• 药材与资源 •

基于全基因组的北柴胡 *BcWRKY* 基因家族鉴定及其在水、热调控下的表达模式分析

赵梦洋[1]，顾旭鹏[1]，刘竹婷[1]，王雨洁[1]，刘永康[2]，高启国[3]，万　婕[4]，初雷霞[1]，董　宁[1]，张飞宇[1]，高　旦[5]，杨林林[1, 2*]，董诚明[1, 2, 6]

1. 河南中医药大学药学院，河南省道地药材生态种植工程技术研究中心，河南 郑州　450046
2. 河南省四大怀药种质保护创新和大健康综合利用重点实验室，河南 焦作　454881
3. 河南太龙药业股份有限公司，河南 郑州　450000
4. 河南中医药大学第一附属医院，河南 郑州　450046
5. 中国中医科学院中药研究所，道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室，北京　100700
6. 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心，河南 郑州　450046

摘　要：目的　对北柴胡 *Bupleurum chinense* 中 WRKY 的全基因组分析，并鉴定积极响应水、热胁迫信号变化的关键 *WRKY* 基因，为环境调控下北柴胡质量形成的分子机制提供理论依据。**方法**　基于北柴胡全基因组数据，利用生物信息学方法对 WRKY 基因家族成员进行鉴定；并系统分析其染色体定位、系统进化关系、保守结构域、基因结构及启动子顺式作用元件；通过共线性分析筛选潜在响应水热信号的 *WRKY* 基因；采用实时荧光定量 PCR 技术，分析积极响应干旱、干旱低温、干旱高温环境差异下潜在的 *BcWRKY* 的表达模式，并将柴胡皂苷合成途径相关基因与潜在的 *BcWRKY* 进行蛋白互作预测分析。**结果**　共鉴定出 90 个 WRKY 转录因子，系统进化分析将其分为 GroupⅠ～Ⅳ 4 个亚群，保守基序分析表明所有成员均含有 Motif1、Motif2、Motif3 3 个核心基序。基因结构分析显示大多数 *BcWRKY* 基因含 3～10 个外显子，WRKY 结构域位于编码区中后段。顺式作用元件预测发现启动子区域富含光响应、茉莉酸甲酯、水杨酸、脱落酸等激素响应元件。染色体定位显示 *BcWRKY* 基因分布不均，在 ChrA01/02/03 上分布较为密集。共线性分析及选择压力分析，表明 *WRKY* 基因家族的扩张主要因为全基因组复制和片段复制事件，并伴随纯化选择部分基因。RT-qPCR 结果显示，*BcWRKY22/42/75* 基因在栽培种与野生种间表达差异显著；在干旱、干旱＋高温、干旱＋低温等胁迫处理下，*BcWRKY10/42/75* 基因在干旱＋高温条件下表达显著上调。蛋白互作预测结果中互作元件涵盖了激素响应、非生物胁迫响应及光节律信号相关类型，为进一步证明 *BcWRKY10/42/75* 作为胁迫响应核心转录因子提供依据。**结论**　初步筛选了潜在积极响应水、热胁迫信号变化的关键 *WRKY* 基因，为后续功能验证和分子育种提供了潜在的靶点，也为深入理解北柴胡药材品质形成的分子机制奠定了理论基础。

关键词：北柴胡；转录因子；*BcWRKY*；基因组鉴定；表达分析

中图分类号：R282.12　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2026)21 - 8650 - 12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.21.021

Genome-wide identification of *BcWRKY* gene family in *Bupleurum chinense* and analysis of its expression patterns in response to water and heat stress

ZHAO Mengyang[1], GU Xupeng[1], LIU Zhuting[1], WANG Yujie[1], LIU Yongkang[2], GAO Qiguo[3], WAN Jie[4], CHU Leixia[1], DONG Ning[1], ZHANG Feiyu[1], GAO Dan[5], YANG Linlin[1, 2], DONG Chengming[1, 2, 6]

1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Henan Provincial Ecological Planting Engineering Technology Research Center of Authentic Medicinal Materials, Zhengzhou 450046, China
2. Henan Province Key Laboratory for Germplasm Innovation and Health Industry Utilization of Four Renowned Huai Medicines,

收稿日期：2026-05-03

基金项目：国家自然科学基金资助项目（82104329，32401226）；河南省青年学生科学基金项目（252300423976）；河南省重点研发专项（251111310500，231111312700，241111310200）；中国博士后科学基金特别资助项目（2014T170252）；河南省国际科技合作项目（252102520068）；河南省博士后科研专项（HN2025075）；河南省博士后经费资助

作者简介：赵梦洋，女，硕士研究生，研究方向为药用植物生理与生态学。E-mail: 1840770382@qq.com

***通信作者：**杨林林，男，博士，副教授，从事药用植物生态学研究。E-mail: yangll-hatcm@hactcm.edu.cn

Jiaozuo 454881, China
3. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China
4. Henan Tailong Pharmaceutical Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China
5. Institute of Chinese Materia Medica, State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China
6. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan Province and Ministry of Education of China, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective This study aimed to conduct a genome-wide analysis of the WRKY transcription factor family in *Bupleurum chinense* and identify key WRKY genes that actively respond to water and heat stress signals. The findings are expected to provide a theoretical basis for elucidating the molecular mechanisms underlying the quality formation of *B. chinense* under environmental regulation. **Methods** Based on the whole-genome sequencing data of *B. chinense*, bioinformatics approaches were employed to identify members of the WRKY gene family. Systematic analyses were performed, including chromosomal localization, phylogenetic relationship reconstruction, conserved domain analysis, gene structure characterization, and promoter cis-acting element prediction in promoter regions. Collinearity analysis was utilized to screen potential WRKY genes responsive to water and heat signals. Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) was further applied to analyze the expression patterns of candidate *BcWRKY* genes under different stress conditions, including drought, drought combined with low temperature, and drought combined with high temperature. Protein-protein interactions between candidate BcWRKY proteins and proteins encoded by genes involved in saikosaponin biosynthesis were predicted. **Results** A total of 90 WRKY transcription factor genes were identified from the *B. chinense* genome, which were phylogenetically classified into four subgroups (Group I–IV). Conserved motif analysis revealed that all identified BcWRKY proteins contained three core motifs (Motif 1, Motif 2, and Motif 3). Gene structure analysis indicated that most *BcWRKY* genes contained 3—10 exons, with the WRKY domain predominantly located in the middle-late region of the coding sequence. Cis-acting element prediction showed that the promoter regions of *BcWRKY* genes were enriched in light-responsive elements and hormone-responsive elements associated with methyl jasmonate, salicylic acid, and abscisic acid. Chromosomal localization analysis demonstrated an uneven distribution of *BcWRKY* genes across chromosomes, with higher densities on ChrA01, ChrA02, and ChrA03. Collinearity analysis combined with selection pressure analysis suggested that the expansion of the *BcWRKY* gene family was primarily driven by whole-genome duplication and segmental duplication events, accompanied by purifying selection acting on some duplicated genes. RT-qPCR results indicated that the expression levels of *BcWRKY22*, *BcWRKY42*, and *BcWRKY75* differed significantly between cultivated and wild accessions of *B. chinense*. Under stress treatments, *BcWRKY10/42/75* showed remarkable upregulation in response to drought combined with high temperature. The interacting elements identified in the protein-protein interaction prediction results included those associated with hormone response, abiotic stress response, and photoperiodic signal transduction, providing predictive support for further investigation of BcWRKY10, BcWRKY42, and BcWRKY75 as core stress-responsive transcription factors. **Conclusion** This study preliminarily screened potential key WRKY genes that positively respond to variations in water and heat stress signals, offering potential targets for subsequent functional validation and molecular breeding, and laying a theoretical foundation for further understanding the molecular mechanisms underlying the quality formation of *B. chinense*.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; transcription factor; BcWRKY; genome-wide identification; expression analysis

