

• 药材与资源 •

基于全长转录组的白蜡树 *WRKY* 基因家族的鉴定与密码子偏好性分析孙晓春¹, 李 爽¹, 刘雅君¹, 蔡兴航¹, 黄文静¹, 李会容^{2*}

1. 陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心, 秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育), 陕西咸阳 712083
2. 玉溪师范学院, 云南 玉溪 653100

摘要: **目的** 对白蜡树 *Fraxinus chinensis* *WRKY* 基因家族进行鉴定、生物信息学和密码子偏好性分析。**方法** 基于白蜡树全长转录组数据, 利用生物信息学方法对其 *WRKY* 基因家族进行鉴定, 并对其理化性质、系统发育、保守基序进行分析; 基于白蜡树叶片和枝皮的二代转录组数据, 对白蜡树 *WRKY* 基因家族的表达模式进行分析, 并采用实时荧光定量 PCR 方法进行验证; 利用 CodonW、EMBOSS 等程序对密码子偏好性进行分析, 并进行最优密码子分析、中性绘图、ENC-plot 和 PR2 偏倚分析。**结果** 共鉴定得到 49 个 *WRKY* 转录因子, 均为酸性、亲水蛋白, 编码氨基酸数目为 426~2 175, 相对分子质量 33 933.48~179 137.94, 理论等电点 4.91~5.27, 不稳定蛋白占比 65.31%, 预测均定位到细胞核; 系统进化表明 *FcWRKY* 基因家族成员归为 I (11 个)、II (30 个)、III (7 个) 大类以及 2 个特殊成员 (*FcWRKY23* 和 *FcWRKY37*), 其中第 II 类分为 IIa (5 个)、IIb (5 个)、IIc (8 个)、IId (7 个)、IIE (7 个) 5 个亚类; Motif 1 和 Motif 2 存在于所有的 *WRKY* 转录因子中, 是其保守序列; 二代转录组数据筛选到 16 个 *WRKY* 基因在叶片和枝皮中具有显著差异表达, 其中仅有 *FcWRKY11* 在枝皮中的表达量高于叶片。白蜡树 *FcWRKYs* 偏好使用以 A/U 结尾的密码子, 并且偏好性较弱; 确定了 3 个最优密码子, 分别是 CUU、AGG、和 UAU; 中性绘图分析和 ENC-plot 分析均表明自然选择是影响其密码子偏好性的主要因素, PR2 偏倚分析结果表明突变压力亦影响其密码子偏好性。**结论** 鉴定了白蜡树 *WRKY* 基因, 其中 8 个 *WRKY* 基因表达量与转录组学测序结果趋势一致, 为研究白蜡树 *WRKY* 的基因功能奠定基础。

关键词: 白蜡树; *WRKY* 转录因子; 生物信息学; 密码子偏好性分析; 全长转录组

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)07-2482-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.07.022

Identification and codon bias analysis of *WRKY* gene family based on full-length transcriptome sequencing in *Fraxinus chinensis*SUN Xiaochun¹, LI Shuang¹, LIU Yajun¹, CAI Xinghang¹, HUANG Wenjing¹, LI Huirong²

1. State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources, Co-construction Collaborative Innovation Center for Chineses Medicine Resources Industrialization by Shaanxi & Education Ministry, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China
2. Yuxi Normal University, Yuxi 653100, China

Abstract: Objective The aim of this study was to perform identification and bioinformatics and codon preference analysis of *WRKY* gene family of *Fraxinus chinensis*. **Methods** Based on the full-length transcriptome data of *F. chinensis*, the *WRKY* gene family was identified using bioinformatics methods and their physicochemical properties, phylogeny, conservative motifs were analyzed. Based on the second generation transcriptome data, expression patterns of *WRKY* gene family were analyzed and verified by real time fluorescence quantitative PCR. The codon bias was analyzed by CodonW and EMBOSS program, the optimal codon analysis, neutral plotting, ENC plot and PR2 bias analysis were also performed. **Results** A total of 49 *WRKY* genes were identified, all of them were acidic and hydrophilic proteins with an amino acid sequence varying from 426 to 2 175, molecular weight between 33 933.48

