

参与连翘苯丙烷合成途径的WRKY转录因子的筛选与鉴定

张佳琪^{1,2}, 刘晓冉^{1,2}, 陈佳茜^{1,2}, 郭广洋^{1,2}, 谭新杰^{1,2}, 赵杏利^{1,2}, 肖华伟^{1,2}, 刘 浩^{1,2}, 侯典云^{1,2*}

1. 河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471023

2. 洛阳市道地药材繁育与创新利用工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023

摘要: 目的 筛选出参与连翘 *Forsythia suspensa* 苯丙烷合成途径的 WRKY 转录因子并进行生物信息学分析。方法 通过对从连翘转录组数据中筛选出的 62 条连翘 WRKY 基因序列进行鉴定; 通过采用蛋白理化性质和基序分析、蛋白结构分析、系统进化分析、功能注释、蛋白互作分析、外源激素处理后实时荧光定量分析等方式进行相关分析。结果 最终筛选出 52 条具有 WRKY 结构域的连翘 WRKY 转录因子。WRKY 转录因子编码蛋白的氨基酸数目在 105~728, 相对分子质量在 12 277.95~80 321.99。蛋白基序分析显示其均有 WRKY 结构域, 与拟南芥 WRKY 转录因子构建系统进化树将连翘 52 个 WRKY 转录因子进一步分为 3 大类; 筛选出 5 个可能参与连翘苯丙烷合成途径的连翘 WRKY 转录因子, 并推测其可能以被 MAPK 级联反应所调控的方式介导连翘中苯丙烷合成途径。结论 通过分析转录组测序结果, 从 52 个连翘 WRKY 转录因子中筛选出 5 个可能参与连翘苯丙烷合成途径的转录因子, 其表现出组织特异性表达, 且对不同浓度茉莉酸甲脂表现出不同的响应, 为进一步研究其作用机制提供研究方向。

关键词: 连翘; 次生代谢产物; WRKY; 转录因子; 苯丙烷合成途径

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)18-6055-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.18.023

Screening and identification of transcription factors WRKY involved in phenylpropane synthesis pathway in *Forsythia suspensa*

ZHANG Jia-qi^{1,2}, LIU Xiao-ran^{1,2}, CHEN Jia-xi^{1,2}, GUO Guang-yang^{1,2}, TAN Xin-jie^{1,2}, ZHAO Xing-li^{1,2}, XU Hua-wei^{1,2}, LIU Hao^{1,2}, HOU Dian-yun^{1,2}

1. College of Agricultural, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China

2. Luoyang Engineering Research Center of Breeding and Utilization of Dao-di Herbs, Luoyang 471023, China

Abstract: Objective To screen out the WRKY transcription factors involved in the phenylpropane synthesis pathway of *Forsythia suspensa* and conduct bioinformatics analysis. **Methods** A total of 62 WRKY gene sequences screened from *F. suspensa* transcriptome data were identified. Then the correlation analysis was carried out by means of protein physical and chemical properties and motif analysis, protein structure analysis, phylogenetic analysis, functional annotation, protein interaction analysis, real-time fluorescence quantitative analysis after exogenous hormone treatment. **Results** A total of 52 WRKY transcription factors with WRKY domain were screened. The number of amino acids of the protein encoded by WRKY transcription factor ranged from 105 to 728, and its molecular weight ranged from 12 277.95 to 80 321.99. The analysis of protein motif showed that all of them had WRKY domains, and the phylogenetic tree was constructed with *Arabidopsis* WRKY transcription factors to further divide 52 WRKY transcription factors of *F. suspensa* into three categories; Five *Forsythia* WRKY transcription factors that may participate in the phenylpropane synthesis pathway of *F. suspensa* were screened, and it was speculated that they may mediate the phenylpropane synthesis pathway of *F. suspensa* in a way regulated by MAPK cascade reaction. **Conclusion** By analyzing the transcriptome sequencing results, this study screened five transcription factors that may participate in the phenylpropane synthesis pathway of *F. suspensa* WRKY from 52 transcription factors, which showed tissue-specific expression and different responses to different concentrations of methyl jasmonate, providing a research direction for the further study of its mechanism of action.

Key words: *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl; secondary metabolites; WRKY; transcription factor; phenylpropane synthesis pathway

收稿日期: 2023-02-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(U1404829); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302); 河南省自然科学基金项目(202102110156); 河南省中药材产业科技特派员服务团、河南省中药产业技术体系建设专项资金资助

作者简介: 张佳琪(1998—), 硕士研究生, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: 799535911@qq.com

*通信作者: 侯典云(1975—), 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物资源评价与利用。Tel: (0379)6428230 E-mail: dianyun518@163.com

连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 为木犀科连翘属落叶灌木，多见于中国河南、河北、山东、陕西、山西等地区^[1]，其干燥果实入药，具有清热解毒、消肿散结、疏散风热等功效，用于风热感冒、温病初起、高热烦渴、神昏发斑、热淋涩痛等症治疗^[2]。据报道^[3]，连翘作为传统中药，在新型冠状病毒肺炎的预防和治疗中，也具有较好的疗效。研究表明，连翘中有多种次生代谢产物发挥药理作用，如类黄酮及萜类、酚酸类等^[4]，其中，通过苯丙烷途径产生的木脂素类（如连翘苷）和苯乙醇苷类（如连翘脂苷）是连翘的主要活性成分^[3]。苯丙烷途径含有丰富的苯丙烷类化合物和天然化合物。超过 70% 的医药产品是以植物代谢物为基础的，其中许多来自苯丙烷途径，包括木质素、黄酮类、香豆素、醌和木脂素，它们是许多结构聚合物的基本成分，也是调节生物相互作用的花色素、香味化合物或信号分子等^[5]。在许多中药植物中，如唇形科植物丹参、豆科植物黄芪等，其主要生物活性成分为苯丙烷类化合物，已被证明具有抗氧化剂、自由基清除剂、抗炎和抗癌化合物的作用^[6]。

茉莉酸甲酯（methyl jasmonate, MeJA）被证实可作为一种外源诱导因子对药用植物体内药理成分的积累产生影响，如雷公藤经 MeJA 诱导之后，显著提高了愈伤中雷公藤红素的合成^[7]，另外在连翘中也证明了茉莉酸甲酯喷施后连翘叶中连翘苷、连翘脂苷等都有不同程度影响^[8]。

