号定位在细胞质和细胞核，而 35S:EjWRKY12-GFP 融合蛋白定位在细胞核(图 4)，与预测结果一致。结果表明，*EjWRKY12* 基因在细胞核表达，起转录调控的作用。

表 2　*EjWRKY12* 启动子上的顺式作用元件

Table 2　*Cis*-acting elements on the *EjWRKY12* promoter

顺式作用元件 *Cis*-acting elements	数量 Number	序列信息 Sequence	功能 Function
CAAT-BOX	33	CAAAT/CAAT	启动子和增强子区域中常见的顺式作用元件 Common *cis*-acting element in promoter and enhancer regions
TATA-box	23	ATATAT/TATA	真核生物 RNA 聚合酶 II 识别位点 Eukaryotic RNA polymerase Ⅱ recognition site
CGTCA-motif	4	CGTCA	参与茉莉酸甲酯反应性的顺式作用调控元件 *Cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TGACG-motif	4	TGACG	参与茉莉酸甲酯反应性的顺式作用调控元件 *Cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
Box 4	5	ATTAAT	光响应元件 Part of a light responsive element
I-box	3	cCATATCCAAT	光响应元件 Part of a light responsive element
GATA-motif	2	GATAGGG/AAGATAAGATT	光响应元件 Part of a light responsive element
TCT-motif	1	TCTTAC	光响应元件 Part of a light responsive element
AE-box	1	AGAAACTT	光响应元件 Part of a light responsive element
ARE	1	AAACCA	氧缺乏诱导的顺式作用调节元件 *Cis*-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
AuxRR-core	1	GGTCCAT	生长素响应顺式作用调节元件 *Cis*-acting regulatory element involved in auxin responsiveness
Myb-binding site	2	CAACAG	MYB 结合位点 Myb-binding site
CCAAT-box	1	CAACGG	MYBHv1 结合位点 MYBHv1 binding site
MYB recognition site	1	CCGTTG	MYB 识别位点 MYB recognition site
其余元件 Remaining elements	43	—	研究未明 Research is inconclusive
总计 Total	125		