收稿日期: 2024-11-05

基金项目: 陕西中医药大学秦药特色资源研究开发重点实验室开放课题(KF202326); 陕西省教育厅青年创新团队建设科研计划项目(21JP031); 陕西高校青年创新团队资助项目(陕教[2019]90号); 陕西中医药大学校级科研课题(2023GP32); 云南省科技厅基础研究专项资助项目(202101AU070005)

作者简介: 孙晓春(1985—), 女, 博士, 副教授, 主要从事药用植物生理与分子生物学研究。E-mail: sunxiaochun08@163.com

***通信作者:** 李会容, 副教授, 主要从事分子生物学研究。E-mail: 10942@yxnu.edu.cn

and 179 137.94, an isoelectric point between 4.91 and 5.27, unstable proteins accounted for 65.31%, and all of them were located in the nucleus. The phylogenetic tree showed that *FcWRKY* genes were assigned to I (11), II (30), III (7) three categories and two special members (*FcWRKY23* and *FcWRKY37*), the second category was divided into five subclass, including IIa (5), IIb (5), IIc (8), IId (7) and IIe (7); Conserved motif analysis showed that Motif 1 and Motif 2 were found in all WRKY transcriptional factors. A total of 16 significant differential expression *WRKY* genes in leaves and bark were identified, of which only *FcWRKY11* was high expressed in bark than in leaves. The results of codon bias analysis showed that the *FcWRKY*s preferred to use codons ending in A/U weak codon usage. The optimal codons were identified, which were CUU, AGG and UAU; The results of neutrality plot analysis and ENC plot analysis indicated that natural selection was the main factor affecting its codon bias, PR2 bias analysis indicated that mutation pressure also had impact on codon preference. **Conclusion** It laid a theoretical foundation for the study of *WRKY* gene function in *F. chinensis*.

Key words: *Fraxinus chinensis* Roxb.; WRKY transcription factor; bioinformatics; codon bias analysis; full-length transcriptome

秦皮为多基原品种,是木犀科植物苦枥白蜡树 *Fraxinus rhynchophylla* Hance、白蜡树 *F. chinensis* Roxb.、尖叶白蜡树 *F. szaboana* Lingelsh.或宿柱白蜡树 *F. stylosa* Lingelsh.的干燥枝皮或干皮^[1]。其主要成分为秦皮甲素、秦皮乙素等香豆素类物质^[2],具有抗菌抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理作用^[3]。目前对白蜡树的相关研究主要在其有效成分分析^[2]及药理活性^[3]研究,由于白蜡树基因组信息尚未公布,其分子生物学相关方面的研究较少。

前期已利用 PacBio SequelII 测序平台对白蜡树叶片和枝皮混合样品进行了全长转录组测序,以获得的全长转录本为参考,通过 Illumina HiSeqTM 4 000 测序平台对白蜡树叶片和枝皮进行了转录组测序^[4],结果预测 3 947 个 Isoforms 归属于 54 类转录因子,其中 WRKY 转录因子数目最大(341 个 Isoforms)。WRKY 转录因子是植物特有的一类转录因子,其 N 端含有一段由 60 个氨基酸组成的 WRKYGQK 保守结构域,C 端为锌指结构。根据保守结构域的数量和锌指结构的类型,将 WRKY 转录因子分为 3 类,其中 I 类 WRKY 转录因子含有 2 个 WRKY 结构域和 C2H2 型锌指结构;II 类含有 1 个 WRKY 结构域和 C2H2 型锌指结构;III 类含有 1 个 WRKY 结构域和 C2HC 型锌指结构^[5-6]。