WRKY 转录因子作为植物中最大的转录因子家族之一，仅存在于高等植物中，自 1994 年 Ishiguro 等^[9]在甘薯中第一次发现 WRKY 转录因子以来，越来越多的 WRKY 转录因子在多种植物中被鉴定和验证。据报道，WRKY 转录因子家族在多种植物中参与苯丙烷代谢途径，在次生代谢物质合成中起到重要的调控作用，如生姜 WRKY 转录因子 Zg WRKY1^[10]、葡萄 WRKY 转录因子 Vv WRKY2^[11] 和 Vv WRKY26^[12]、苜蓿 WRKY 转录因子 Mt WRKY 100630 和 Mt WRKY 108715^[13] 均参与调控苯丙烷代谢途径，但在连翘中未见报道。

本研究在课题组对连翘喷施 200 μmol/L 茉莉酸甲酯 12 h 和未做处理的连翘果实、叶片进行比较转录组测序的基础上，通过采用蛋白理化性质和基序分析、蛋白结构分析、系统进化分析等方式最终筛选出 52 条连翘 WRKY 转录因子，此外，通过进化树分析、功能注释、蛋白互作分析、外源激素处理后实时荧光定量分析等方式，筛选出 5 个可能参与

连翘苯丙烷合成途径的连翘 WRKY 转录因子，并推测其可能以被丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）级联反应所调控的方式介导连翘中次生代谢物质的合成，而其表现出组织特异性表达，且对不同浓度茉莉酸甲酯表现出不同的响应，为进一步研究其作用机制提供研究方向。

1 材料与仪器

1.1 材料

研究所用的样品采自河南洛阳市宜阳县连翘种植基地，由侯典云教授鉴定为连翘 *F. suspensa* (Thunb.) Vahl。

1.2 仪器

5415R 型低温高速离心机（Eppendorf 公司）、JY04S-3D 型凝胶成像分析系统（君意电泳公司）、实时荧光定量 PCR 仪（Lightcycler96, Roche 公司，瑞士）等。

2 方法

2.1 实验设计

7 月下旬，选择生长环境一致，生长状况良好的连翘植株挂签标明喷施浓度和日期，于 7:00 时对叶片进行喷施不同浓度茉莉酸甲酯，喷施浓度为 50、200、400 μmol/L，每浓度喷施 10 株连翘。用于转录组测序的材料为 200 μmol/L 喷施 12 h 后的连翘叶片和果实及其对照。拟南芥 WRKY 转录因子家族序列来源于 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>)。

2.2 连翘 WRKY 转录本的筛选与功能注释

从连翘转录组序列中筛选获得 62 条 WRKY 转录因子序列，通过结构域在线分析软件 SMART (<http://smart.embl.de/>) 对保守结构域进行分析，使用 ORF Finder 在线分析网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 分析预测转录因子的开放阅读框 (open reading frame, ORF)，获得连翘 WRKY 转录因子家族全长氨基酸序列。将从转录组数据中筛选到的连翘 WRKY 转录因子比对到基因本体 (gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库进行注释与分析。

2.3 连翘 WRKY 家族蛋白理化性质和蛋白基序分析鉴定

利用在线工具 Expasy ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析连翘 WRKY 蛋白的基本理化性质。利用 SOPMA 和 signalP 5.0 对蛋白质二级结构特征和蛋白信号肽进行预测。通过

CELLO 在线预测蛋白亚细胞定位。利用 The MEME Suite 5.4.1 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 在线分析连翘 WRKY 家族蛋白的基序，基序数量设置为 10，其余参数为默认值。

2.4 系统进化树的构建

从 TAIR 拟南芥数据库中下载完整的拟南芥 WRKY 转录因子氨基酸序列。利用 MEGA7.0 软件构建连翘与拟南芥 WRKY 转录因子蛋白序列进化树，利用 Clustal W 进行多序列比对分析，采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树，设置重复次数为 1000，其余参数选择默认值。

2.5 连翘苯丙烷合成途径相关 WRKY 转录因子功能分析

通过查阅文献获得与苯丙烷合成途径相关的 WRKY 转录因子基因序列，与连翘 WRKY 转录因子构建系统进化树，推测连翘 WRKY 转录因子的功能。利用 String 在线蛋白互作数据库对筛选出的连翘 WRKY 转录因子进行蛋白互作网络分析，物种参数选择拟南芥。

2.6 连翘苯丙烷合成途径相关 WRKY 转录因子的验证

使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (南京诺维赞生物科技股份有限公司) 对以上预测出的苯丙烷合成途径相关 WRKY 转录因子进行荧光定量 PCR 验证，分析连翘叶片、果实中 WRKY 转录因子的表达量随着茉莉酸甲脂喷施不同浓度 12 h 后的变化趋势。荧光定量反应程序：预变性 95 °C、30 s，变性 95 °C、10 s，退火 60 °C、30 s，40 个循环。反应体系 20 μL: 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL, 上、下游引物各 0.5 μL, cDNA 1 μL, 用 ddH₂O 补至 20 μL。所用引物见表 1。

3 结果与分析

3.1 连翘 WRKY 转录因子筛选

从本实验室连翘转录组序列中筛选出 62 条 WRKY 转录因子序列，通过 ORF 预测全长氨基酸及 SMART 分析序列保守结构域结果见图 1，发现 ORF 长度为 321~2304 bp，10 条不具有完整的 WRKY 结构域的序列，52 条具有完整 ORF 和完整 WRKY 结构域的序列。

3.2 连翘 WRKY 家族蛋白理化性质和结构分析

连翘 WRKY 家族蛋白理化性质见表 2，连翘 WRKY 蛋白的氨基酸数量为 105~728，相对分子

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers for qRT-PCR

基因 ID	引物序列 (5'-3')
TRINITY_DN14046_c0_g1	CCTGCCGTGACACTAACAT CACCTGCTCTGCCCATACT
TRINITY_DN25488_c0_g1	ATCCCGACAGAGTTCCACCG GGTTCATGCCCTCTGCCCTC
TRINITY_DN28667_c0_g1	TTTCAGGGCTCCAGATGTC GCTAAGCGTGTGGTAAAGG
TRINITY_DN3231_c0_g1	TGCTAGTCTACTGCCCAAGGAT CATAGATGAAGAAGTGGGTGGC
TRINITY_DN6456_c0_g2	CAAAGGTTCTCCTCACCCAAG GGATCATCCAAGCATTCTCA
UKN	CAGACCAGCTTGAGGAGTATC GGCCAGAAACCAGTAGTCAATA