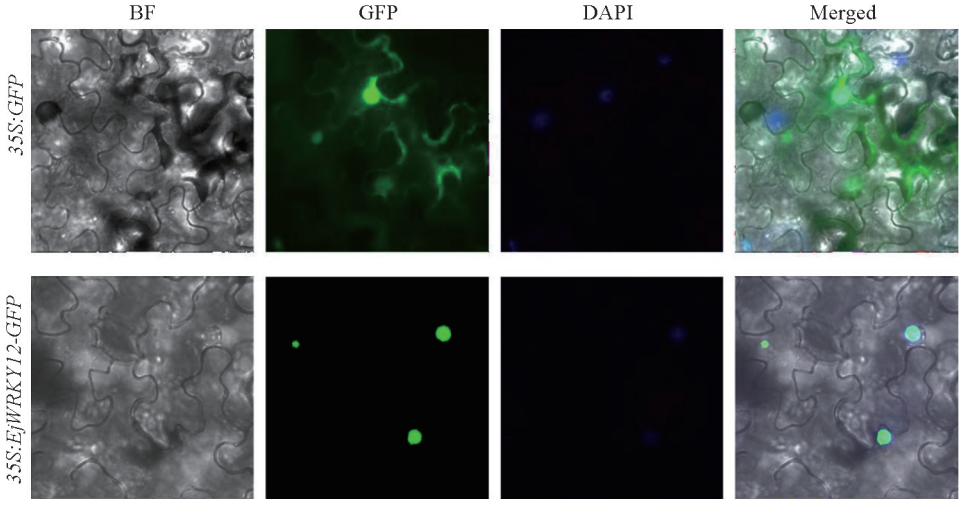


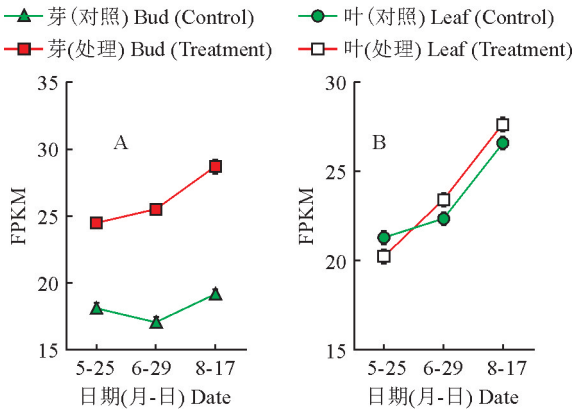
图 4　EjWRKY12 蛋白亚细胞定位图

Fig. 4　Subcellular localization of EjWRKY12 protein

2.5　*EjWRKY12* 基因表达分析

枇杷在 6 月底启动花芽分化，经外源 GA_3 处理枇杷植株后，枇杷成花受到抑制[3,16]。本研究，调取 *EjWRKY12* 在枇杷成花过程中的转录组数据，结果表明，*EjWRKY12* 在对照组的枇杷顶芽中，成花的关键时期的 *EjWRKY12* 基因表达量最低，但在 GA_3 处理期间，该基因表达量随着处理时间推移一直上升（图 5，A）；在 GA_3 处理组和对照组叶片中的 *EjWRKY12* 表达量及表达趋势变化不大（图 5，B）。而在 Jiang 等人的研究中显示 GA_3 处理后枇杷处于

旺盛的营养生长，不能成花[3,16]。暗示 *EjWRKY12* 基因可能抑制枇杷成花，可能具有促进营养生长的作用。



A. 在顶芽中的表达量；B. 在叶片中的表达量。

图 5 枇杷成花过程中 *EjWRKY12* 基因的表达情况

A. Expression level in the apical buds;

B. Expression level in the leaves.

Fig. 5 Expression of *EjWRKY12* gene during the flowering process of loquat

3 讨 论

WRKY 家族中各成员功能各异，它们广泛参与植物对逆境的抗性反应，同时调节植物的生长发育过程[9]，在这项研究中，笔者从枇杷的芽和叶片中克隆了枇杷 *EjWRKY12* 基因，该基因的 CDS 区长度为 711 个碱基对，编码 236 个氨基酸，具有典型的 WRKY 家族结构特征[8-9]，包含 1 个 WRKY 结构域，属于 WRKY 家族成员之一。

将 *EjWRKY12* 的氨基酸序列在 NCBI 与已经发表或登录的同源基因进行比对，构建系统发育树，在进化树中处于同一分支的氨基酸具有较高同源性，可推测枇杷中该基因的功能。本研究中克隆获得的 *EjWRKY12* 基因与山梨、白梨、苹果等同源性较高。为明确 *EjWRKY12* 基因的表达模式，前期研究中利用外源 GA_3 对‘解放钟’枇杷植株进行处理，并成功抑制开花[3]。基因表达结果显示，*EjWRKY12* 基因表达量随 GA_3 处理时间的延长而上升，故推测其可能是具有抑制成花功能的转录因子。对该基因启动子区域进行分析，发现含有参与生长素反应的顺式作用调节元件 AuxRR-core，内源激素中多种激素能相互影响并发挥作用，如赤霉素与生长素互为协同作用，共同调控花芽分化[32]，故可做进一步推测 *EjWRKY12* 响应 GA_3 信号，并介导生长素信号，对枇杷成花发挥抑制作用，但是其响应机制还需更进一步研究证明。

半衰期可用于衡量目标蛋白在体内的稳定性，而不稳定系数则可用于衡量其在体外的稳定性[33]。这些指标对于深入探究 EjWRKY12 蛋白的功能结果非常有参考价值。在后续的蛋白验证实验中，由于 EjWRKY12 蛋白不稳定，需要尽快完成体外实验，以避免降解对结果的影响。此外，通过预测蛋白的亲疏水性，可以推测跨膜区域[34]，由于跨膜区通常较为疏水，因此可以推测 EjWRKY12 蛋白不含有跨膜结构。