WRKY 转录因子家族在植物生长发育^[7-8]、次生代谢产物合成^[9]、生物和非生物胁迫响应^[10-11]等过程发挥着重要的作用。过量表达 *AtWRKY50* 转基因拟南芥转基因植株中芥子酸和 1-*O*-芥子酰基- β -D-葡萄糖的含量显著高于野生型^[12];云木香中 *SIWRKY2* 与二磷酸甲戊酸脱羧酶基因(*SIDPD*)相互作用,从而正向调控木脂内酯的生物合成^[13];贯叶连翘 *HpWRKY85* 过量表达转基因拟南芥植株的抗干旱胁迫能力提高^[14]。目前,桔梗^[15]、板蓝根^[16]、胡杨^[17]等植物的 *WRKY* 家族基因均被鉴定,从胡杨基因组中共鉴定到

107 个 *PeWRKY* 基因;板蓝根基因组中共鉴定到 64 个 *WRKY* 基因,其中 I 类 13 个,II 类 35 个,III 类 16 个,并且对 *WRKY* 基因的组织特异性表达模式及非生物胁迫下的表达模式进行了分析。

密码子偏好性是指同义密码子不均衡的使用现象,影响因素为物种在进化过程中的突变压力和自然选择压力^[18]。对密码子偏好性进行研究,有助于理解生物体的环境适应性和分子进化过程^[19]。目前白蜡树 *WRKY* 基因家族的相关研究未见报道。本研究基于前期全长转录组测序基础,对其 *WRKY* 基因家族进行鉴定,并进行生物信息学分析,对 *WRKY* 基因的组织差异表达模式进行分析,同时对白蜡树 *WRKY* 基因家族密码子偏好性进行分析,为从分子水平上研究白蜡树 *WRKY* 基因家族在生长发育中的功能奠定基础。

1 材料与仪器

所用材料白蜡树叶片和枝皮采自陕西中医药大学药用植物园,经陕西中医药大学李铂副教授鉴定为白蜡树 *F. chinensis* Roxb.。qTOWER2.0 实时荧光定量 PCR 仪(qRT-PCR)(耶拿公司,德国);NanoDrop OneC 超微量核酸蛋白浓度检测仪(美国赛默飞公司,美国);XRS+化学发光系统(伯乐有限公司)。

2 方法

2.1 白蜡树 *WRKY* 基因家族成员筛选

基于前期白蜡树全长转录组测序结果^[4],根据转录本注释结果,初步获得白蜡树 *WRKY* 基因家族信息。逐条进行 NCBI-tBlastx 序列相似度比对,参数为默认,确认为 WRKY 家族^[18]。利用 Batch CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对 WRKY 家族蛋白的保守结构域进行验证,剔除重复及不完整序列,获得白蜡树 *WRKY* 基因家族^[19]。

2.2 白蜡树 *WRKY* 基因家族理化性质分析

利用在线网站 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对白蜡树 *WRKY* 基因家族氨基酸数目、相对分子质量、理论等电点、亲水性平均系数和不稳定系数进行预测^[20-22]，利用在线网站 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 预测白蜡树 *WRKY* 基因家族的二级结构，利用 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 对白蜡树 *WRKY* 基因家族成员进行亚细胞定位预测。

2.3 白蜡树 *WRKY* 基因家族系统进化分析

利用 MEGA X 软件对白蜡树 *WRKY* 基因家族成员进行序列比对。拟南芥 *WRKY* 家族成员序列下载于数据库 <https://www.arabidopsis.org/browse/genefamily/WRKY.jsp>。通过 MEGA X 软件对拟南芥和白蜡树 *WRKY* 基因家族成员蛋白质序列进行 ClustalW 比对，使用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建进化树，自举重复 1 000 次。