质量介于 12 277.95~80 321.99。51.9% 的蛋白等电点小于 7.00，且亲水性系数均小于零，说明该家族蛋白大多数为酸性、亲水蛋白。同时，82.7% 的蛋白不稳定系数大于 40，该家族蛋白大多数为不稳定蛋白。蛋白质二级结构预测结果显示，连翘 WRKY 家族蛋白均有 α-螺旋、β-转角、无规则卷曲和延伸链，其中，无规则卷曲占 64.1%，是最主要的二级结构形式。信号肽和亚细胞定位预测结果表明 52 个连翘 WRKY 家族蛋白均不具有信号肽，且除 TRINITY_DN1857_c0_g1 (定位在叶绿体)、TRINITY_DN9153_c0_g2 (定位在叶绿体)、TRINITY_DN37721_c0_g1 (定位在细胞外间隙) 外，其它的均定位在细胞核中。

3.3 连翘 WRKY 转录因子保守结构域鉴定

利用在线软件 MEME 对连翘 WRKY 家族蛋白序列进行分析 (图 2)，发现 5 个蛋白序列具有 5 个 motif，52 个连翘 WRKY 蛋白均具有 WRKY 结构域 (motif 1、motif 3)，进一步证实其均为 WRKY 家族蛋白。

3.4 连翘 WRKY 转录因子的功能注释与分析

3.4.1 GO 数据库注释结果统计与分析 GO 数据库注释与分析结果表明，连翘 WRKY 转录因子中有 52 个注释到细胞组分 (cellular component, CC)，2 个注释到分子功能 (molecular function, MF)，1 个注释到生物过程 (biological process, BP)，见图 3。

3.4.2 KEGG 数据库注释结果统计与 KEGG 代谢通路分析 由图 4 可以看出有 6 条序列被注释到环境

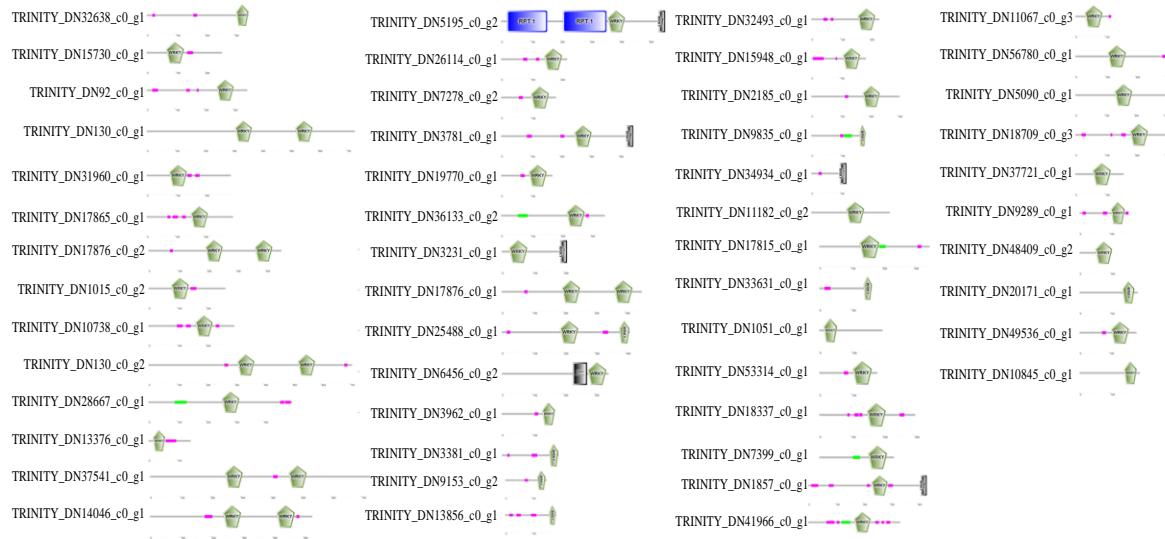


图1 连翘WRKY蛋白家族结构域预测

Fig. 1 Prediction of WRKY protein family domains in *F. suspensa*

表2 连翘WRKY蛋白理化性质分析

Table 2 Analysis of physical and chemical properties of WRKY protein from *F. suspensa*