北柴胡 *Bupleurum chinense* DC.为伞形科柴胡属多年生药用植物[1]，其干燥根作为柴胡入药。主要活性成分柴胡皂苷（saikosaponins）[2]具有抗炎、抗病毒、解热等多重药理活性[3-7]。柴胡中主要成分柴胡皂苷的合成与积累是对外部环境变化的综合生态响应的结果，即“基原决定药性，生态彰显药性”[8]。因此，探究生态环境如何通过调控基因表达影响柴胡皂苷合成并塑造道地性品质，对于保障北柴胡药材质量、提升北柴胡种植技术具有重要科学价值。

课题组前期围绕北柴胡道地性形成的生态机制开展了一系列系统性研究，初步揭示了非生物因子调控柴胡皂苷合成与积累的分子生态学路径。研究表明柴胡干旱处理后，通过动态调控植物激素信号并激活皂苷合成关键基因的表达模式，进而促进柴胡在水分恢复后高效积累皂苷[9]。短期温度胁迫通过诱导特定 *BcMYB* 转录因子的活性，协同调控皂苷合成通路中多环节关键基因的表达，进而促进皂苷的生物积累[10]。在水热交互胁迫的研究中发现，干旱与高温协同显著促进皂苷合成，而干旱与低温则持续抑制皂苷积累，其机制涉及不同激素信号的切换及合成通路关键基因的差异化表达[11]。此

外，脱落酸、油菜素内酯等外源可通过调控合成基因表达、提升抗氧化能力或增加中间体含量等方式，增强柴胡的抗逆性并促进皂苷积累[3, 11-13]。上述工作初步证实转录因子是响应外界信号并调控下游基因表达最终促进柴胡皂苷合成的关键枢纽之一，为理解北柴胡道地性成因及其生态调控提供了重要基础。

WRKY 转录因子作为植物中最大的转录因子家族之一，广泛参与生长发育、生物与非生物胁迫响应[14-15]。其典型特征为含有保守的 WRKY 结构域，可特异性结合下游基因启动子中的 W-box 顺式元件，从而调控胁迫相关基因的表达[16]。W-box 是 WRKY 转录因子与靶基因启动子特异性结合的重要顺式作用元件[17]，主要存在于抗病虫害、抗旱、抗低温、抗盐碱等相关抗性基因的启动子区域[18-21]。目前，WRKY 家族已在拟南芥、水稻、颠茄、人参等多种植物中被系统鉴定[22-27]，并证实其在干旱、高、低温等胁迫响应中发挥关键作用。

在前期工作的基础上，本课题组对 *BcWRKY* 基因家族进行了全基因组鉴定和分析，分析其结构特征并结合系统发育树、染色体定位及顺式作用元件分析阐述了作用机制。进一步通过系统进化树寻找与拟南芥 *WRKY*（*AtWRKY*）基因中响应干旱胁迫和高低温胁迫机制的基因对应的 *BcWRKY* 同源基因，通过 qRT-PCR 分析不同种质、不同处理下北柴胡药用部位 *BcWRKY* 基因的表达情况。基于本课题组前期关于干旱、温度及其复合胁迫对北柴胡皂苷积累与基因表达影响的研究基础，本研究旨在筛选 *BcWRKY* 潜在积极响应并促进柴胡皂苷生成转录因子，进一步阐明 WRKY 转录因子在北柴胡逆境响应中的调控机制提供理论依据，也为利用分子育种手段提升北柴胡抗逆性与药材质量奠定基础。

1 材料与仪器

样品经河南中医药大学董诚明教授鉴定为北柴胡 *B. chinense* DC.。实时荧光定量 PCR 仪（美国赛默飞世尔科技公司）；RNA 提取试剂盒（索莱宝公司）。

2 方法

2.1 样品的处理

实验用材料来自河南省嵩县柴胡种植基地，基于北柴胡的生物学特性，其最适生长温度为 25 ℃，因此，本研究中对照组（CK）与单纯干旱组（DM）的培养温度均设定为 25 ℃，以模拟最适生长条件。使用 15% PEG6000 模拟干旱胁迫、15% PEG6000 和 20 ℃处理模拟干旱低温胁迫、15% PEG6000 和 35 ℃处理模拟干旱高温胁迫。本研究使用的实验材料与课题组前期研究中所用材料一致[28]。

2.2 *BcWRKY* 基因家族成员的鉴定与染色体定位

北柴胡的全基因组数据来源本课题组自测数据库，*AtWRKY* 家族蛋白序列数据集来自 tair 数据库（https://www.arabidopsis.org/）。利用 TBtools 将北柴胡和拟南芥双向 blast 筛选出北柴胡中的 WRKY 蛋白序列，再结合 Pfam 数据库（http://pfam-legacy.xfam.org/）利用隐马尔可夫模型（hidden Markov model，HMM）对北柴胡基因组中的 WRKY 蛋白序列进一步筛选。在 HMM 配置文件中，参数为默认值，截止值为 0.01，最后去除 2 种方法中的重复转录本后，获得目的基因。基于北柴胡基因组注释信息，提取各 *BcWRKY* 基因的染色体定位信息，采用 TBtools 软件进行可视化作图。从 tair 数据库（https://www.arabidopsis.org/）中获取 71 个 *At*WRKY 家族蛋白序列，通过 TBtools 软件 One Step Build a ML Tree 功能将北柴胡与 *At*WRKY 蛋白序列进行比对，并采用最大似然法（maximum likelihood，ML）构建发育树。

2.3 *BcWRKY* 基因保守基序和基因结构分析及顺式作用元件预测

使用 MEME 数据库（https://meme-suite.org/meme/）对 *BcWRKY* 蛋白保守基序进行预测。通过 NCBI 网站 CDD 工具（https://www.ncbi. nlm. nih. gov/cdd）预测 *BcWRKY* 蛋白结构域。使用 TBtools 软件将蛋白保守基序、保守结构域进行可视化。通过 TBtools 软件分别提取各个 *BcWRKY* 基因位置信息，并截取上游各 2 000 bp 序列作为启动子区域，通过植物护理数据库（https://www. plantcare.com）预测相关顺式作用元件。

2.4 *BcWRKY* 基因组内、组间共线性分析

通过 TBtools 软件获取北柴胡染色体 ID 及长度数据后，利用 TBtools 插件 One Step MCScanX 生成 *BcWRKY* 基因间的共线性文件，并经 Advanced Circos 工具进行可视化处理。利用 TBtools 对北柴胡与拟南芥全基因组进行比对分析，获得种间共线性关系，并进行可视化处理。

2.5 *BcWRKY* 基因表达模式分析及 qRT-PCR 验证

2.5.1 RNA 提取及 cDNA 合成　使用 411C-1 型多

酚多糖植物总 RNA 提取试剂盒分别提取 4 个实验组以及野生种柴胡根部的总 RNA，并使用 HiScript® III RT SuperMix for qPCR（gDNA wiper）试剂盒进行反转录得到 cDNA。从北柴胡与拟南芥的进化树中选取与拟南芥干旱、高低温胁迫响应基因的 *BcWRKY* 中置信度较高的 9 个北柴胡同源基因，利用 QuantStudio5 实时荧光定量 PCR 仪进行表达模式分析，荧光定量反应体系 20 μL：dd H_2O 7 μL；PowerTrack™ SYBR Green Master Mix10 μL；上、下引物各 1 μL；Cdna 1 μL。反应程序：95 ℃预变性 2 min，95 ℃变性 15 s，58 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，40 个循环数。内参基因为 EF-1α，引物序列信息见表 1。每个样品做 3 个生物学重复。