2.4 白蜡树 *WRKY* 基因家族保守基序分析

利用在线工具 MEME (<http://meme-suite.org/>)

tools/meme) 对白蜡树 *WRKY* 基因家族成员进行保守基序 Motif 预测，Motif 最大值设定为 10。

2.5 *WRKY* 基因家族转录本表达量分析及实时荧光定量 PCR 验证

基于前期对白蜡树叶片 (L) 和枝皮 (B) 转录组测序结果^[4]，根据 L 和 B 组的平均 FPKM 值，通过联川生物云平台高级热图在线工具 (<https://www.omicstudio.cn/tool/4>) 进行热图绘制。根据转录组测序结果，筛选 FDR<0.05 且 $|\log_2FC|>1$ 的基因为显著差异基因，并对其中 8 个 *WRKY* 基因进行 qRT-PCR 验证。白蜡树叶片、枝皮采自陕西中医药大学药用植物园 3 株白蜡树，采用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (DP441，北京天根生化科技有限公司) 提取白蜡树叶片、枝皮总 RNA，采用 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒 (KR116，北京天根生化科技有限公司) 进行 RNA 反转录。以 cDNA 为模板，*Actin* 基因作为内参基因，采用 qRT-PCR 法检测 *WRKY* 基因表达量。基因相对表达量的计算方法采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。引物采用 Primer premier 5.0 设计，由擎科生物合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息

Table 1 Information of primer sequences

基因名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>FcWRKY6</i>	GGGATCTACTAGCCCAAGAAGC	CAAACCTCTCACTCGCTCACTCC
<i>FcWRKY9</i>	TATGAAGGAACCCACAATCATCC	ATTGAGCCGGAAAGGAGCAT
<i>FcWRKY11</i>	ACAGTTGAGAACGCTTTAACCG	CTCTCCAATAGCAGCACCCGAA
<i>FcWRKY23</i>	CAGCCAAAAACAAGTGGAAG	GGTTCACCTGAGCTCTTGATTTTG
<i>FcWRKY25</i>	AACAAGATATTAAGCAACGCTGTC	CTTTTGGGTCTCGACTCGGA
<i>FcWRKY34</i>	TCTTTAGGCTTCATGGACATGTTG	AAGAGGCTGTGGCTGTGACTGTA
<i>FcWRKY46</i>	GAGGAGGAGCCACTGTTGCC	CTCACCCGCTTTAGTTCCTCAAT
<i>FcWRKY48</i>	TGCTTTTCAGACAAGAAGTCAGGT	CTTGATGTGTGCAACGATAATAGCT
<i>Actin</i>	GTGCTTCTAACTGAAGCGCCA	TAGAGAAAGAACAGCCTGGATAGC

2.6 白蜡树 *WRKY* 基因家族密码子分析

白蜡树 *WRKY* 基因家族密码子组成分析利用 codonW 软件进行^[23]，主要包括同义密码子相对使用度 (relative synonymous codon usage value, RSCU)、有效密码子数 (effective number of codons, ENC)，通过 EMBOSS (<https://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer/>) 的 cusp 对 G+C 含量进行分析，主要包括第 1~3 位碱基的 G+C 含量 (GC₁、GC₂ 和 GC₃)，第 1 和第 2 位碱基 G+C 含量 (GC₁₂)；根据 ENC 值对 *WRKY* 基因家族序列进行排序，从两端各选 5% 的基因建立高低偏性库，计算 $\Delta RSCU$ 值， $\Delta RSCU>0.08$ 的密码子为高表达密码子，各氨

基酸中具有最高 RSCU 值的 20 个密码子为高频密码子，同时是高频和高表达的密码子确定为最优密码子^[24]；ENC 和 GC₃ 的函数关系利用 ENC-plot 进行分析，GC₁₂ 和 GC₃ 的函数关系^[24]利用中性分析进行，通过 PR2 偏倚分析密码子在第 3 位碱基上的选择是否存在偏好性^[25]。

3 结果与分析

3.1 白蜡树 *WRKY* 基因家族成员的筛选与鉴定

基于白蜡树叶片、枝皮混合样品全长转录组测序结果，经数据库比对、去冗余及不完整序列，获得 49 个白蜡树 *WRKY* 基因家族成员，依次命名为 *FcWRKY1*~*FcWRKY49*。

