

## • 药材与资源 •

## 秦艽 WRKY 转录因子家族生物信息学分析

何懿菡, 尹洋洋, 胡伟, 李铂, 孙晓春, 王楠, 黄文静, 岳正刚\*

陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化省部共建协同创新中心 秦药资源研究开发国家重点实验室(培育), 陕西 咸阳 712046

**摘要:** 目的 利用生信技术分析秦艽 WRKY 家族, 为进一步研究 GmWRKY 转录因子对秦艽次生代谢产物生物合成的分子调控机制提供信息。方法 基于秦艽转录组注释结果挖掘 WRKY 家族成员, 通过 NCBI-tBlastx 和 SMART 保守结构域预测进一步筛选得到 41 条 WRKY 序列并进行生信分析。基于 getorf 预测开放阅读框(open reading frame, ORF)区, 对 41 条序列的 ORF 片段进行 MEME 保守基序分析和 ClustalW 比对, 采用 MEGAX 构建邻接法(neighbor-joining, NJ)系统发育树。利用 Omicshare GO 对 41 个 WRKY 成员进行富集分析, 利用 String 进行 WRKY 成员蛋白互作网络预测分析。通过转录组 FPKM 值对 GmWRKY 成员的基因表达情况进行热图分析, 并对蛋白互作核心成员进行基因相对表达分析。结果 41 个秦艽 WRKY 成员中大部分成员的保守基序为“WRKYGQK”, 仅 GmWRKY27 保守基序发生氨基酸突变, 为“WRKYGKK”。依据 WRKY 特征结构域将 41 条序列的 51 个结构域分为 3 大类和 8 个亚类型, 第 I 大类为氮端(N)和碳端(C), 第 II 大类下设 5 个亚类型, 以及第 III 大类; 此外, 系统进化树可将 51 个 WRKY 结构域分成 4 大组, Group I [I(N)]、Group II (IIa+IIb)、Group III [I(C)+IIc]、Group IV (IId+IIe 和 III), 该结果与经典的 WRKY 家族分类特点基本一致。GO 分析发现秦艽 WRKY 家族成员广泛参与代谢调控过程。当茉莉酸甲酯(jasmonic acid methyl ester, MeJA)诱导秦艽后, 蛋白网络互作的核心成员 GmWRKY1 和 GmWRKY17 表达显著提高, 推测这些 WRKY 成员与秦艽次生代谢产物的调控关系密切。结论 为进一步开展秦艽 WRKY 转录因子功能研究奠定基础。

**关键词:** 秦艽; WRKY 转录因子; 生物信息学; 转录组分析; 次生代谢产物

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)23-7499-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.23.021

## Bioinformatics analysis of WRKY transcription factor family of *Gentiana macrophylla*

HE Yi-han, YIN Yang-yang, HU Wei, LI Bo, SUN Xiao-chun, WANG Nan, HUANG Wen-jing, YUE Zheng-gang

State Key Laboratory of Research &amp; Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation), Shaanxi Collaborative

Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi university of Chinese, Xianyang 712046, China

**Abstract: Objective** To analyze the WRKY family of *Gentiana macrophylla* (GmWRKY) using biotransformation techniques in order to provide information for further research on the molecular regulation mechanism of GmWRKY transcription factor on the biosynthesis of the secondary metabolites of *G. macrophylla*. **Methods** Based on the annotation results of WRKY family members, 41 WRKY sequences were further screened by NCBI-tBLASTx and SMART domains for bioinformatics analysis. Based on getorf prediction of open reading frame (ORF) region, MEME conservative motif analysis and ClustalW alignment were performed on ORF fragments of 41 sequences, and the neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree was constructed by MEGAX. The enrichment analysis of 41 WRKY members was performed using Omicshare GO. And prediction analysis of WRKY member protein interaction network was performed by String. The expression of WRKY members was analyzed by heat map based on the FPKM value of the transcriptome, and the relative gene expression of the core members of GmWRKY protein interaction was analyzed. **Results** Most of the 41 GmWRKY members had a conserved motif of "WRKYGQK", and only THE GmWRKY27 conserved motif had an amino acid mutation of "WRKYGKK". According to the WRKY characteristic domain, 51 domains of 41 sequences were divided into three categories and eight subtypes. The first category consisted of nitrogen terminal (N) and carbon terminal (C), the second category consisted of 5 subtypes and the third

收稿日期: 2022-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(81903753); 陕西中医药大学科学基金项目(2017PY06)

作者简介: 何懿菡, 讲师, 研究方向为药用植物资源及次生代谢产物调控。Tel: (029)38183207 E-mail: annaid@126.com

\*通信作者: 岳正刚, 副教授, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (029)38183301 E-mail: liuxingjian1981@163.com

category. Phylogenetic tree can divide 51 WRKY domains into four groups: GroupI [I(N)], GroupII (IIa+IIb), GroupIII [I(C)+IIc], GroupIV (IId+IIe and III). These results were consistent with the classic WRKY family classification. GO analysis revealed that members of the GmWRKY family were extensively involved in metabolic regulation. The expression of *GmWRKY1* and *GmWRKY17*, the core members of protein network interaction, were significantly increased when *G. macrophylla* was induced by MeJA, suggesting that these WRKY members were closely related to the regulation of secondary metabolites of *G. macrophylla*. **Conclusion** This study can lay a foundation for further research on the function of GmWRKY transcription factors..