利用外源 GA_3 处理后，发现 *EjWRKY12* 的表达差异主要发生在芽中，在叶片中表达差异不大，说明其主要在芽中起调节成花的作用。本研究克隆了枇杷 *EjWRKY12* 基因，并对其结构、启动子区域及基因表达模式进行了初步分析，但是 *EjWRKY12* 基因的具体功能仍需进一步验证；同时，依据预测的启动子区域保守顺式结构元件，可在今后的研究中深入探究 *EjWRKY12* 在不同环境条件因素处理下的表达量变化及其作用机制，以进一步完善其功能。

参考文献：

[1] JIANG Y, POLAT A A, LIN S. Origin, history and production[M]. Loquat: Botany, Production and Uses, CABI GB, 2022: 1-20.

[2] KUROKURA T, MIMIDA N, BATTEY N H, *et al*. The regulation of seasonal flowering in the Rosaceae[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, **64**(14): 4 131-4 141.

[3] JIANG Y Y, PENG J R, ZHU Y M, *et al*. The role of *EjSOC1* s in flower initiation in *Eriobotrya japonica*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, **10**: 253.

[4] SHIM J S, KUBOTA A, IMAIZUMI T. Circadian clock and photoperiodic flowering in *Arabidopsis*: CONSTANS is a hub for signal integration[J]. *Plant Physiology*, 2017, **173**(1): 5-15.

[5] SONG Y H, ITO S, IMAIZUMI T. Flowering time regulation: Photoperiod- and temperature-sensing in leaves[J]. *Trends in Plant Science*, 2013, **18**(10): 575-583.

[6] MA Z B, LI W, WANG H P, *et al*. WRKY transcription factors WRKY12 and WRKY13 interact with SPL10 to modulate age-mediated flowering[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, **62**(11): 1 659-1 673.

[7] LI W, WANG H P, YU D Q. *Arabidopsis* WRKY transcription factors WRKY12 and WRKY13 oppositely regulate flowering under short-day conditions[J]. *Molecular Plant*, 2016,

9(11)：1 492-1 503.

[8] 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.

[9] RUSHTON P J，SOMSSICH I E，RINGLER P，*et al*. WRKY transcription factors[J]. *Trends in Plant Science*，2010，**15**(5)：247-258.

[10] 董　悦，王远达，王志敏，等. WRKY12 调控植物发育的分子机制[J]. 生物工程学报，2021，**37**(1)：142-148.
DONG Y，WANG Y D，WANG Z M，*et al*. Molecular mechanism of WRKY12 in regulating plant development[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*，2021，**37**(1)：142-148.

[11] ÜLKER B，SOMSSICH I E. WRKY transcription factors：From DNA binding towards biological function[J]. *Current Opinion in Plant Biology*，2004，**7**(5)：491-498.

[12] YU Y C，HU R B，WANG H M，*et al*. MlWRKY12，a novel *Miscanthus* transcription factor，participates in pith secondary cell wall formation and promotes flowering[J]. *Plant Science*，2013，**212**：1-9.

[13] LIU Y X，SONG H W，LIU Z L，*et al*. Molecular characterization of loquat *EjAP*1 gene in relation to flowering[J]. *Plant Growth Regulation*，2013，**70**(3)：287-296.

[14] REIG C，GIL-MUÑOZ F，VERA-SIRERA F，*et al*. Bud sprouting and floral induction and expression of *FT* in loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.[J]. *Planta*，2017，**246**(5)：915-925.

[15] LIU Y X，ZHAO Q，MENG N，*et al*. Over-expression of *EjLFY*-1 leads to an early flowering habit in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) and its asexual progeny[J]. *Frontiers in Plant Science*，2017，**8**：496.

[16] JIANG Y Y，ZHU Y M，ZHANG L，*et al*. *EjTFL1* genes promote growth but inhibit flower bud differentiation in loquat[J]. *Frontiers in Plant Science*，2020，**11**：576.