3.2 白蜡树 *WRKYs* 基因家族蛋白序列理化性质分析

白蜡树 *WRKYs* 基因家族蛋白序列理化性质分析结果如表 2 所示, 白蜡树 49 个 *WRKY* 转录因子

编码氨基酸数目为 426~2 175, 相对分子质量 33 933.48~179 137.94; 理论等电点 4.91~5.27, 均为酸性蛋白; 亲水性平均系数 0.75~0.948, 均为亲水蛋白; 不稳定系数 29.58~51.93, 其中 17 个属

表 2 白蜡树 *WRKY* 基因家族信息

Table 2 *WRKY* gene family information of *F. chinensis*

基因名称	氨基酸数	相对分子质量	理论等电点	亲水性平均系数 (GRAVY)	不稳定系数 α	螺旋/% β	转角/%	延长链/%	无规则卷曲/%	亚细胞定位
<i>FcWRKY1</i>	1 905	156 066	4.96	0.863	43.35	16.54	2.68	13.54	67.24	细胞核
<i>FcWRKY2</i>	2 175	179 138	4.91	0.817	39.86	12.00	3.03	9.93	75.03	细胞核
<i>FcWRKY3</i>	1 026	84 841	5.09	0.789	44.36	19.01	3.22	9.36	68.42	细胞核
<i>FcWRKY4</i>	930	75 755	5.10	0.912	48.94	30.32	2.58	11.29	55.81	细胞核
<i>FcWRKY5</i>	1 548	127 249	4.98	0.851	44.66	10.08	2.71	13.57	73.64	细胞核
<i>FcWRKY6</i>	948	77 939	5.12	0.804	38.36	29.75	1.90	12.34	56.01	细胞核
<i>FcWRKY7</i>	975	80 395	5.08	0.872	47.45	23.69	1.85	5.85	68.62	细胞核
<i>FcWRKY8</i>	1 665	138 207	4.99	0.792	41.46	12.98	2.86	12.98	71.18	细胞核
<i>FcWRKY9</i>	1 530	126 433	4.97	0.894	41.96	27.84	3.14	9.02	60.00	细胞核
<i>FcWRKY10</i>	1 590	132 418	4.95	0.948	49.63	28.49	3.02	9.25	59.25	细胞核
<i>FcWRKY11</i>	1 494	121 978	5.01	0.813	45.76	20.08	3.01	12.25	64.66	细胞核
<i>FcWRKY12</i>	1 734	143 489	4.97	0.789	35.37	7.61	2.77	14.71	74.91	细胞核
<i>FcWRKY13</i>	1 614	133 793	4.96	0.890	42.13	25.84	2.79	10.41	60.97	细胞核
<i>FcWRKY14</i>	966	79 769	5.10	0.782	43.56	20.81	2.80	9.01	67.39	细胞核
<i>FcWRKY15</i>	1 011	82 533	5.09	0.850	36.76	24.04	4.75	9.79	61.42	细胞核
<i>FcWRKY16</i>	1 611	134 423	4.96	0.923	51.59	27.37	2.61	8.75	61.27	细胞核
<i>FcWRKY17</i>	1 683	139 135	4.97	0.864	45.48	12.66	3.03	10.87	73.44	细胞核
<i>FcWRKY18</i>	1 380	112 590	5.03	0.868	39.51	14.35	3.91	11.52	70.22	细胞核
<i>FcWRKY19</i>	1 563	129 575	4.96	0.901	41.55	28.21	2.50	9.21	60.08	细胞核
<i>FcWRKY20</i>	1 035	85 080	5.08	0.804	36.10	22.90	4.64	8.99	63.48	细胞核
<i>FcWRKY21</i>	1 344	109 171	5.04	0.813	38.66	16.29	3.12	13.84	66.74	细胞核
<i>FcWRKY22</i>	1 395	114 283	5.00	0.799	43.35	10.54	3.44	13.12	72.90	细胞核
<i>FcWRKY23</i>	759	62 812	5.13	0.968	42.63	25.30	3.95	12.25	58.50	细胞核