**Key words:** *Gentiana macrophylla* Pall.; WRKY transcription factors; bioinformatics analysis; transcriptome analysis; secondary metabolites

秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall. 为“秦药”大宗道地中药材, 是龙胆科 (Gentianaceae) 龙胆属 *Gentiana* L. 的一种多年生草本植物, 以干燥根入药, 具有祛风湿、清温热、止痹痛、退虚热之功效<sup>[1-2]</sup>, 其主要的次生代谢产物是以龙胆苦苷 (gentiopicoside) 为代表的裂环烯醚萜苷类化合物<sup>[3]</sup>, 这类化合物是秦艽发挥临床疗效的物质基础, 也是评价秦艽药材质量的重要指标<sup>[4]</sup>。

植物次生代谢产物也称“植保素”, 是植物为了适应环境胁迫而产生的物质<sup>[5]</sup>。当植物受到外界胁迫后, 体内会有一系列信号连锁反应, 其中, 转录调控是细胞内部调控网络中的重要一环, 而转录因子能够通过协调转录酶与 DNA 模板的相互作用, 来激活或抑制下游基因的表达<sup>[6]</sup>。WRKY 是植物中重要的一类转录因子, 可参与植物的生长发育<sup>[7]</sup>, 调控植物次生代谢产物的生物合成<sup>[8]</sup>, 以及响应各种生物和非生物胁迫<sup>[9]</sup>等生物进程。

WRKY 转录因子调控药用植物次生代谢产物生物合成是当前研究的热点之一。研究发现, 过表达 *SmWRKY2* 可促进丹参毛状根中丹参酮含量的积累, 其主要通过激活丹参酮合成途径酶关键基因 *SmCPS* 来提高丹参酮的合成<sup>[10]</sup>。人参 *PgWRKY4X* 基因可响应病原菌的诱导, 同时过表达 *PgWRKY4X* 基因可显著提高人参皂苷含量<sup>[11]</sup>。过表达 *OpWRKY2* 基因可将短小蛇根草中喜树碱的含量提高 3 倍, 干涉 *OpWRKY2* 基因则显著降低喜树碱的含量<sup>[12]</sup>。过表达长春花 *CrWRKY1* 基因可以显著提高代谢途径的关键酶基因色氨酸脱羧酶和转录抑制因子 ZCT 的表达, 并抑制转录激活因子 ORCA2、ORCA3 和 CrMYC2, 从而使长春花 *CrWRKY1* 转基因毛状根中的蛇根碱含量显著增加<sup>[13]</sup>。这些研究都表明 WRKY 转录因子在调控植物代谢产物积累中发挥着重要的作用。

本研究建立在秦艽转录组数据的基础上, 对 WRKY 转录因子家族成员保守结构域、系统发育关系、基因表达水平、转录因子蛋白互作等方面进行了分析, 为后期研究 WRKY 转录因子调控秦艽次

生代谢产物的机制奠定基础。

## 1 材料

样品采自甘肃庆阳正宁县由陕西中医药大学李铂教授鉴定为秦艽 *G. macrophylla* Pall. 的种子, 于温室撒播种子给予 16 h 光照, 8 h 黑暗处理, 覆膜出苗后培养一年生用于试验。多通道荧光定量 PCR 仪 qTOWER 2.0 (德国耶拿公司)。

## 2 方法

### 2.1 秦艽 WRKY 转录因子家族成员的鉴定

研究前期以 50 μmol/L 柠檬酸铵 (ammonium citrate, AC)、200 μmol/L 茉莉酸甲酯 (jasmonic acid methyl ester, MeJA) 为诱导子, 水处理为对照分别处理秦艽幼苗 6 h, 送于深圳千年基因 (Macrogen 公司, 中国) 完成秦艽转录组测序和分析。本研究基于转录组基因注释结果, 初步筛得 74 条潜在的秦艽 WRKY 基因, 逐条进行 NCBI-tBlastx 序列相似度比对, 参数为默认, 以判定序列确为 WRKY 家族。并进一步利用 SMART 数据库 (<http://smart.embl.de/>) 比较序列家族特征, 去掉 WRKY 结构域不完整的序列, 最终筛选得到 41 条 WRKY 基因。