2.5.2 数据处理 统计 qRT-PCR 数据，通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法计算基因相对表达水平情况，并用 GraphPad 软件进行单因素方差分析及绘制柱状图。使用 ChiPolt 网站（https://www.chiplot.online）做热图。

表 1 *BcWRKY* 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of *BcWRKY* genes

基因名称	正向引物（5’→3’）	反向引物（5’→3’）
BcWRKY6	GCCAGCGACAACCACCA	CTATGGGGCTGTGGCTCC
BcWRKY9	ATCCGACCCATTTCGTAGTG	TGGGCATCGCTGGACTC
BcWRKY10	GCACCTGGAACATCGGC	TCCCCCTTCCCCCTCTG
BcWRKY11	TCAGAAACTTGTCAGGGGGA	TGTGAGCAACCGTCCGTG
BcWRKY22	GTCGGACAGCGATTGGG	AAGAAAGCGGGGAAGCAA
BcWRKY25	AGGCACCTGGAACATCGG	CCTCCCCCTTCCCCCTC
BcWRKY36	GTCGTGGAAGGAACAAAGCA	TGCTAACCGTCCTGACTGGG
BcWRKY42	GTGAAGCCAGAGAAGGGGTTA	TTGGATGGGCATACTTGTTTG
BcWRKY75	AATCAATGTCCACCCAAAAAA	CCTGATAAGACTGTGGGGCA
EF-1α	GAAGGTGACAACATGATTGAGG	TGAAGAGGGAGACGAAGAGGTT

2.6 蛋白互作预测分析

基于课题组前期研究，发现 β-芳樟醇合成酶（β-AS9、β-AS11）为柴胡皂苷合成途径中活性较为显著的关键酶[28]，利用 TBtools 软件提取上游 2 000 bp 序列。随后通过 PlantCare 数据库（https://www.plantcare.co）预测这些启动子区域内的顺式作用元件。使用 AlphaFold3（https://alphafoldserver.com/）预测 *BcWRKY* 中积极响应相关调控蛋白与上述关键结构基因的启动子区域之间的相互作用，使用 AlphaFold 3（https://alphafoldserver.com）预测蛋白互作，并用 PyMOL3.1（Schrödinger，美国）进行蛋白互作结构可视化和互作位点分析。

3 结果与分析

3.1 *BcWRKY* 基因家族成员的鉴定及成员系统进化分析与染色体定位

对北柴胡全基因组序列进行生物信息学分析，成功鉴定出 90 个 *BcWRKY* 基因，并将这些基因命名为 *BcWRKY1*～*BcWRKY90*。将鉴定出来的 90 个 *BcWRKY* 基因与拟南芥 *AtWRKY* 基因采用最大似然法构建了系统发育树（图 1），并根据序列特征将其划分为 4 个主要亚群（Group I～IV）。Group I 亚群包括了 *At*WRKY*1/4*、*BcWRKY25/31* 等，其共同特点为都含有 N 端和 C 端 2 个 WRKY 结构域，以及 C_2H_2 型锌指基序。Group II亚群包括 *AtWRKY40/33*、*BcWRKY12/19* 等。Group II亚族成员只含一个 WRKY 结构域和 C_2H_2 型锌指基序。Group III亚族以北柴胡的基因为主，包含 *BcWRKY*42/56 等。该亚族共有特征为 1 个 WRKY 结构域加上 C_2H_2 型锌指基序。Group IV亚群大多数为北柴胡基因，包含 *BcWRKY63/71* 等，拟南芥的同源基因较少。

通过对 *BcWRKY* 家族的染色体定位分析表明（图 2），所有 *BcWRKY* 基因均分别定位到北柴胡的染色体上。但基因在染色体上的分布呈现明显的不均匀性。其中，ChrA01、ChrA02、ChrA03 上分布的 *BcWRKY* 基因数量较多，而其他染色体上的基因数量相对较少。多个染色体上均出现多个 *BcWRKY* 基因紧密排列的现象。

3.2 *BcWRKY* 基因家族保守基序和基因结构分析及顺式作用元件预测

为了进一步解释 *BcWRKY* 基因家族结构多样性与进化关系，利用 MEME 在线数据库对北柴胡 *BcWRKY* 蛋白进行保守基序分析，共得到 10 个保守基序（图 3），所有 *BcWRKY* 均含有 Motif1、Motif2、

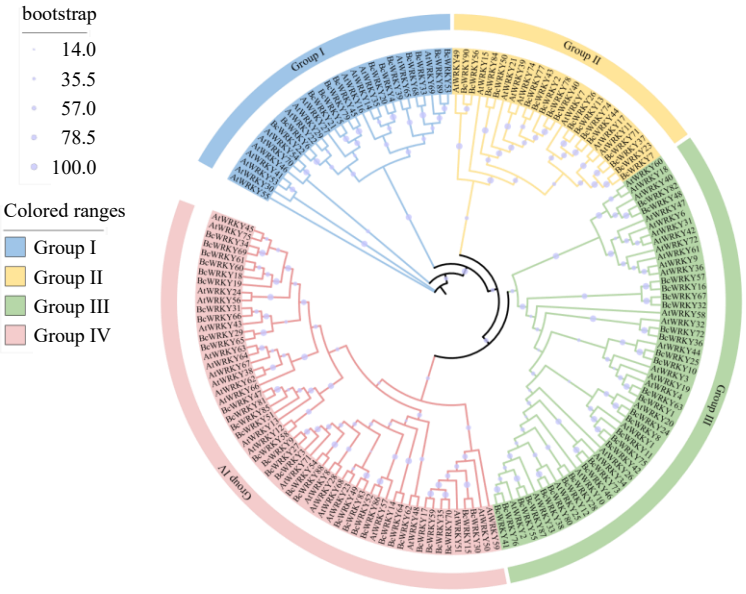


图 1　*BcWRKY*、*AtWRKY* 基因家族蛋白系统进化分析

Fig. 1　Phylogenetic analysis of *WRKY* gene family proteins in *B. chinense* and *A. thaliana*