<i>FcWRKY24</i>	1 476	122 441	5.00	0.840	47.75	10.57	2.24	9.96	77.24	细胞核
<i>FcWRKY25</i>	1 167	94 935	5.07	0.897	38.69	30.33	1.80	12.08	55.78	细胞核
<i>FcWRKY26</i>	1 248	103 859	5.01	0.890	42.04	31.73	4.09	11.78	52.40	细胞核
<i>FcWRKY27</i>	1 389	115 191	5.01	0.883	41.60	30.89	3.24	8.64	57.24	细胞核
<i>FcWRKY28</i>	1 053	86 977	5.07	0.855	44.30	16.72	4.18	8.96	70.15	细胞核
<i>FcWRKY29</i>	1 038	84 779	5.05	0.871	29.58	19.37	3.13	10.26	67.24	细胞核
<i>FcWRKY30</i>	1 089	90 193	5.08	0.750	40.84	19.65	3.18	7.51	69.65	细胞核
<i>FcWRKY31</i>	1 056	87 392	5.06	0.887	47.51	19.89	3.12	11.08	65.91	细胞核
<i>FcWRKY32</i>	1 023	84 220	5.05	0.790	44.15	19.65	4.40	10.56	65.40	细胞核
<i>FcWRKY33</i>	915	74 715	5.10	0.899	47.43	31.48	2.30	10.82	55.41	细胞核
<i>FcWRKY34</i>	1 002	82 631	5.07	0.857	42.38	23.65	2.69	9.58	64.07	细胞核
<i>FcWRKY35</i>	1 005	82 484	5.06	0.819	39.32	21.49	3.88	8.06	66.57	细胞核
<i>FcWRKY36</i>	954	78 993	5.09	0.844	43.57	24.84	2.52	5.66	66.98	细胞核
<i>FcWRKY37</i>	858	70 165	5.10	0.852	34.03	17.83	2.80	10.49	68.88	细胞核
<i>FcWRKY38</i>	903	75 145	5.10	0.866	35.05	26.91	1.99	6.98	64.12	细胞核
<i>FcWRKY39</i>	876	71 135	5.11	0.782	35.56	11.64	2.40	7.19	78.77	细胞核
<i>FcWRKY40</i>	942	78 415	5.11	0.764	35.86	24.20	3.50	7.64	64.65	细胞核
<i>FcWRKY41</i>	948	78 274	5.08	0.888	49.15	20.89	4.11	8.54	66.46	细胞核
<i>FcWRKY42</i>	822	67 301	5.13	0.858	44.31	30.66	2.55	12.04	54.74	细胞核
<i>FcWRKY43</i>	966	79 831	5.09	0.864	51.93	20.85	2.72	9.37	67.07	细胞核
<i>FcWRKY44</i>	939	77 075	5.10	0.778	40.03	19.57	3.42	13.35	63.66	细胞核
<i>FcWRKY45</i>	930	76 006	5.09	0.930	46.62	26.20	0.96	6.07	66.77	细胞核
<i>FcWRKY46</i>	765	62 886	5.10	0.858	49.27	30.97	1.94	11.94	55.16	细胞核
<i>FcWRKY47</i>	795	64 901	5.16	0.851	30.41	30.57	3.02	12.45	53.96	细胞核
<i>FcWRKY48</i>	528	43 340	5.23	0.855	38.76	40.91	3.98	15.34	39.77	细胞核
<i>FcWRKY49</i>	426	33 933	5.27	0.789	35.41	14.79	6.34	17.61	61.27	细胞核

于稳定蛋白（不稳定系数 <40 ），32 个属于不稳定蛋白（不稳定系数 >40 ）；蛋白二级结构预测结果为 α 螺旋 7.61%~31.73%， β 转角 0.96%~6.34%，延长链 5.85%~17.61%，无规则卷曲 39.77%~78.77%；全部 WRKY 蛋白预测定位到细胞核。