### 2.2 GmWRKY 保守基序分析、蛋白多重比对以及系统进化树的构建

首先利用 getorf (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/getorf>) 在线分析 41 条序列的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 区, 并选择含有 WRKY 基序的 ORF 长片段。随后, 通过 MEME 在线软件 (<https://meme-suite.org/meme/>) 对秦艽 WRKY 蛋白序列进行保守基序鉴定, 参数选择分析 3 个保守区。利用 MEGAX<sup>[14]</sup> 对秦艽 WRKY 家族序列的 ORF 区域进行 ClustalW 比对, 选取保守区, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 进行系统进化树的构建, Bootstrap 检测值为 1000, 其他使用参数均为默认值。

### 2.3 GmWRKY 转录因子家族成员 (GO) 注释及蛋白质网络互作

利用 Omicshare GO 富集分析工具建立 WRKY 家族转录组注释信息。利用 String 蛋白互作数据库

(<http://string-db.org/>) 对秦艽 WRKY 蛋白进行互作网络预测分析, 选择拟南芥为参考物种。并利用 Cytoscape 3.8.0<sup>[15]</sup>对互作结果进行视图优化。

### 2.4 GmWRKY 转录因子家族成员的表达分析

基于转录组数据挖掘 MeJA、AC 和对照组的 GmWRKY 转录因子的 FPKM 值, 用 Omicshare 热图分析工具对 FPKM 值进行聚类分析和可视化, 分析类型选 pearson。

对蛋白互作网络核心成员 *GmWRKY1*、

*GmWRKY17*、*GmWRKY25* 和 *GmWRKY15* 进行基因相对表达分析, *SAND1* 为内参<sup>[16]</sup>, 引物信息见表 1。用 200 μmol/L MeJA 和对照水分别喷施处理秦艽幼苗 6 h, 收集对照和处理组的叶, 重复 3 组, 分别提取 RNA, 对 1%凝胶电泳和 Nanodrop 检测合格的 RNA 用于后续的定量实验。使用德国耶拿荧光定量梯度 PCR 仪 qTOWER 2.0, 反应条件为 95 °C、30 s 预变性, 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 40 个循环。利用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 计算基因相对表达水平<sup>[17]</sup>。

表 1 实时荧光定量基因表达序列引物

Table 1 qRT-PCR gene expression sequence primers

基因名称	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
<i>GmWRKY1</i>	TCTTCTACCAATTCTCTgTCTgTTT	ACAgATggCTACAACCTTgAC
<i>GmWRKY15</i>	ggAgATTACTggCACCgATATg	gCgATTCgTTAAgAAAggTTgTAG
<i>GmWRKY17</i>	AggCagTTCTTTCAGCTATCC	CTTCCTTACCgATCTTCTTTCT
<i>GmWRKY25</i>	ggACAgAACAggTgAgAgTTAg	ggAAATTTggCTCCCAgAATg
<i>SAND1</i>	TTCATGGTGATTCTCCAGC	TTCAAGGAAGATGACAACC

## 3 结果

### 3.1 GmWRKY 转录因子家族成员的鉴定

在秦艽转录组数据有 74 条基因被注释为秦艽 WRKY 基因, 序列最短为 209 bp, 最长为 2671 bp。通过对 74 条基因逐条进行 NCBI-tBlastx 比对, 初步判定序列均为 WRKY 家族成员, 但因部分序列信息不完整, 结构域缺失, 结合在线软件 SMART 分析结果, 去除保守结构域不完整的序列, 将明确具有 WRKY 保守结构域的 41 条序列列为秦艽 WRKY 家族成员, 并依次命名为 *GmWRKY1* ~ *GmWRKY41*, 作为后续研究的对象。

### 3.2 GmWRKY 家族成员蛋白质保守区分析

使用在线软件 MEME 分析 41 条秦艽 WRKY 家族蛋白的保守基序, 经分析比对后 3 个保守区 Motif1、Motif2、Motif3 的基序长度分别为 29、29、50 个氨基酸。其中, Motif 1 和 Motif 3 是 WRKY 基因的七肽保守序列, Motif 2 是秦艽 WRKY 基因的特征基序 (图 1)。41 条序列中, 其中 34 条序列包含 Motif1 和 Motif2, 这 34 条序列中又有 10 条序列含 Motif3。此外, *GmWRKY7*、24、29 和 31 只含有 1 个保守区 Motif1; *GmWRKY16*、26 和 30 只含有 1 个保守区 Motif2。