Unigen	ORF 长度/bp	氨基酸数目	等电点	不稳定系数	脂肪系数	亲水平均系数	二级结构			
							α -螺旋/%	β -转角/%	无规则卷曲/%	
TRINITY_DN32638_c0_g1	1047	348	6.65	47.11	59.43	-0.969	28.45	1.44	60.34	9.77
TRINITY_DN15730_c0_g1	768	257	4.99	53.31	58.02	-0.605	12.06	3.11	73.93	10.89
TRINITY_DN92_c0_g1	1047	348	7.07	49.18	63.05	-0.480	5.75	2.87	75.86	15.52
TRINITY_DN130_c0_g1	2187	728	5.53	52.22	52.90	-0.794	10.99	2.88	75.69	10.44
TRINITY_DN31960_c0_g1	867	288	5.20	70.57	44.69	-1.091	21.18	2.78	65.97	10.07
TRINITY_DN17865_c0_g1	903	300	6.06	56.64	52.00	-0.964	20.00	1.33	71.00	7.67
TRINITY_DN5195_c0_g2	1662	553	6.11	63.08	65.37	-0.974	12.84	2.71	70.71	13.74
TRINITY_DN26114_c0_g1	669	222	8.99	56.02	52.30	-0.756	31.98	2.25	50.45	15.32
TRINITY_DN7278_c0_g2	549	182	8.68	38.77	47.64	-0.862	26.37	4.95	52.20	16.48
TRINITY_DN3781_c0_g1	1344	447	6.84	60.02	61.25	-0.615	10.51	2.01	76.73	10.74
TRINITY_DN19770_c0_g1	519	172	9.67	35.04	65.06	-0.819	25.00	6.40	51.74	16.86
TRINITY_DN36133_c1_g2	1062	347	6.14	54.49	69.71	-0.774	38.90	1.44	48.99	10.66
TRINITY_DN32493_c0_g1	699	232	8.20	46.54	51.21	-0.993	11.21	7.33	61.64	19.83
TRINITY_DN15948_c0_g1	570	189	8.23	50.80	55.71	-1.028	20.11	5.82	58.20	15.87
TRINITY_DN2185_c0_g1	1710	304	5.90	75.88	44.93	-1.043	7.57	2.63	81.58	8.22
TRINITY_DN9835_c0_g1	429	184	4.75	67.83	52.34	-1.092	29.35	1.63	59.78	9.24
TRINITY_DN34934_c0_g1	363	121	7.78	31.53	78.18	-0.889	44.63	5.79	40.50	9.09
TRINITY_DN1182_c0_g2	807	268	8.63	50.40	63.69	-0.747	31.72	3.36	54.48	10.45
TRINITY_DN17876_c0_g2	1149	453	6.59	56.50	61.06	-0.935	15.45	2.87	71.08	10.60
TRINITY_DN1015_c1_g2	777	265	5.44	60.70	52.72	-0.709	10.19	3.02	76.60	10.19
TRINITY_DN10738_c0_g1	894	297	7.68	69.70	44.31	-1.005	24.92	1.68	63.64	9.76
TRINITY_DN130_c0_g2	2121	706	5.82	54.56	58.16	-0.718	11.61	2.83	74.65	2.83
TRINITY_DN28667_c0_g1	1497	498	6.09	50.85	65.30	-0.589	30.32	2.61	57.23	9.84
TRINITY_DN13376_c0_g1	1173	146	9.30	47.02	72.19	-0.224	26.03	4.11	47.26	22.60
TRINITY_DN3231_c0_g1	2304	209	8.92	48.60	43.35	-1.362	8.13	4.78	75.60	11.48
TRINITY_DN17876_c0_g1	1149	397	6.00	60.42	65.04	-0.882	17.38	2.02	69.52	11.08
TRINITY_DN25488_c0_g1	1239	412	8.91	34.91	62.48	-0.845	13.11	2.67	72.33	11.89
TRINITY_DN6456_c0_g2	1038	345	9.19	56.78	64.70	-0.775	22.61	4.06	64.35	8.99
TRINITY_DN3962_c0_g1	576	171	9.25	54.67	68.95	-0.617	33.33	6.43	50.29	9.94
TRINITY_DN3381_c0_g1	417	185	9.89	69.11	62.70	-0.908	15.68	3.24	74.05	7.03
TRINITY_DN17815_c0_g1	1050	349	4.97	47.75	63.41	-0.697	20.06	4.01	67.91	8.02
TRINITY_DN33631_c0_g1	1128	164	9.14	66.93	63.54	-0.552	15.24	2.44	75.00	7.32
TRINITY_DN1051_c0_g1	582	193	4.69	52.92	67.15	-0.525	18.65	2.07	69.95	9.33
TRINITY_DN53314_c0_g1	537	179	9.54	44.36	55.98	-0.930	30.17	7.82	53.07	8.94
TRINITY_DN18337_c0_g1	906	301	5.73	58.12	56.38	-0.810	27.91	2.33	62.46	7.31
TRINITY_DN7399_c0_g1	690	233	7.67	61.55	42.66	-0.959	20.60	3.43	62.66	13.30
TRINITY_DN11067_c0_g3	369	122	9.38	33.51	41.39	-1.133	22.95	7.38	50.82	18.85