3.3 白蜡树 WRKY 基因家族蛋白序列比对与系统进化树分析

利用 MEGA X 软件对白蜡树 WRKY 蛋白序列进行比对分析，结果（图 1）表明除 FcWRKY49 保守序列为变异序列 WRKYGKK，其他 48 个蛋白序列均含有 WRKYGQK 保守序列，其中 11 个 WRKY 转录因子含有 2 个 WRKYGQK 结构域和 1 个 C2H2 锌指结构，归为第 I 类；30 个 WRKY 转录因子含有 1 个 WRKY 结构域和 1 个 C2H2 锌指结构，归为第

II 类，根据序列差异结合拟南芥 WRKY 转录因子分类，将第 II 类进一步划分为 IIa~IIe 5 类，IIa 和 IIb 类均包含 5 个成员，IIc 类包含 8 个成员，IId 和 IIe 均包含 7 个成员；第 III 类包含 7 个成员，含有 1 个 WRKYGQK 结构域和 1 个 C2HC 锌指结构。而 FcWRKY23 和 FcWRKY37 与其他成员保守氨基酸序列存在较大差异，未归类到以上 3 个类别。将拟南芥 52 个 WRKY 转录因子与白蜡树 49 个 WRKY 转录因子进行系统进化树分析，结果如图 2 所示。IIc 和 I 属于同一分支，IIa 和 IIb 属于同一分支，FcWRKY37 和 IId 归属于同一分支，FcWRKY23 单独划为一支，与其他 WRKY 转录因子亲缘关系最远。