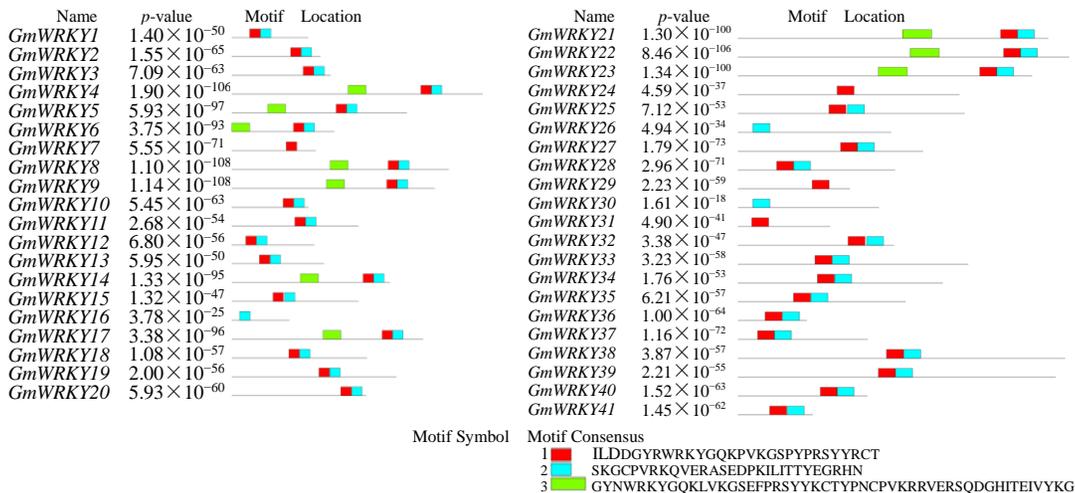


图 1 秦艽 41 个 WRKY 家族成员蛋白保守基序分析

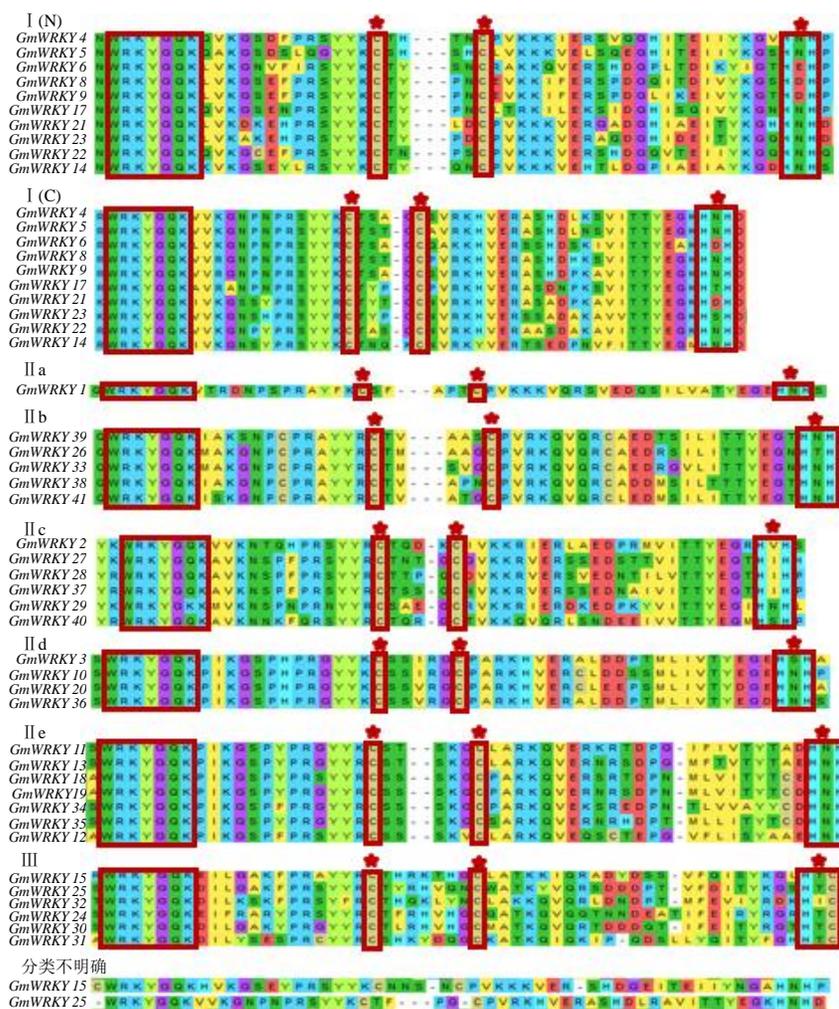
Fig. 1 Conserved motifs of 41 WRKY family members in *G. macrophylla*