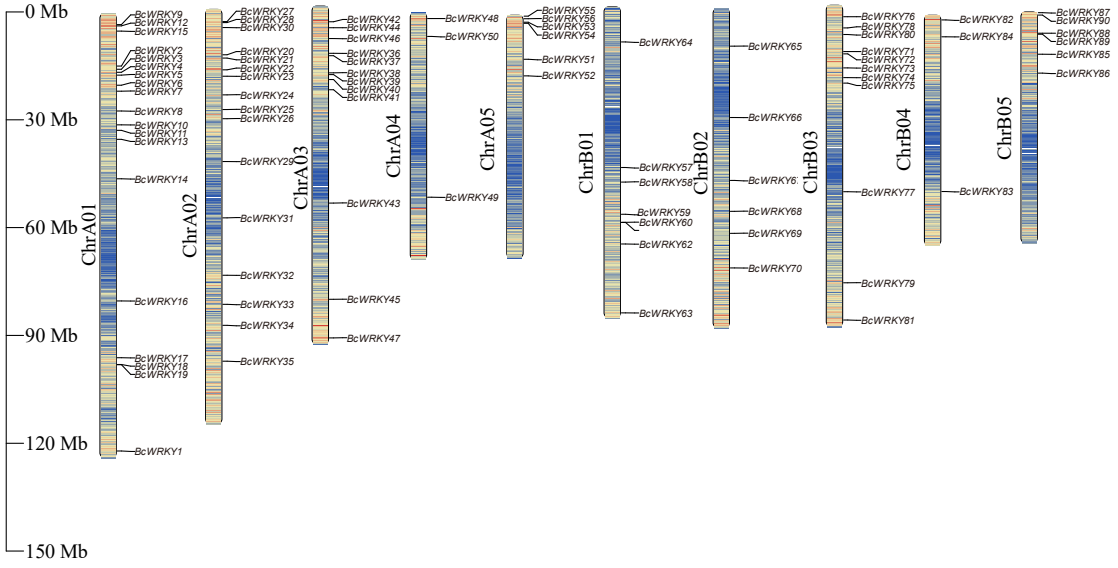


图 2　*BcWRKY* 基因家族染色体定位

Fig. 2　Chromosomal localization of *BcWRKY* gene family

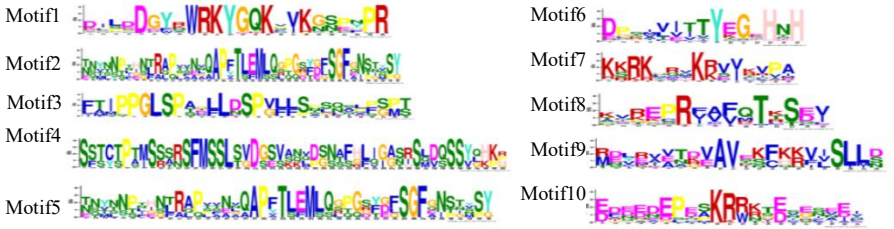


图 3　Motifs 氨基酸分布情况

Fig. 3　Amino acid distribution of Motifs

Motif3 且位置相对固定，表明这 3 个 Motifs 为 *BcWRKY* 蛋白结构域中的核心基序，也从侧面佐证了所筛选出的 90 个 *BcWRKY* 基因均属于 *WRKY* 基因家族。Motif 4、Motif5 等特定基序仅在部分亚组中出现。

对 *BcWRKY* 启动子区域的顺式作用元件进行了预测与分类统计，结果显示（图 4），*BcWRKY* 基因启动子中包含多种与环境响应、激素信号及生长发育相关的顺式作用元件，各类元件占比存在明显差异。其中，光响应元件占比最高为 37%，表明 *BcWRKY* 基因的表达可能受到光照信号的调控；其次为茉莉酸甲酯响应元件与水杨酸相应元件；此外，还分布有少量脱落酸响应元件、赤霉素响应元件、防御和胁迫响应元件、低温响应元件及分生组织表达响应元件。对顺式作用元件预测（图 5）发现，几乎所有 *BcWRKY* 基因均包含脱落酸和光响应元件，且个数较多（通常 2～10 个），构成了启动子的基础结构。激素响应类元件分布也较为广泛，大多数基因中均存在 ABA、茉莉酸等激素信号相关调控元件。光响应元件主要集中分布在 *BcWRKY17*、*BcWRKY25* 等部分基因中。此外，不同 *BcWRKY* 基因在胁迫响应元件的分布上表现出明显差异：如 *BcWRKY15*、*BcWRKY24* 等基因含有较多的胁迫

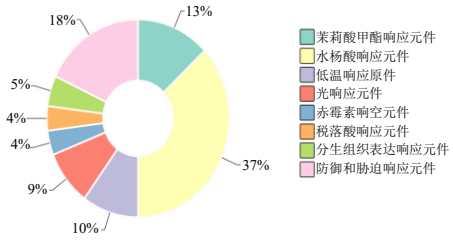


图 4 *BcWRKY* 总顺式作用元件占比

Fig. 4 Proportion of total cis-acting elements of *BcWRKY*

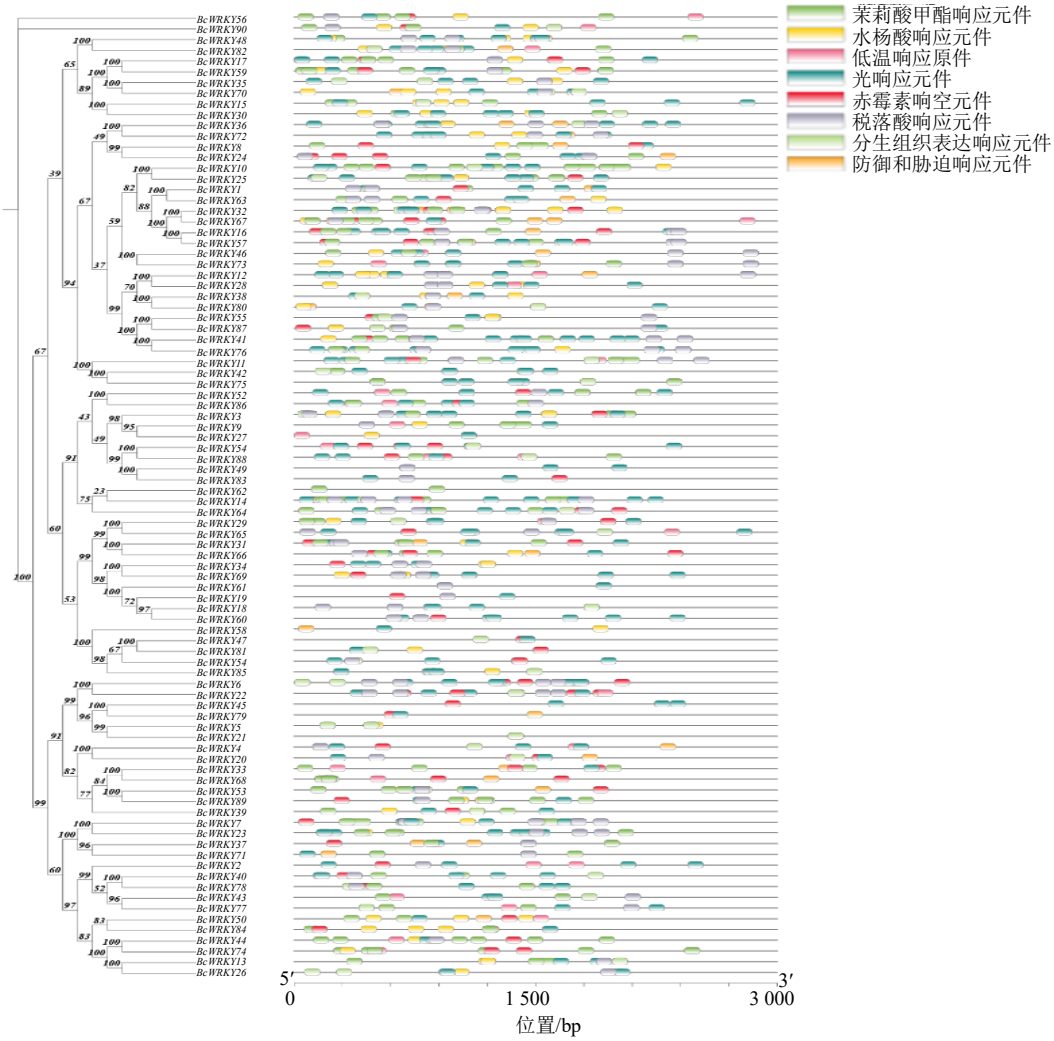


图 5 *BcWRKY* 基因家族顺式作用元件预测

Fig. 5 Prediction of cis-acting elements of *BcWRKY* gene family

相关元件，而 BcWRKY19 等少数基因所含胁迫元件较少，表明其在胁迫响应功能上可能存在分化。由图 6 可知，WRKY 结构域在基因序列中的位置高度集中，且多数位于编码区的中后段，长度均为 60～80 aa；且同一亚族的 *BcWRKY* 的基因结构域较为一致，并无长度或位置差异；没有 *BcWRKY* 基因缺失 WRKY 结构域，只有少数基因的结构域长度略短。

所筛选出的 90 个 *BcWRKY* 基因结构多数内含子长度较短，大多数外显子数为 2～3 个，部分 *BcWRKY* 基因含 4～5 个外显子，多数 *BcWRKY* 基因含短片段的 5′和 3′UTR，只有少数 *BcWRKY* 基因的 UTR 长度较长，且 UTR 的保守性低于 CDS 区域。