续表 2

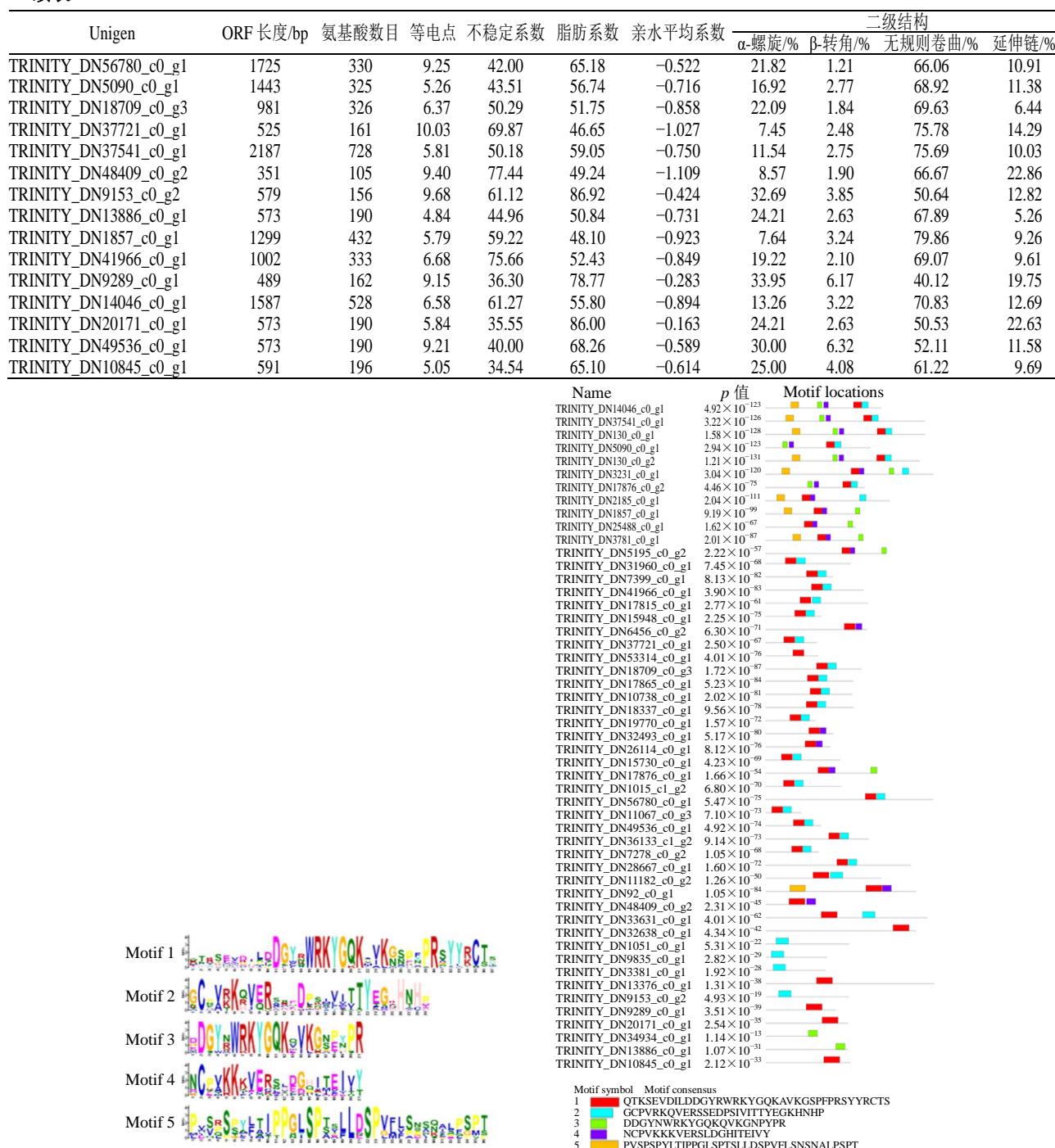


图 2 连翘 WRKY 蛋白家族保守基序和基因结构分析

Fig. 2 Analysis of conserved motifs and gene structure of WRKY protein family in *F. suspensa*

信息处理 (environmental information processing, EIP) 中的植物 MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway-plant) 中, 11 条序列被注释到 OS 中的植物-病原相互作用 (plant-pathogen interaction) 中。

3.5 连翘 WRKY 蛋白进化树分析

利用 MEGA 7.0 构建连翘和拟南芥 WRKY 蛋白

系统进化树, 结果如图 5 所示, 参考拟南芥 WRKY 分类依据, 将连翘 WRKY 家族分为 3 大类, 第 I 类包含 12 个连翘 WRKY 家族蛋白, 其中有 9 个蛋白具有 2 个 WRKY 结构域; 第 II 类包含 33 个连翘 WRKY 家族蛋白, 根据其锌指结构的不同进一步分为 IIb (5 个)、IIc (17 个)、IId (1 个)、IIe (10 个),

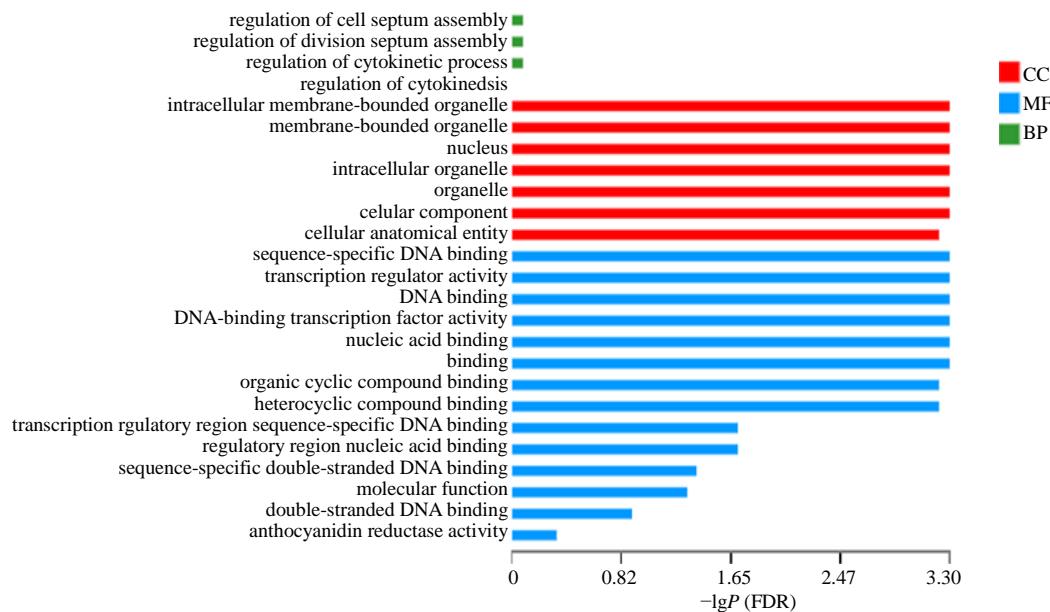


图3 连翘WRKY转录因子GO二级分类图

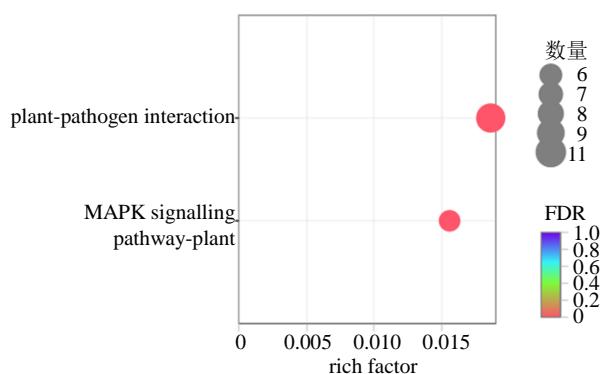
Fig. 3 Secondary classification diagram of WRKY transcription factor GO of *F. suspensa*

图4 连翘WRKY的KEGG代谢通路富集图

Fig. 4 Enrichment map of KEGG metabolic pathway in *F. suspensa* WRKY

连翘WRKY蛋白不具有IIa成员；第III类包含7个连翘WRKY家族蛋白，且皆与拟南芥对应类蛋白在同一分支。

3.6 连翘苯丙烷合成途径相关WRKY转录因子功能分析

基于NJ法构建系统进化树结果表明，连翘TRINITY_DN14046_c0_g1、TRINITY_DN3231_c0_g1、TRINITY_DN25488_c0_g1、TRINITY_DN28667_c0_g1、TRINITY_DN6456_c0_g2分别与Vv WRKY2、Mt WRKY 108715、Vv WRKY26、Mt WRKY 100630和Zo WRKY1聚为一支（图6），预测这些连翘WRKY蛋白也可能参与苯丙烷合成途径，继而调控连翘次生代谢物质的合成。