### 3.3 蛋白质序列比对及系统进化分析

多重序列比对分析结果发现 41 个 GmWRKY 蛋白均含有完整的结构域核心序列 (图 2)。大部分序列具有 WRKY 家族的保守基序“WRKYGQK”, 仅 GmWRKY27 蛋白保守基序中的“Q”变成“K”。依据 WRKY 家族的结构特征, 将 41 个 WRKY 蛋白分为 3 大类, 其中 10 个蛋白为第 I 类, 该类蛋白含有 2 个“WRKYGQK”序列, 分别位于序列的 N 端和 C 端, 以及 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指结构。第 II 类有 23 个蛋白, 特点是含有 1 个 WRKY 结构域, 锌指结构为 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型, 该大类可根据序列差异可进一步细化为 5 个小类, 即 IIa~IIe。第 III 类有 6 个 WRKY 转录因子, 含有

1 个 WRKY 结构域, 锌指结构为 C<sub>2</sub>HC 型。GmWRKY7 和 GmWRKY16 与其他家族成员之间的保守氨基酸位点存在较大差异, 分类不明确。

基于 MEGAX 比对秦艽 41 个 WRKY 家族成员的 51 个 WRKY 保守域, 并构建系统进化树, 其结果与保守结构域分类情况基本一致。系统进化树可将秦艽的 3 大类 WRKY 家族成员分为 4 大组 (图 3), Group1 [I (N)], Group2 [IIc+I(C)], Group3 (IIa+IIb), Group4 (IId+IIe 和 III)。其中, Group2 与 Group1 亲缘关系较近, 聚为一大支。Group3 与 Group4 亲缘关系近, 被聚为另一大支。对于分类不明确的 GmWRKY7 和 GmWRKY16 分别聚类到了 I (C) 和 I (N), 与第 I 类亲缘关系较近。



红色方框表示 WRKY 核心结构域, 红色方框+★ 表示锌指结构; I 类的 2 个 WRKY 结构域, 分别标识为“N”和“C”端  
Red box indicates conserved WRKY amino acid signature. The red box with a red asterisk indicates zinc-finger motif. “N” and “C” indicate the N-terminal and C-terminal WRKY domain of a specific class I

图 2 WRKY 家族核心序列比对结果

Fig. 2 Multiple sequence alignment of WRKY domain from GmWRKYs

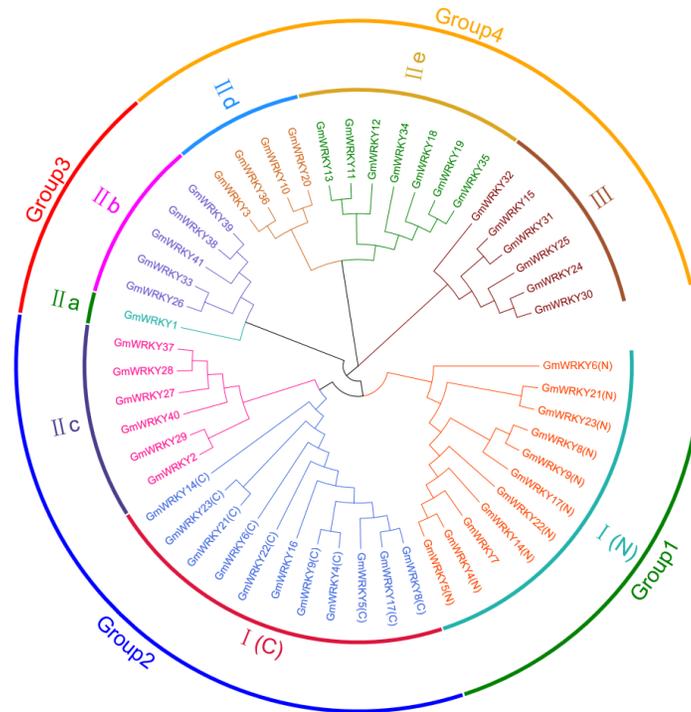


图 3 WRKY 家族的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *G. macrophylla* WRKY family

3.4 GmWRKY 转录因子家族成员 GO 注释

基于转录组 GO 数据库信息，对秦艽 WRKY 转录因子进行功能注释。对于大部分秦艽 WRKY 基因在 GO 的二级分类的生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 3 个大类中得到注释 (图 4)。

在生物过程中细胞过程 (cellular process) 和代谢过程 (metabolic process) 富集了 40 条序列信息。在细胞组分中有 40 条可富集于细胞 (cell)、细胞部分 (cell part) 和细胞器 (organelle)。分子功能中有 40 条序列可富集于结合 (binding) 和核酸结合转录因子活性 (Nucleic acid binding transcription factor activity)。