3.3　*BcWRKY* 种内及种间共线性分析

利用 TBtools 对北柴胡进行种内共线性分析（图 7），共鉴定出 107 对共线性基因，证明 *BcWRKY* 基因在北柴胡基因组内存在广泛的共线性关系。基因密度直方图与 GC 含量直方图部分区域基因密度较高且 GC 含量偏移显著，Circos 图中可看出 *BcWRKY* 基因多分布于基因密度相对较高的区域，证明 *BcWRKY* 在基因组中较为富集。所有基因复制对均受纯化选择作用，且大多数基因对 K_a/K_s 值集中于 0.10～0.55 且 K_s 普遍高于 K_a，表明该基因家族核心功能高度保守，有 6 对基因 K_a/K_s 值大于 1，证明该基因家族存在潜在功能分化迹象。

为探究 *BcWRKY* 家族的演化起源及功能挖掘提供直观的基因组关联依据，利用 TBtools 进一步对北柴胡与拟南芥进行种间共线性分析（图 8），结果表明拟南芥中大多数基因对应北柴胡中多个基因，这种现象表明，北柴胡作为药用植物，可能更

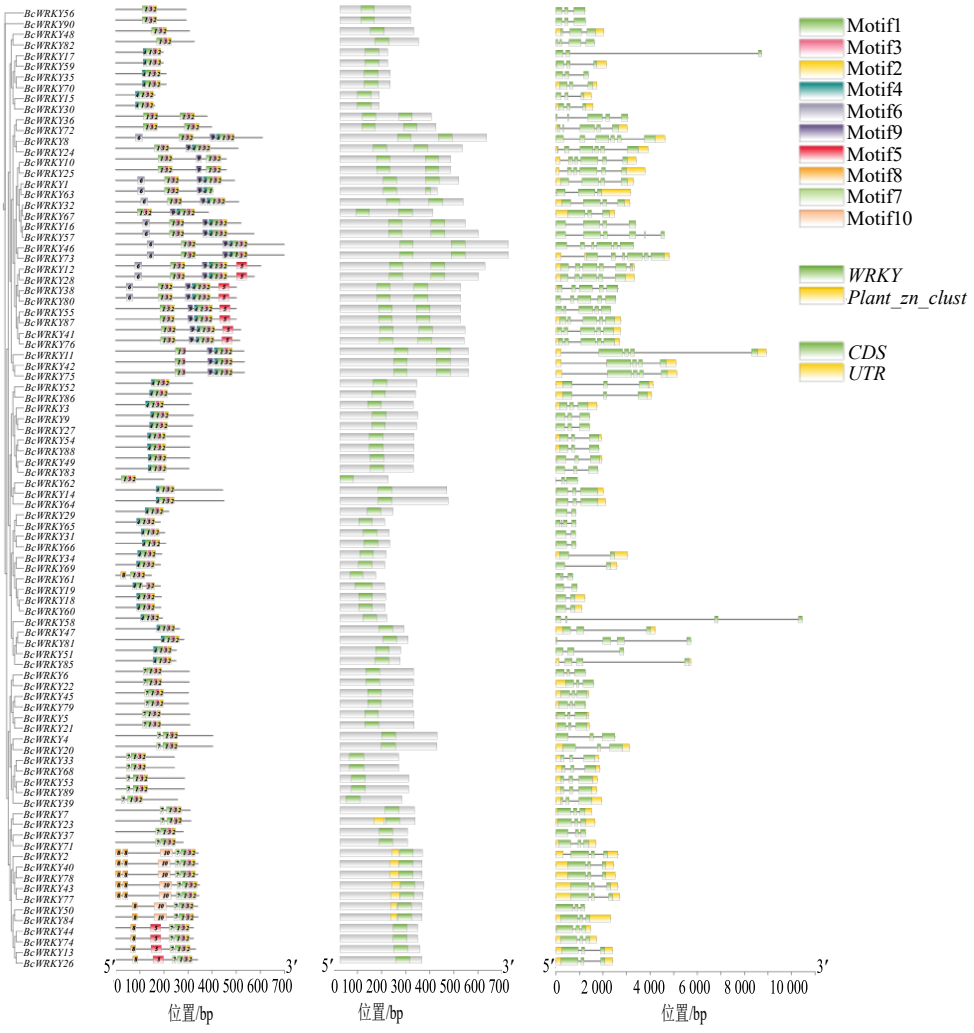
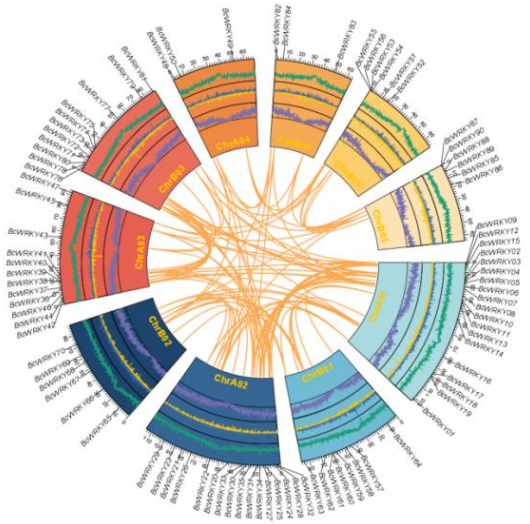


图 6　*BcWRKY* 基因家族保守基序、保守结构域和基因结构分析

Fig. 6　Analysis of conserved motifs, conserved domains and gene structures of *WRKY* gene family

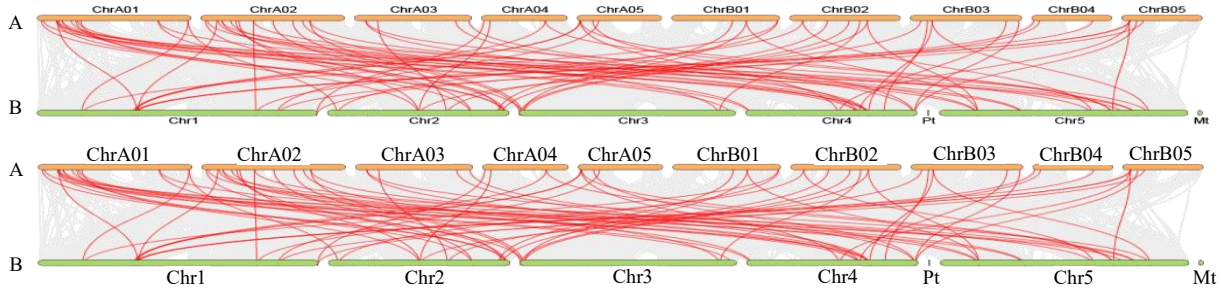


橙黄色线代表 BcWRKY 有共线性；黄色和蓝色表示 GC 偏移量，G 大于 C 为蓝色，G 小于 C 则为黄色；黄色直方图代表基因密度；青色为 GC 含量占比；BcWRKY1～90 为染色体名称。红线表示 *BcWRKY* 基因对，灰线表示其他同源基因对。

The orange lines represent collinearity ofBcWRKYgenes; Yellow and blue indicate GC skew, with blue for G > C and yellow for G < C; The yellow histograms represent gene density; Cyan denotes the proportion of GC content; and BcWRKY1—90 refer to chromosome designations; The red lines indicate BcWRKY gene pairs, while the gray lines represent other homologous gene pairs.

图 7　*BcWRKY* 基因家族的种内共线性分析

Fig. 7　Intraspecific collinearity analysis of *WRKY* gene family in *B. chinense*



红线表示 *BcWRKY* 同源基因对，灰线表示其他同源基因对。

The red lines represent pairs of *BcWRKY* homologous genes, and the gray lines represent other pairs of homologous genes.