[17] PENG Z，WANG M，ZHANG L，*et al*. EjRAV1/2 delay flowering through transcriptional repression of EjFTs and EjSOC1s in loquat[J]. *Frontiers in Plant Science*，2021，**12**：816 086.

[18] YU Y H，YANG M M，LIU X Y，*et al*. Genome-wide analysis of the *WOX* gene family and the role of *EjWUSa* in regulating flowering in loquat (*Eriobotrya japonica*)[J]. *Frontiers in Plant Science*，2022，**13**：1 024 515.

[19] 胡若倩，景丹龙，郭启高，等. 三倍体枇杷花期调控相关的 *EjbHLH79* 基因序列和表达特性分析[J]. 植物生理学报，2021，**57**(6)：1 300-1 310.
HU R Q，JING D L，GUO Q G，*et al*. Analyses of the sequence and expression of flowering-related *EjbHLH79* gene in triploid loquat[J]. *Plant Physiology Journal*，2021，**57**(6)：1 300-1 310.

[20] 蒲籽言，胡若倩，徐欣羽，等. 三倍体枇杷花期调控基因 *EjAGL6* 的表达特性和功能分析[J]. 西北植物学报，2022，**42**(8)：1 263-1 272.
PU Z Y，HU R Q，XU X Y，*et al*. Expression characterization and function analysis of the *EjAGL6* gene in triploid loquat[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*，2022，**42**(8)：1 263-1 272.

[21] CHEN W W，WANG P，WANG D，*et al*. EjFRI，FRIGIDA (FRI) ortholog from *Eriobotrya japonica*，delays flowering in *Arabidopsis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*，2020，**21**(3)：1 087.

[22] XIA Y，XUE B G，SHI M，*et al*. Comparative transcriptome analysis of flower bud transition and functional characterization of EjAGL17 involved in regulating floral initiation in loquat[J]. *PLoS One*，2020，**15**(10)：e0239382.

[23] WEI X S，MIN S，BAO G X，*et al*. Cloning，subcellular localization and expression analysis of the *EjSPL5* gene in triploid loquat[J]. Acta Horticulturae Sinica，2020，**47**(2)：220.

[24] JIANG Y Y，PENG J R，WANG M，*et al*. The role of *EjSPL3*，*EjSPL4*，*EjSPL5*，and *EjSPL9* in regulating flowering in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*，2019，**21**(1)：248.

[25] JIANG Y Y，PENG J R，ZHU Y M，*et al*. The role of *EjSOC1* s in flower initiation in *Eriobotrya japonica*[J]. *Frontiers in Plant Science*，2019，**10**：253.

[26] JIANG Y Y，PENG J R，ZHANG Z K，*et al*. The role of *EjSVPs* in flower initiation in *Eriobotrya japonica*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*，2019，**20**(23)：5 933.

[27] ZHANG L，YU H，LIN S Q，*et al*. Molecular characterization of FT and FD homologs from *Eriobotrya deflexa* Nakai forma *Koshunensis* [J]. *Frontiers in Plant Science*，2016，**7**：8.

[28] ZHANG L，JIANG Y Y，ZHU Y M，*et al*. Functional characterization of GI and CO homologs from *Eriobotrya deflexa* Nakai forma *Koshunensis*[J]. *Plant Cell Reports*，2019，**38**(5)：533-543.

[29] CHEN C J，CHEN H，ZHANG Y，*et al*. TBtools：An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*，2020，**13**(8)：1 194-1 202.

[30] SU W B，JING Y，LIN S K，*et al*. Polyploidy underlies co-option and diversification of biosynthetic triterpene pathways in the apple tribe[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*，2021，**118**(20)：e2101767118.

[31] JIANG Y Y，LIU Y C，GAO Y S，*et al*. Gibberellin induced transcriptome profiles reveal gene regulation of loquat flowering[J]. *Frontiers in Genetics*，2021，**12**：703 688.

[32] WEISS D，ORI N. Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones[J]. *Plant Physiology*，2007，**144**(3)：1 240-1 246.

（编辑：韦青侠）