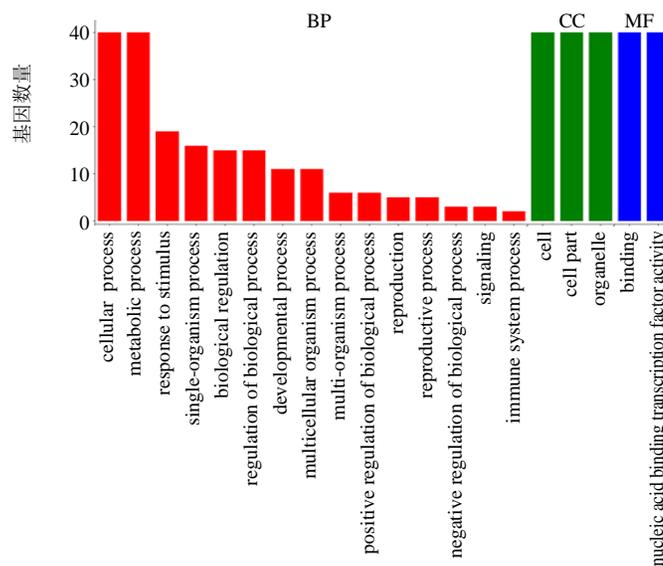


图 4 秦艽 WRKY 家族成员的 GO 注释信息

Fig. 4 GO annotations of WRKY members in *G. macrophylla*

### 3.5 GmWRKY 蛋白互作网络预测

基于 String 数据库，构建了秦艽 41 条 WRKY 转录因子家族成员的蛋白互作网络，去除没有相互关系作用的成员，秦艽 WRKY 家族中的 11 个成员间有蛋白质互作的关系（图 5）。可依据相互作用分为 3 块互作网络。其中，GmWRKY1、GmWRKY17、GmWRKY25 和 GmWRKY15 为互作网络中的 4 个主要中心节点，相互作用关系最强。这 4 个主要中心节点与 GmWRKY31、GmWRKY13 和 GmWRKY28 之间也存在着相互作用关系。GmWRKY4 和 GmWRKY16，GmWRKY39、GmWRKY19 和 GmWRKY41 为 2 块具有独立互作的蛋白网络。

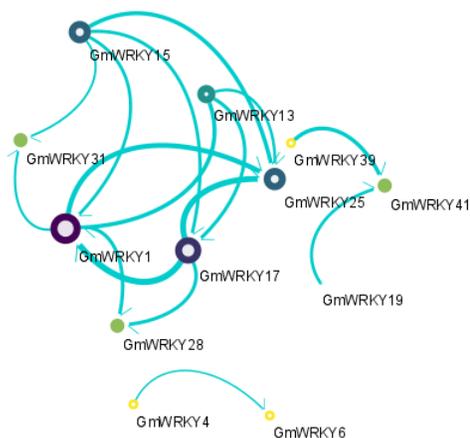


图 5 秦艽 WRKY 家族成员的蛋白互作网络

Fig. 5 Protein association network of WRKY members in *G. macrophylla*

### 3.6 GmWRKY 转录因子家族成员表达模式分析

基于秦艽转录组数据的 FPKM 值，对 WRKY 基因在 MeJA 和 AC 诱导后的表达水平差异进行热图分析，和对照 (CK) 相比，41 条 GmWRKY 家族成员受诱导调控显著，且不同成员对于 MeJA 和 AC 诱导响应强度不同（图 6）。基因表达聚类结果显示，GmWRKY3 至 GmWRKY20，和对照相比，MeJA 诱导后表达明显降低。GmWRKY7 至 GmWRKY35 在 MeJA 和 AC 诱导后普遍降低。GmWRKY22 至 GmWRKY17 在 MeJA 和 AC 诱导后普遍升高。GmWRKY2 至 GmWRKY37 在 AC 诱导后表达显著升高。GmWRKY16 至 GmWRKY33 在 AC 诱导后表达显著升高，而对 MeJA 诱导响应不强。GmWRKY1 至 GmWRKY25，和对照相比，MeJA 诱导后表达明显升高而 AC 诱导后表达普遍降低。

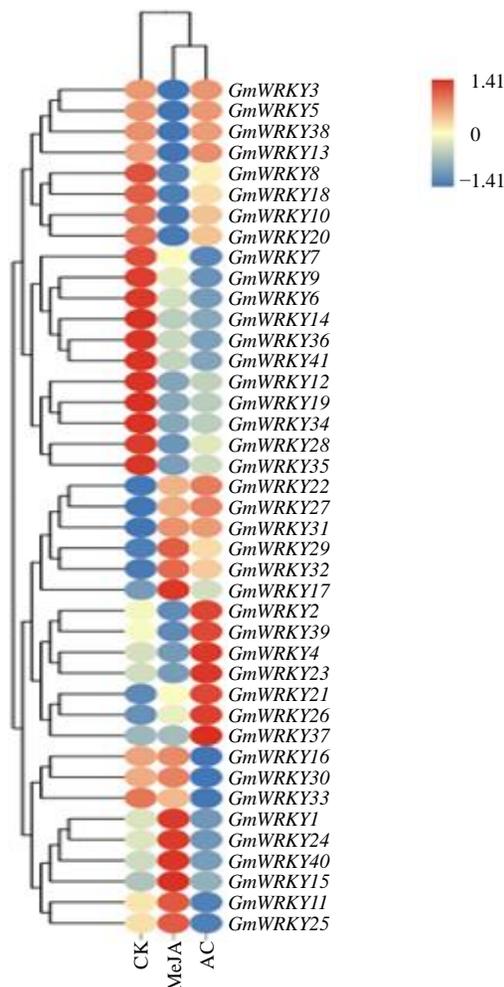


图 6 基于转录组 FPKM 值分析秦艽 GmWRKY 基因表达差异

Fig. 6 Analysis of *GmWRKY* gene expression differences based on FPKM value of transcriptome