图 8　北柴胡 (A)、拟南芥 (B) *WRKY* 基因共线性分析

Fig. 8　Collinearity analysis of *WRKY* genes between *Bupleurum chinense* (A) and*Arabidopsis thaliana* (B)

依赖少数核心转录因子来协调其根系发育与次生代谢等核心过程，而拟南芥作为模式植物，通过基因复制增强调控的多样性。

3.4　*BcWRKY* 基因家族表达模式分析及验证及蛋白互作预测

选取 6 个 *BcWRKY* 基因在河南嵩县柴胡栽培种与野生种中的表达差异，结果显示（图 9），*BcWRKY22*、*BcWRKY36*、*BcWRKY72* 在野生种中的表达量极显著或显著低于栽培种；而 *BcWRKY25* 在野生种中的表达量显著高于栽培种。这一结果表明不同 *BcWRKY* 基因在柴胡栽培种与野生种中的表达具有特异性分化，部分基因的表达差异可能与种质的人工驯化或环境适应性

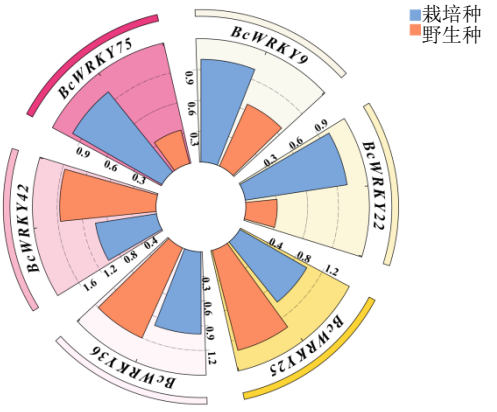


图 9　*BcWRKY* 基因在不同生境下的表达模式

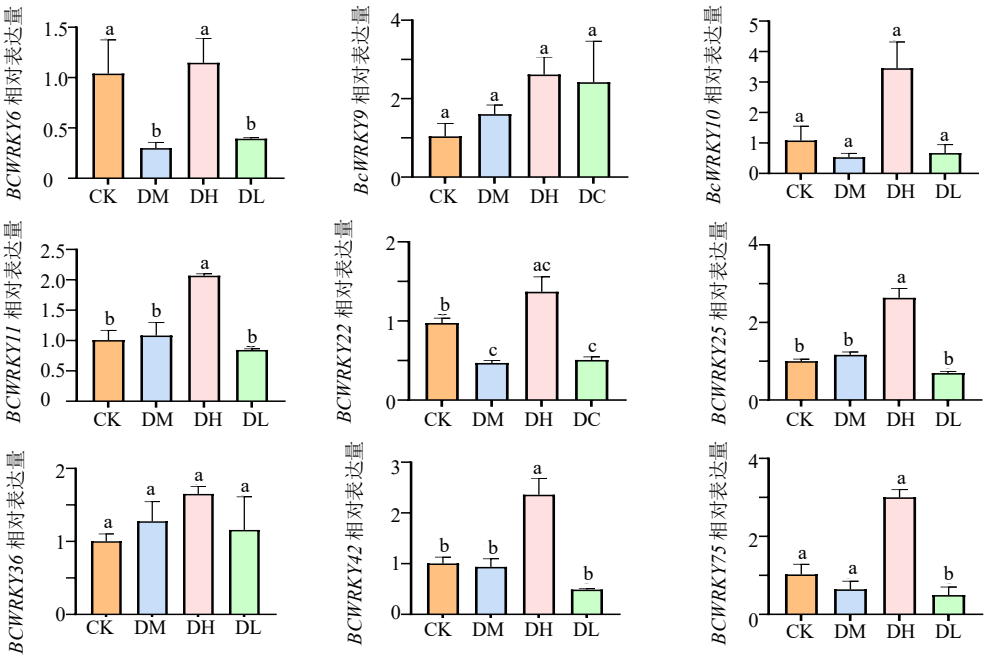
Fig. 9　Expression patterns of *BcWRKY* genes in different habitats

相关。从基因的进化树中选取与拟南芥干旱、高低温胁迫响应基因的 *BcWRKY* 中置信度较高的 9 个同源基因（表 2），进行实时荧光定量 PCR 验证。分析 *BcWRKY* 基因在对照组（CK）、干旱（DM）、干旱＋高温（DH）、干旱＋低温（DL）处理下的相对表达量，结果显示（图 10），多数 *BcWRKY* 基因在 DH 胁迫处理下表现出显著的表达上调，*BcWRKY9* 在所有胁迫处理中均表现出显著的表达激活（$P<0.05$），且 DH 处理下的上调幅度最大；*BcWRKY11*、*BcWRKY42*、*BcWRKY75* 均仅在 DH 处理下呈现显著的表达上调（$P<0.05$），其表达量显著高于其他胁迫处理组；*BcWRKY36*

表 2　北柴胡与拟南芥同源 *AtWRKY* 同源基因及基因功能

Table 2　*AtWRKY* homologous genes and gene functions

拟南芥基因	北柴胡同源基因	基因功能
AtWRKY22	*BcWRKY6*	调节水杨酸和茉莉酸途径之间的相互作用，以响应广泛的生物和非生物刺激
AtWRKY71	*BcWRKY9*	*AtWRKY61* 为转录抑制因子。在植物的模式触发免疫（PTI）中发挥负调控作用，为植物在盐胁迫下完成其生命周期提供了一种手段；在植物适应环境方面发挥着关键作用
AtWRKY44	*BcWRKY10*	可能通过影响拟南芥的糖信号传导来调节干旱逃逸和耐旱性
AtWRKY 1	*BcWRKY11*	*AtWRKY1* 是植物中 WRKY 转录因子的成员，参与抗病性、非生物胁迫、衰老以及某些发育过程。在干旱胁迫下基因表达和气孔闭合中的作用
AtWRKY29	*BcWRKY22*	在热应激下，*AtBAG7* 被酰化、蛋白水解加工并从内质网易位到细胞核，在那里与 *WRKY29* 转录因子发生相互作用
AtWRKY44	*BcWRKY25*	可能通过影响拟南芥的糖信号传导来调节干旱逃逸和耐旱性
AtWRKY61	*BcWRKY36*	*AtWRKY61* 为转录抑制因子。在植物的模式触发免疫（PTI）中发挥负调控作用，为植物在盐胁迫下完成其生命周期提供了一种手段;在植物适应环境方面发挥着关键作用
AtWRKY 1	*BcWRKY42*	*AtWRKY1* 是植物中 WRKY 转录因子的成员，参与抗病性、非生物胁迫、衰老以及某些发育过程。在干旱胁迫下基因表达和气孔闭合中的作用
AtWRKY1	*BcWRKY75*	*WRKY1* 是植物中 WRKY 转录因子的成员，参与抗病性、非生物胁迫、衰老以及某些发育过程。在干旱胁迫下基因表达和气孔闭合中的作用



不同小写字母表示不同处理组间存在显著性差异（$P<0.05$，单因素方差分析）。

Different lowercase letters indicate significant differences among different treatment groups ($P < 0.05$, one-way ANOVA).