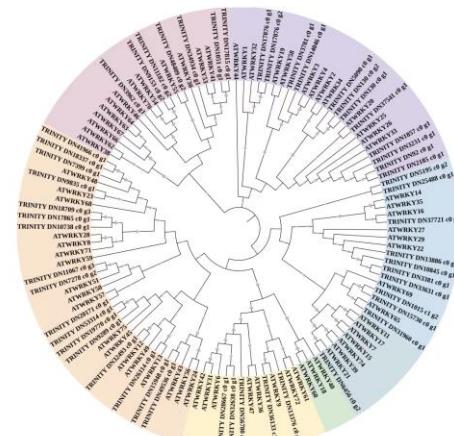


图5 连翘和拟南芥WRKY蛋白系统进化分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of WRKY proteins in *F. suspensa* and *A. thaliana*

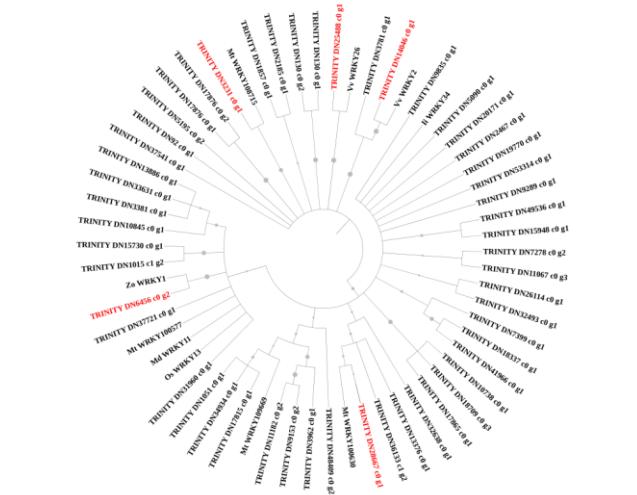


图6 连翘与其他参与苯丙烷途径WRKY转录因子家族系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of *F. suspensa* and other WRKY transcription factors involved in phenylpropane pathway

3.7 连翘WRKY蛋白互作分析

利用STRING在线数据库检索构建了筛选出的5个连翘WRKY转录因子互作蛋白网络(图7)。与其互作的蛋白有MPK3、MPK4、SIB1、SIB2、MKS1等,其中MPK3在丹参中被证实Sm MPK3(可能与At MPK3同源)通过MAPK级联调控Sm AREB1、Sm MYB36、Sm MYB39、Sm MYB111、Sm PAP1参与酚酸合成途径^[14]。因此推测筛选出的与MAPK3互作的3个连翘WRKY转录因子可能参与苯丙烷途径的连翘WRKY转录因子与MPK3相互作用来调控连翘中次生代谢物质的形成。

3.8 连翘苯丙烷合成途径相关WRKY转录因子的验证分析

为验证5个可能参与连翘苯丙烷合成途径相关的连翘WRKY转录因子,分析了不同浓度茉莉酸甲脂处理12 h后,5个连翘WRKY转录因子对不同浓度茉莉酸甲脂处理12 h后的相对表达量变化。结果见图8,连翘的5个WRKY转录因子在果实和叶片中均有表达,除TRINITY_DN3231_c0_g1外,其余4个转录因子在叶片中的表达量均高于果实。

在50、200、400 μmol/L茉莉酸甲脂处理12 h后,5个转录因子均表现出对不同浓度茉莉酸甲脂的响应,结果见图9,除TRINITY_DN14046_c0_g1在叶片中表现出随着激素浓度的升高,表达量也升

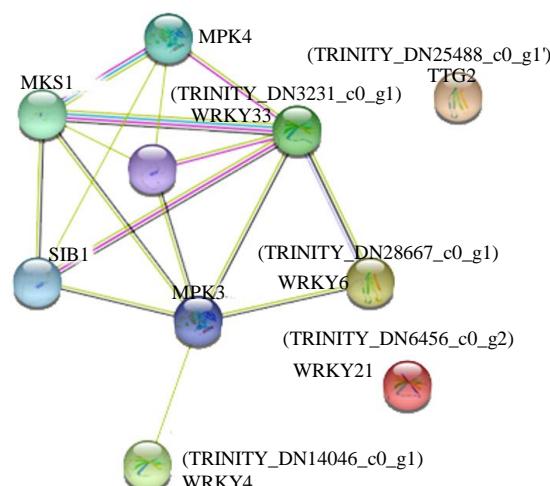
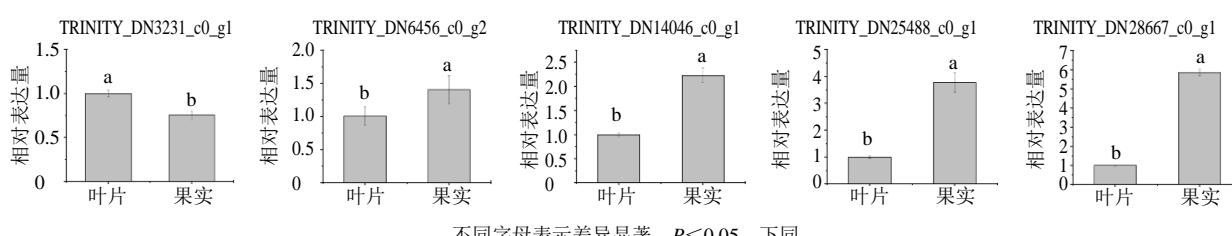


图7 连翘5个WRKY转录因子蛋白互作分析

Fig. 7 Protein interaction analysis of five WRKY transcription factors in *F. suspensa*

不同字母表示差异显著, $P < 0.05$, 下同

Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$, same as below

图8 5个连翘WRKY转录因子在叶片和果实中的相对表达量

Fig. 8 Relative expression of five WRKY transcription factors in leaves and fruits of *F. suspensa*