以秦艽 WRKY 家族成员蛋白互作网络关系最强的 4 个节点 GmWRKY1、GmWRKY17、GmWRKY25 和 GmWRKY15 进行 qRT-PCR 基因表达分析（图 7）。当秦艽受到 MeJA 诱导后，叶中 GmWRKY1 表达量显著升高，其次是 GmWRKY17，GmWRKY15 和 GmWRKY25 差异不显著。

## 4 讨论

WRKY 转录因子家族因 N 端包含高度保守的 WRKY 结构域“WRKYGQK”而得名，该结构域能专一地与靶基因启动子区中的 W 盒 (TTGACC/T) 序列结合，激活或抑制基因的表达，进而调控植物的生长代谢，参与响应应激等各种生理活动<sup>[18]</sup>。秦艽 41 条 GmWRKY 家族成员 WRKY 结构域保守，大部分为“WRKYGQK”，

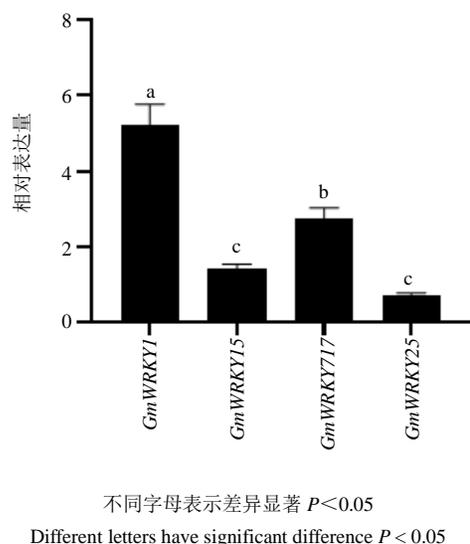


图 7 MeJA 处理下 WRKY 基因的相对表达分析

Fig. 7 Relative expression analysis of WRKY gene under MeJA treatment

仅 GmWRKY27 突变为“WRKYGKK”。在丹参、水稻、拟南芥等物种中也发现了类似的突变体，这种突变的产生也可能与物种长期进化有关<sup>[19]</sup>。有研究发现突变基序中谷氨酰胺（glutamine, G）氨基酸的突变会降低保守基序与 DNA 结合的能力<sup>[20]</sup>。对于 WRKY 结构域突变体的进化事件、以及突变体参与植物代谢调控的机制还需要进一步的研究。

Eulgem 等<sup>[21]</sup>依据 WRKY 家族成员的结构特点将其分为 3 大类型 I（N 端+C 端）、II（a、b、c、d、e）和 III。本研究对 GmWRKY 蛋白家族成员进行多重比对、保守基序分析结果发现秦艽 WRKY 家族成员也符合该分类特点，这些结果表明，不同物种的 WRKY 结构保守，功能可能也会比较相似。此外，系统进化树依据亲缘关系将 GmWRKY 保守域分为 2 大支，4 大组。II 类型的 WRKY 成员不单独分为一类，说明其并不是单系起源，且具有两个 WRKY 结构域基因的 C 端可能是具有一个 WRKY 域编码基因的祖先<sup>[22]</sup>。有研究发现许多来自不同系统发育群的 WRKY 基因参与植物响应同样的胁迫应激，说明 WRKY 家族可广泛参与植物的各种生理代谢调控网络，对 WRKY 家族的起源、进化关系的了解可以为其功能的研究提供有价值的信息<sup>[22]</sup>。

随着转录组测序技术的发展，越来越多药用植物的 WRKY 转录因子家族被挖掘和研究。WRKY 家族在阳春砂和丹参中被挖掘，并预测了参与次生代谢产物合成相关的 WRKY 转录因子<sup>[23-24]</sup>。在红