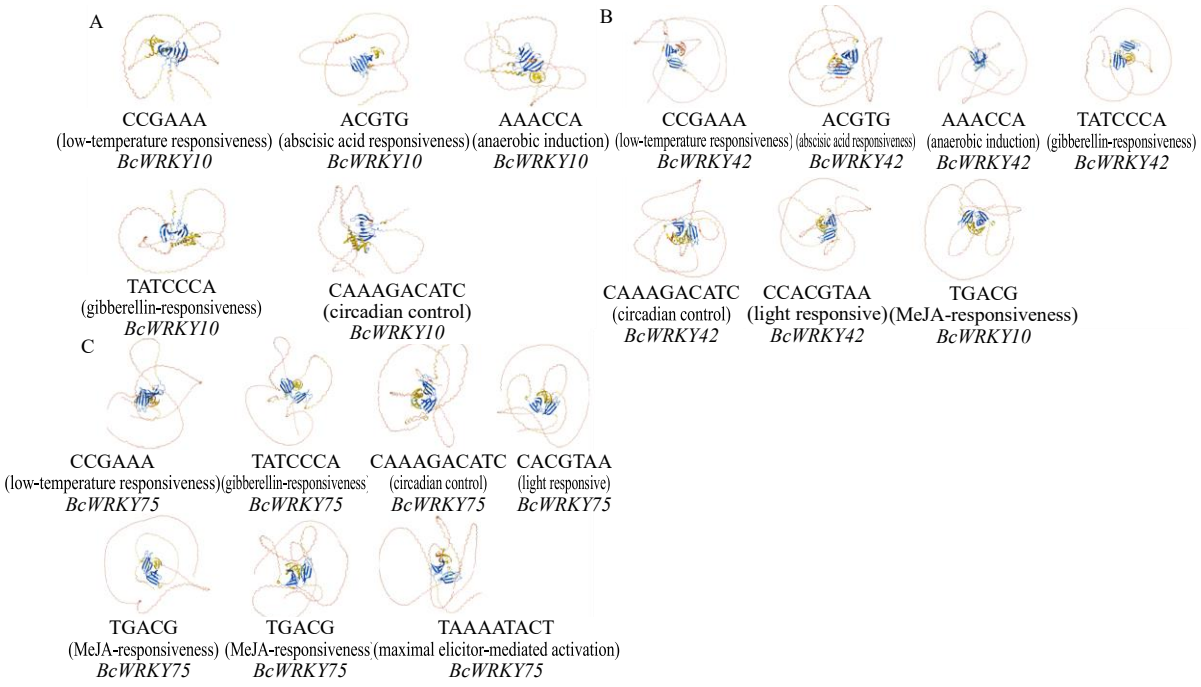
图 10　*BcWRKY* 基因在不同处理下的表达模式

Fig. 10　Expression patterns of *BcWRKY* genes under different treatments

在 DM、DH 处理下的表达量均显著高于 CK（$P<0.05$），且 2 种胁迫处理间未表现出显著性差异。*BcWRKY10*、*BcWRKY25* 在 DH 处理下均表现出显著的表达上调（$P<0.05$），但在其他胁迫处理下与 CK 无显著差异，进一步印证了 DH 处理对 *BcWRKY* 基因的强诱导效应。

3.5 蛋白互作预测分析

通过 q-PCR 筛选出积极响应水、热调控的 3 个 *BcWRKY* 基因（*BcWRKY10/42/75*）与筛选出的柴胡皂苷合成途径关键结构基因 *β-AS9*、*β-AS11* 的启动子区域的顺式作用元件进行蛋白互作预测分析。结果表明，*BcWRKY75*（图 11-A）主要结合低温响应、茉莉酸响应及光信号等元件，*BcWRKY42*（图 11-B）优先结合脱落酸响应、厌氧响应及低温响应等元件，而 *BcWRKY10*（图 11-C）则与厌氧响应、茉莉酸响应及光响应等元件存在稳定互作。在水热复合胁迫下，*BcWRKY10/42/75* 可能通过特异性结合 *β-AS9/11* 启动子的不同顺式作用元件，共同调控柴胡皂苷的合成速率与积累模式，以提升植株对逆境的适应能力。



A-BcWRKY10；B-BcWRKY42；C-BcWRKY75。

图 11 *BcWRKY* 蛋白互作预测

Fig. 11 Prediction of *BcWRKY* protein interactions

4 讨论

本研究通过对北柴胡中 WRKY 的全基因组分析，并进一步鉴定积极响应水、热胁迫信号变化的关键 *WRKY* 基因，发现北柴胡基因组中 WRKY 家族成员经历了较显著扩张，并广泛参与了非生物胁迫响应，共存在 107 对种内共线性基因，且与拟南芥存在较为广泛的同源关系，证明 *BcWRKY* 基因是在北柴胡演化过程中逐渐形成的，并产生新的蛋白功能以适应环境变化。也进一步表明 *WRKY* 基因家族的扩张主要因为全基因组复制和片段复制事件，并伴随纯化选择部分基因。在干旱与高温复合胁迫调控以及在栽培种与野生种间的表达模式存在分化。蛋白互作预测结果中互作元件涵盖了激素响应、非生物胁迫响应及光节律信号相关类型，与 qRT-PCR 筛选得到的 *BcWRKY10/42/75* 积极响应水、热胁迫的结果较为一致，通过特异性结合 *β-AS9/11* 启动子的顺式作用元件在转录水平调控柴胡皂苷的合成，为解析非生物胁迫下柴胡皂苷合成的转录调控网络提供了关键的结构生物学依据。

基于本课题组前期关于干旱、温度及其复合胁迫对北柴胡皂苷积累与基因表达影响的研究基础，本研究完成了 *BcWRKY* 家族的全基因组鉴定与分析，补充了 *BcWRKY* 基因的研究。北柴胡部分 *WRKY* 基因在温度胁迫下表现出较为显著的表达差异，且存在冷热胁迫特异性响应基因，这说明了北柴胡长期适应复杂的生态环境的特性。此外，本研究将

WRKY 基因表达模式与启动子元件特征相结合，初步构建了“元件-基因-胁迫响应”的关联模型，为环境质控下北柴胡质量形成的分子机制提供理论依据，同时为中药材的生态种植及质量稳定、可控提供理论依据。

与拟南芥、水稻等模式植物相比[29-30]，北柴胡 WRKY 家族成员数量较多，且进化分析表明，该基因扩张主要源于基因组复制事件并进行了强烈的纯化选择。这可能是北柴胡作为药用植物，为适应复杂环境并调控皂苷等多种次生代谢产物合成所形成的一种进化策略。*BcWRKY* 基因启动子区域富集脱落酸（ABA）和茉莉酸甲酯（MeJA）响应元件，这与已知的 ABA 和 MeJA 信号通路在介导干旱、高温胁迫响应中的核心作用高度吻合[25, 31-34]。*BcWRKY10/42/75* 在干旱与高温复合胁迫下表达较为显著。这与课题组前期发现的在特定胁迫下柴胡皂苷含量显著变化以及部分合成酶基因上调表达的结果相呼应[35]。推断这些受干旱与高温复合胁迫强烈诱导的 *BcWRKY* 基因可能是连接胁迫信号与皂苷生物合成调控网络的关键候选因子，现有研究中，跨物种同源基因在调控作物产量与品质形成中发挥作用，为推测 *BcWRKY10/42/75* 的潜在功能提供了参考依据。如，柑橘 *CrWRKY42* 可直接结合类胡萝卜素合成基因及叶绿素降解基因的启动子并激活其表达，协同调控果实着色[36]。马铃薯 *StWRKY75* 作为热胁迫正向调控因子，其过表达可显著改善高温下的株高、块茎重及光合效率[37]。进一步表明，*BcWRKY10/42/75* 具有潜在调控逆境适应性与产量品质形成的能力。*BcWRKY22/42/75* 在栽培种与野生种间的表达差异，进一步证明这些基因的表达模式可能在北柴胡的人工驯化或生态适应过程中被选择，为分子标记辅助育种改良柴胡抗逆性与品质提供了新的候选靶点。

尽管本研究发现了多个受干旱高温胁迫显著诱导的 *WRKY* 候选基因，如 *BcWRKY10/42/75*，特别是其启动子区富集多种逆境与激素响应元件的特征，但仍然缺乏这些基因与柴胡皂苷合成通路关键酶基因之间直接调控关系的实验证据。但不可否认的是，本研究系统揭示了北柴胡 WRKY 家族在基因组扩张、进化保守性及胁迫响应表达模式方面的特征，为解析柴胡皂苷积累与环境胁迫之间的转录调控机制提供了潜在调控靶点。在今后的研究中，围绕关键候选 *BcWRKY* 基因开展功能验证，对阐明柴胡次生代谢的环境响应网络具有重要理论意义，也为通过分子育种提升柴胡药材的抗逆性与品质形成提供了关键基因资源与实验支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 569.