高外，其余均为低浓度促进，高浓度抑制，图 10 在果实中也呈现出不同程度的低浓度促进、高浓度抑制现象，且有研究表明，在外源激素处理后，参

与植物次生代谢的基因均对其有不同程度的响应。因此，进一步推测 5 个转录因子可能参与连翘苯丙烷合成途径。

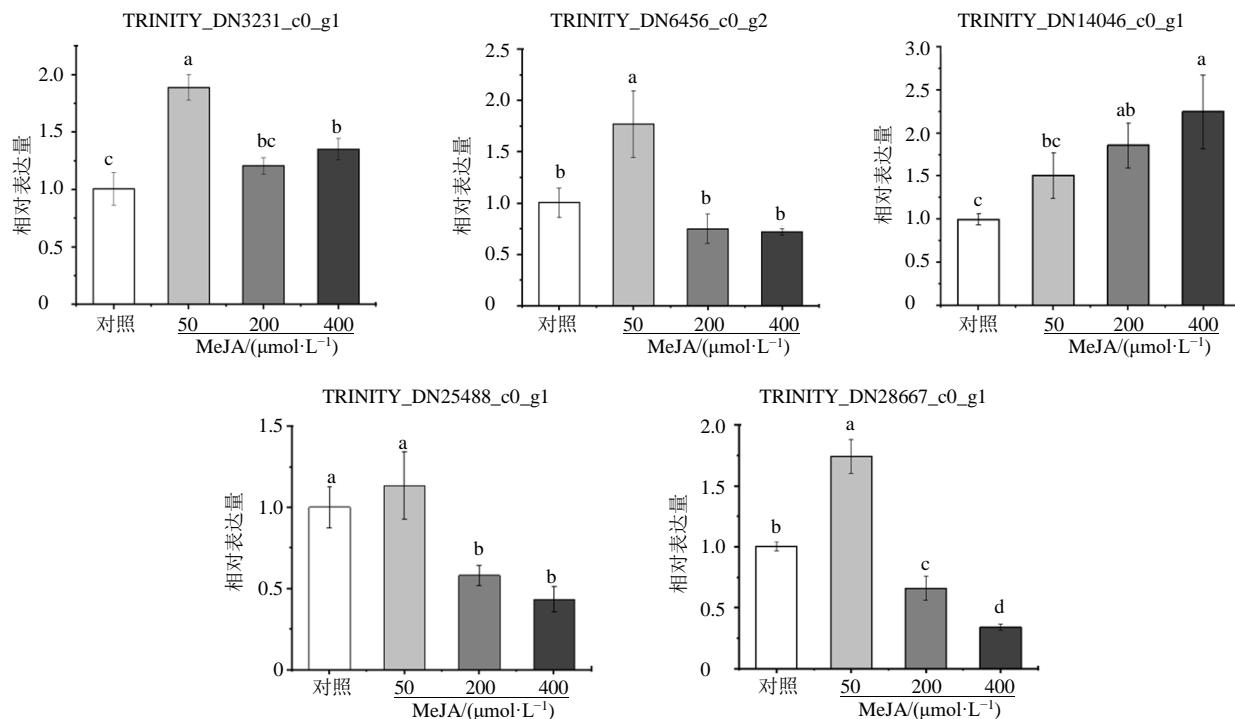


图 9 5 个连翘 WRKY 转录因子在不同浓度 MeJA 处理 12 h 后叶片中相对表达量

Fig. 9 Relative expression of five WRKY transcription factors in leaves of *F. suspensa* treated with MeJA at different concentrations for 12 h

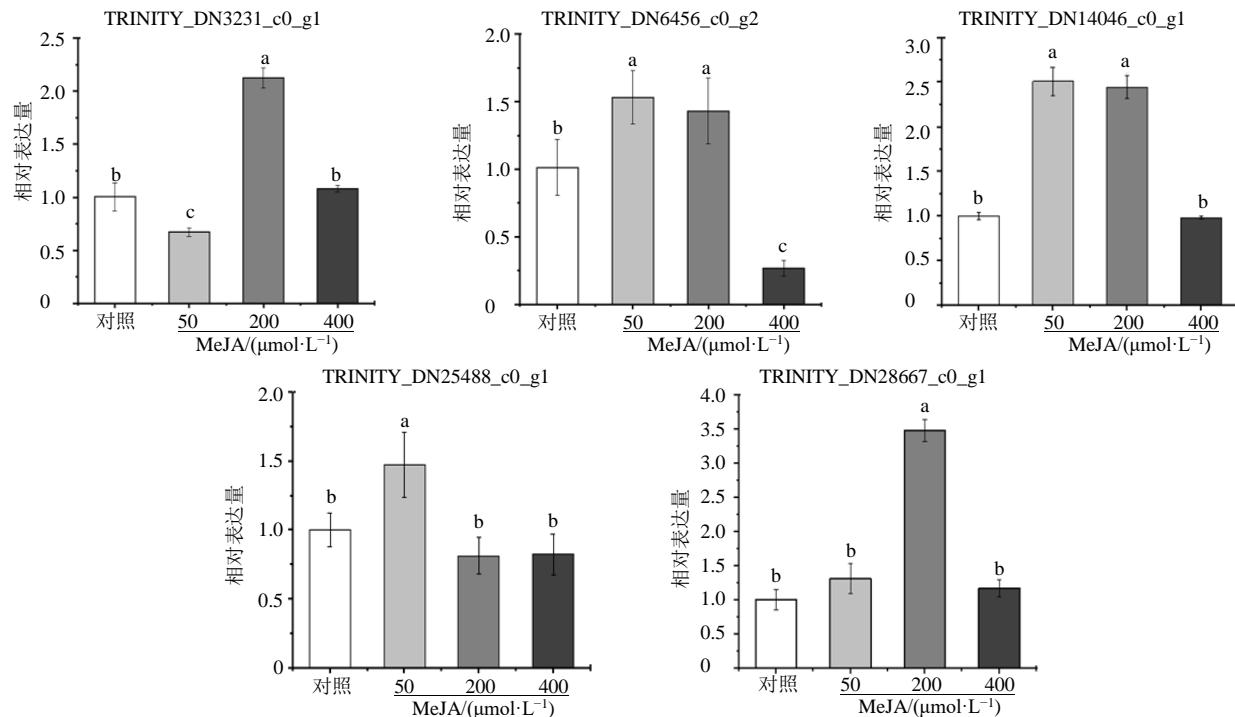


图 10 5 个连翘 WRKY 转录因子在不同浓度 MeJA 处理 12 h 后果实中相对表达量

Fig. 10 Relative expression of five WRKY transcription factors in fruit of *F. suspensa* treated with MeJA at different concentrations for 12 h