豆杉中挖掘了 61 条 WRKY 家族，并发现过表达 WRKY 成员能够提高目标药用成分的含量<sup>[25]</sup>。本研究基于秦艽转录组挖掘了 41 条 WRKY 转录因子，通过 GO 数据分析发现这些家族成员中有 40 条具有与核酸结合的转录因子活性，并广泛参与代谢调控过程。基于转录组数据的基因表达热图显示，WRKY 成员对 MeJA 和 AC 的响应强度不同，推测不同成员在植物体内参与代谢调控的方式可能存在差异。此外，网络互作中的核心成员在受到 MeJA 诱导后基因表达均有所升高，其中 GmWRKY1 和 GmWRKY17 升高最为显著，推测这些 WRKY 成员与秦艽次生代谢产物的调控关系密切。对秦艽 WRKY 转录因子家族的分析将为进一步研究 WRKY 转录因子参与调控裂环烯醚萜苷类代谢产物合成途径奠定基础。

**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]. 四部. 2020: 45.
- [2] 胡本祥, 彭亮, 杨冰月, 等. “秦药”的现代研究概况 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 4949-4959.
- [3] 陈千良, 石张燕, 涂光忠, 等. 陕西产秦艽的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(19): 1519-1522.
- [4] 马丽娜, 张铁军, 田成旺, 等. 大孔树脂分离纯化川西獐牙菜中环烯醚萜苷类和酮类成分的工艺研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 227-231.
- [5] 郭兰萍, 周良云, 康传志, 等. 药用植物适应环境胁迫的策略及道地药材“拟境栽培” [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(9): 1969-1974.
- [6] Lee T I, Young R A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes [J]. *Annu Rev Genet*, 2000, 34: 77-137.
- [7] Yang Y, Chi Y J, Wang Z, et al. Functional analysis of structurally related soybean GmWRKY58 and GmWRKY76 in plant growth and development [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67(15): 4727-4742.
- [8] Schluttenhofer C, Yuan L. Regulation of specialized metabolism by WRKY transcription factors [J]. *Plant Physiol*, 2015, 167(2): 295-306.
- [9] Wani S H, Anand S, Singh B, et al. WRKY transcription factors and plant defense responses: Latest discoveries and future prospects [J]. *Plant Cell Rep*, 2021, 40(7): 1071-1085.
- [10] Deng C P, Hao X L, Shi M, et al. Tanshinone production could be increased by the expression of SmWRKY<sub>2</sub> in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Plant Sci*, 2019, 284: 1-8.

- [11] Yao L, Wang J, Sun J C, *et al.* A WRKY transcription factor, PgWRKY4X, positively regulates ginsenoside biosynthesis by activating squalene epoxidase transcription in *Panax ginseng* [J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 154: 112671.
- [12] Hao X L, Xie C H, Ruan Q Y, *et al.* The transcription factor OpWRKY<sub>2</sub> positively regulates the biosynthesis of the anticancer drug camptothecin in *Ophiorrhiza pumila* [J]. *Hortic Res*, 2021, 8(1): 7.
- [13] Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, *et al.* The transcription factor CrWRKY<sub>1</sub> positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(4): 2081-2093.
- [14] Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [15] Shannon P, Markiel A, Ozier O, *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [16] He Y H, Yan H L, Hua W P, *et al.* Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR in *Gentiana macrophylla* [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 945.
- [17] Erickson H S, Albert P S, Gillespie J W, *et al.* Assessment of normalization strategies for quantitative RT-PCR using microdissected tissue samples [J]. *Lab Invest*, 2007, 87(9): 951-962.
- [18] Bakshi M, Oelmüller R. WRKY transcription factors: Jack of many trades in plants [J]. *Plant Signal Behav*, 2014, 9(2): e27700.
- [19] 田云, 卢向阳, 彭丽莎, 等. 植物WRKY转录因子结构特点及其生物学功能 [J]. *遗传*, 2006, 28(12): 1607-1612.
- [20] Duan M R, Nan J, Liang Y H, *et al.* DNA binding mechanism revealed by high resolution crystal structure of *Arabidopsis thaliana* WRKY<sub>1</sub> protein [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(4): 1145-1154.
- [21] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, *et al.* The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(5): 199-206.
- [22] Zhang Y J, Wang L J. The WRKY transcription factor superfamily: Its origin in eukaryotes and expansion in plants [J]. *BMC Evol Biol*, 2005, 5: 1.
- [23] He X Y, Wang H, Yang J F, *et al.* RNA sequencing on *Amomum villosum* Lour. induced by MeJA identifies the genes of WRKY and terpene synthases involved in terpene biosynthesis [J]. *Genome*, 2018, 61(2): 91-102.
- [24] Yu H Z, Guo W L, Yang D F, *et al.* Transcriptional profiles of *SmWRKY* family genes and their putative roles in the biosynthesis of tanshinone and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): E1593.
- [25] Zhang M, Chen Y, Nie L, *et al.* Transcriptome-wide identification and screening of WRKY factors involved in the regulation of taxol biosynthesis in *Taxus chinensis* [J]. *Scientif Reports*, 2018, 8(1): 5197.

[责任编辑 时圣明]