[2] 贾云鹏, 杨晓军, 王超, 等. 北柴胡根部的化学成分研究 [J]. 中草药, 2024, 55(2): 402-408.

[3] 高芳荣, 王威宇, 罗培琰, 等. 基于拟靶向胆汁酸代谢组学筛选柴胡抗抑郁的活性部位 [J]. 中草药, 2024, 55(3): 832-841.

[4] 闫学成, 孙学亮, 方珍珍, 等. 饲料中添加柴胡及其提取物对锦鲤幼鱼生长、生理生化、肝脏抗氧化及抗菌能力的影响 [J]. 饲料研究, 2024, 47(2): 46-52.

[5] 周志鸿, 黄红泓, 凌俞鸿, 等. 基于网络药理学探讨柴胡抗酒精性肝病的作用机制 [J]. 中国医药科学, 2023, 13(12): 22-26.

[6] Feng S H, Li K, Lv W W, *et al*. Extraction, characterization, antioxidation and anti-inflammatory activity of polysaccharides from *Bupleurum chinense* based on different molecular weights [J]. *Nat Prod Res*, 2025, 39(20): 5832-5842.

[7] Wang S J, Ye W, Li W Y, *et al*. Effects and mechanisms of Xiaochaihu Tang against liver fibrosis: An integration of network pharmacology, molecular docking and experimental validation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 303: 116053.

[8] 杨利民. 中药材生态种植理论与技术前沿 [J]. 吉林农业大学学报, 2020, 42(4): 355-363.

[9] Yang L L, Zhao Y, Zhang Q, *et al*. Effects of drought-re-watering-drought on the photosynthesis physiology and secondary metabolite production of *Bupleurum chinense* DC [J]. *Plant Cell Rep*, 2019, 38(9): 1181-1197.

[10] Gu X P, Yang L L, Wan J, *et al*. Genome-wide identification of BcMYB in *Bupleurum* chinense DC. and its regulatory roles in saikosaponins synthesis under temperature stress [J]. *BMC Plant Biol*, 2025, 25(1): 1577.

[11] Yang L L, Qiao L, Su X H, *et al*. Drought stress stimulates the terpenoid backbone and triterpenoid biosynthesis pathway to promote the synthesis of saikosaponin in *Bupleurum chinense* DC. roots [J]. *Molecules*, 2022, 27(17): 5470.

[12] Yang L L, Yang L, Yang X, *et al*. Drought stress induces biosynthesis of flavonoids in leaves and saikosaponins in roots of *Bupleurum chinense* DC [J]. *Phytochemistry*, 2020, 177: 112434.

[13] Gu X P, Yang L L, Zhang D, *et al*. Artificial regulation of

light quality to increase saikosaponin accumulation in *Bupleurum chinense* DC [J]. *Ind Crops Prod*, 2025, 237: 122231.

[14] Cao W Z, Wang Y, Shi M, *et al*. Transcription factor SmWRKY1 positively promotes the biosynthesis of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 554.

[15] Chen T T, Li Y P, Xie L H, *et al*. AaWRKY17, a positive regulator of artemisinin biosynthesis, is involved in resistance to *Pseudomonas syringae* in *Artemisia annua* [J]. *Hortic Res*, 2021, 8(1): 217.

[16] Tang Y, Xia P G. WRKY transcription factors: Key regulators in plant drought tolerance [J]. *Plant Sci*, 2025, 359: 112647.

[17] Ma N N, Jiang D K, Li T, *et al*. The specificity landscape of WRKY transcription factors reveals the bidirectional influence of non-CG methylation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2025, 53(21): gkaf1168.

[18] 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, 27(4): 16-20.

[19] 王凌健, 方欣, 杨长青, 等. 植物萜类次生代谢及其调控 [J]. 中国科学: 生命科学, 2013, 43(12): 1030-1046.

[20] 乔孟, 于延冲, 向凤宁. 拟南芥 R2R3-MYB 类转录因子在环境胁迫中的作用 [J]. 生命科学, 2009, 21(1): 145-150.

[21] 刘辉, 李德军, 邓治. 植物应答低温胁迫的转录调控网络研究进展 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(18): 3523-3533.

[22] John Lilly J, Subramanian B. Gene network mediated by WRKY13 to regulate resistance against sheath infecting fungi in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Sci*, 2019, 280: 269-282.

[23] Gupta S, Mishra V K, Kumari S, *et al*. Deciphering genome-wide WRKY gene family of *Triticum aestivum* L. and their functional role in response to Abiotic stress [J]. *Genes Genomics*, 2019, 41(1): 79-94.

[24] He H S, Dong Q, Shao Y H, *et al*. Genome-wide survey and characterization of the WRKY gene family in *Populus trichocarpa* [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(7): 1199-1217.

[25] 曹小凤, 刘汶泽, 周省委, 等. 半夏 WRKY 转录因子家族鉴定及温度调控下表达模式分析 [J]. 植物生理学报, 2025, 61(10): 1401-1413.

[26] 刘汶泽, 周省委, 张韶珂, 等. 颠茄 WRKY 转录因子基因家族全基因组鉴定及光、温调控下表达模式分析 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(21): 5843-5855.

[27] 王萍. 人参 *WRKY* 基因家族鉴定及其调控人参皂苷合成作用的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2023.

[28] Yang L L, Gu X P, Zhou S W, *et al*. Combined drought and high temperature stress enhances saikosaponin biosynthesis in *Bupleurum chinense* through multi-level regulatory mechanisms [J]. *BMC Plant Biol*, 2025, 26(1): 141.

[29] Qu L J, Zhu Y X. Transcription factor families in *Arabidopsis*: Major progress and outstanding issues for future research [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(5): 544-549.

[30] Cheng P L, Cheng W H, Yan T T, *et al*. Transcriptomic and metabolomic analysis between Rose varieties which are resistant or susceptible to *Alternaria alternata* [J]. *Funct Integr Genomics*, 2026, 26(1): 21.

[31] 闫琪琪, 卜芋芬, 张小欣, 等. 植物 C2 结构域脱落酸相关蛋白的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2026, 42(4): 17-25.

[32] 王玥, 李洪昭, 王紫卉, 等. 纳米颗粒缓解作物干旱胁迫机制的研究进展 [J]. 中国生态农业学报: 中英文, 2026, 34(1): 21-32.

[33] 车阳, 邢志鹏, 蒋伟勤, 等. 外源植物生长调节剂对高温胁迫下水稻颖花分化及退化的影响 [J]. 江苏农业学报, 2025, 41(8): 1475-1483.

[34] 周省委, 陈璐, 顾旭鹏, 等. 颠茄生长素应答因子 ARF 基因家族的全基因组鉴定及表达特征分析 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7419-7434.

[35] 顾旭鹏, 刘天亮, 张迪, 等. 柴胡药材的考证及道地性品质形成研究进展 [J]. 中草药, 2026, 57(2): 711-720.

[36] Chen H Y, Ji H Y, Huang W K, *et al*. Transcription factor CrWRKY42 coregulates chlorophyll degradation and carotenoid biosynthesis in *Citrus* [J]. *Plant Physiol*, 2024, 195(1): 728-744.

[37] Zhu X, Duan X Q, Majeed Y, *et al*. Functional analysis of StWRKY75 gene in response to heat stress in potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *Front Plant Sci*, 2025, 16: 1617625.

[责任编辑 时圣明]