4 讨论

植物可以采用多种方法应对生物和非生物胁迫，其中许多防御机制是基于次生代谢物的产生^[15]。其中一些次生代谢物质还具有营养或药理活性（抗生素、抗癌、抗糖尿病等）^[16]。据估计，目前使用的治疗化合物中至少有30%来自药用植物的次生代谢物^[17]。越来越多的证据表明，WRKY 转铁蛋白调节植物的抗逆性和次生代谢的同时也可调节植物对非生物胁迫的响应，从而影响植物的生长发育^[18]。且有研究表明，通过调控植物转录因子，可以改变次生代谢物的含量^[19]。

MAPK 级联普遍存在于真核细胞中。这些级联反应涉及 4 种不同类型的激酶：MAPKs、MAPKKs、MAPKKKs 和 MAPKKKs^[20]。MAPK 级联对于植物的生长、发育以及防御生物胁迫和非生物胁迫都很重要^[21]。此外，MAPK 级联很可能参与次生代谢，包括骆驼蓬蛋白和吲哚硫代葡萄糖苷、尼古丁、花青素、植保素^[22]。同时，MAPK 级联调控 SA、JA、生长素（auxin, AUX）和乙烯^[23]等植物激素的生物合成和信号转导途径。Yang 等^[6]研究表明，连翘喷施不同浓度茉莉酸甲脂后，可对连翘中次生代谢物质产生不同程度的影响，即总黄酮含量随着 MeJA 浓度的升高而增长；木脂素类化合物连翘苷含量表现出低浓度抑制，高浓度增加；苯乙醇苷类化合物连翘脂苷 A 积累整体上呈现抑制作用。因此推测，MAPK 级联可能会对外源 MeJA 处理后连翘的次生代谢物合成途径产生影响。

连翘作为我国传统中药材，以果实入药，产生的化合物能够有效的治疗一些疾病。本研究基于该条件通过对连翘转录组筛选出 52 个 WRKY 转录因子，进行蛋白结构域分析，蛋白一、二级结构预测等一系列生物信息学分析，筛选出 5 个可能参与连翘苯丙烷合成途径的连翘 WRKY 转录因子，并通过 STRING 分析得到了 5 个转录因子可能被 MAPK 级联反应所调控，而具体蛋白互作情况仍不清楚，需后续实验验证其作用方式。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 吴孟华, 石上梅, 曹晖. 青翘与老翘优劣的本草探析 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(24): 5508-5512.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 26.
- [3] 齐丽娜, 陈炫好, 金华, 等. 中药连翘化学成分及药理活性研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(2): 168-175.
- [4] 段文娟, 耿岩玲, 祝贺, 等. 中药连翘化学成分和分析方法的研究进展 [J]. 山东科学, 2010, 23(2): 33-37.
- [5] VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. (Special Issue: Plant metabolism.) [J]. *Molecular Plant*, 2010, 3(1):2-20.
- [6] Yang L, Yang C Q, Li C Y, et al. Recent advances in biosynthesis of bioactive compounds in traditional Chinese medicinal plants [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 61(1): 3-17.
- [7] Mosongo I M. 茉莉酸甲脂诱导雷公藤愈伤组织中雷公藤红素合成的影响研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2019.
- [8] 陶娟, 宋小锋, 周圆圆. MeJA 对连翘叶片光合作用及次生代谢的影响 [J]. 河南农业科学, 2021, 50(6): 54-60.
- [9] 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]. *Mol Gen Genet*, 1994, 244(6): 563-571.
- [10] 唐建民, 齐力旺, 贺小婷, 等. 生姜 ZoWRKY1 基因的克隆及其与 6-姜酚生物合成的相关性分析 [J]. 湖南农业科学, 2020(10): 1-5.
- [11] Guillaumie S, Mzid R, Méchin V, et al. The grapevine transcription factor WRKY2 influences the lignin pathway and xylem development in tobacco [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 72(1/2): 215-234.
- [12] Amato A, Cavallini E, Zenoni S, et al. A grapevine TTG2-like WRKY transcription factor is involved in regulating vacuolar transport and flavonoid biosynthesis [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1979.
- [13] Naoumkina M A, He X Z, Dixon R A. Elicitor-induced transcription factors for metabolic reprogramming of secondary metabolism in *Medicago truncatula* [J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 132.
- [14] Xie Y F, Ding M L, Zhang B, et al. Genome-wide characterization and expression profiling of MAPK cascade genes in *Salvia miltiorrhiza* reveals the function of SmMAPK3 and SmMAPK1 in secondary metabolism [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 630.
- [15] Hidalgo W, Chandran J N, Menezes R C, et al. Phenylphenalenones protect banana plants from infection by *Mycosphaerella fijiensis* and are deactivated by metabolic conversion [J]. *Plant Cell Environ*, 2016, 39(3): 492-513.
- [16] Salam A M, Quave C L. Opportunities for plant natural products in infection control [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2018, 45: 189-194.

- [17] Thiericke R. Drug discovery from Nature: Automated high-quality sample preparation [J]. *J Autom Meth Manag Chem*, 2000, 22(5): 149-157.
- [18] Zhang Y, Butelli E, Alseekh S, et al. Multi-level engineering facilitates the production of phenylpropanoid compounds in tomato [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8635.
- [19] Yousfi F E, Makhloifi E, Marande W, et al. Comparative analysis of WRKY genes potentially involved in salt stress responses in *Triticum turgidum*. ssp. *durum* [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 2034.
- [20] Zhang M X, Chiang Y H, Toruño T Y, et al. The MAP4 kinase SIK₁ ensures robust extracellular ROS burst and antibacterial immunity in plants [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 24(3): 379-391.
- [21] Ding H D, He J, Wu Y, et al. The tomato mitogen-activated protein kinase SIMPK1 is as a negative regulator of the high-temperature stress response [J]. *Plant Physiol*, 2018, 177(2): 633-651.
- [22] Genot B, Lang J, Berri S, et al. Constitutively active *Arabidopsis* MAP kinase 3 triggers defense responses involving salicylic acid and SUMM2 resistance protein [J]. *Plant Physiol*, 2017, 174(2): 1238-1249.
- [23] Mine A, Berens M L, Nobori T, et al. Pathogen exploitation of an abscisic acid- and jasmonate-inducible MAPK phosphatase and its interception by *Arabidopsis* immunity [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 2017, 22: 236.

[责任编辑 时圣明]