利用在线软件 WebLogo（<http://weblogo.threeplusone.com/>）创建序列标识图，结果如图 1 所

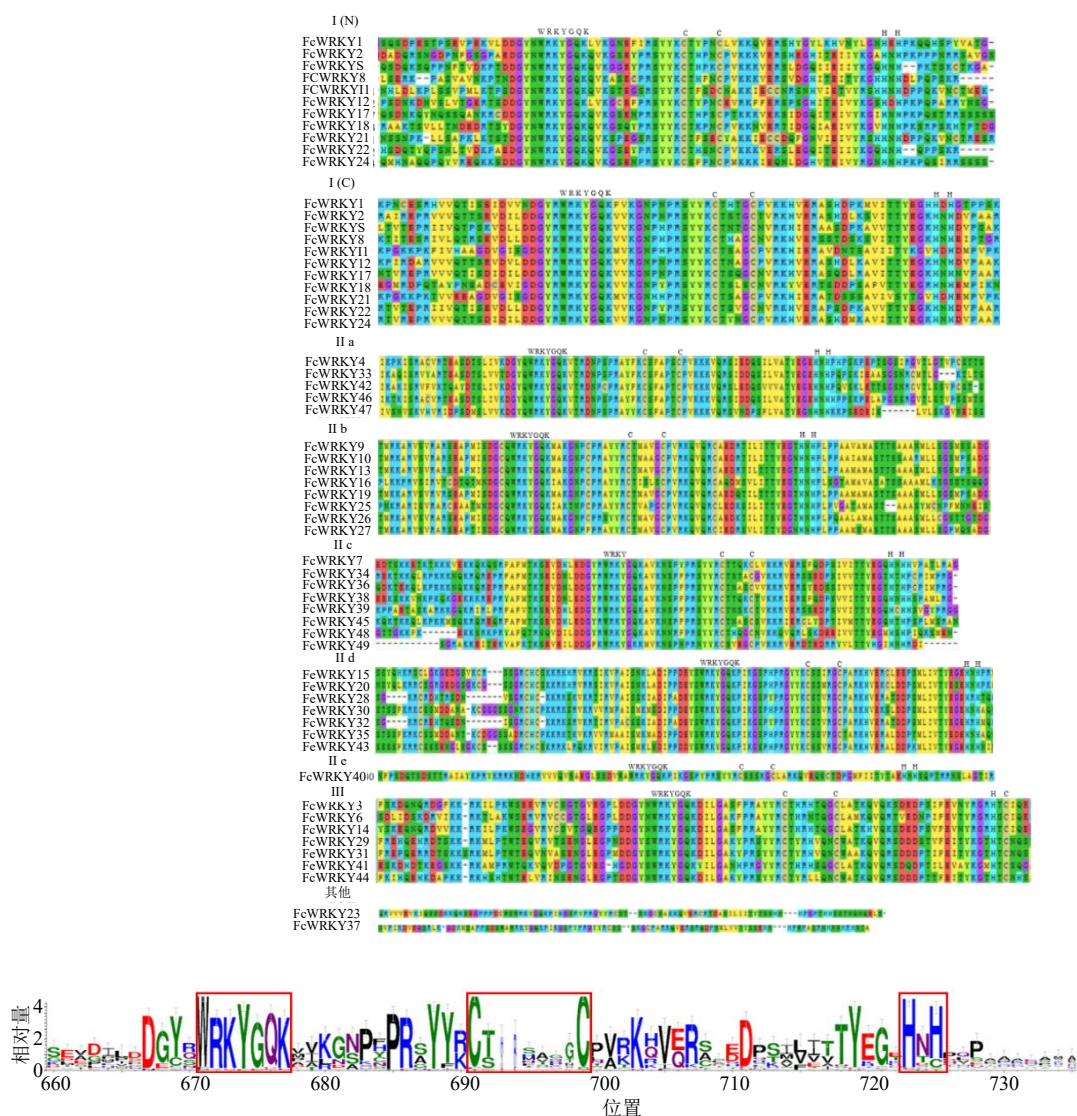


图 1 白蜡树 WRKY 基因家族序列比对结果与序列标识图

Fig. 1 Sequence alignment and sequence logo of WRKY gene family of *F. chinensis*

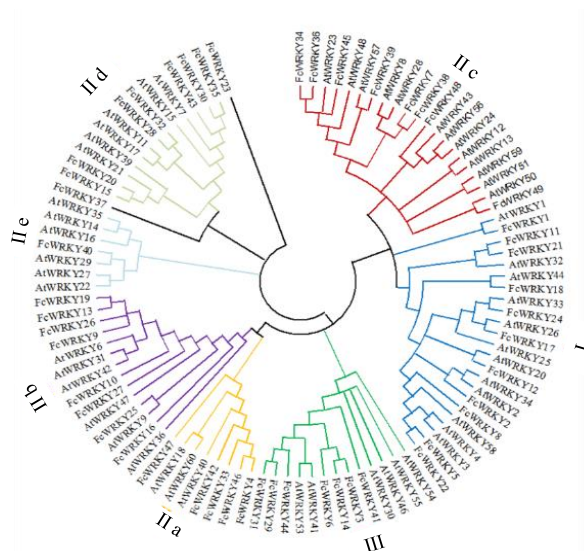


图 2 白蜡树与拟南芥 *WRKY* 基因家族系统进化树

Fig. 2 *WRKY* gene family phylogenetic tree of *F. chinensis* and *A. thaliana*

示。图中字母为氨基酸，字母大小高低表示序列保守程度，红色方框中字母较高较大，为其七肽保守序列 WRKYGQK 和锌指结构。

3.4 保守基序分析

利用在线软件 MEME 对白蜡树 *WRKY* 蛋白序列进行保守基序分析，不同 *WRKY* 转录因子所含的保守元件有所差异。所有的白蜡树 *WRKY* 转录因子均含有 Motif 1 和 Motif 2，表明这 2 个序列是其保守序列，其中 Motif 1 中含有七肽保守序列 WRKYGQK。FcWRKY23、FcWRKY37、FcWRKY40、FcWRKY49 仅含有 Motif 1 和 Motif 2 两个保守基序；6 个 *WRKY* 转录因子（FcWRKY9、FcWRKY19、FcWRKY13、FcWRKY10、FcWRKY26 和 FcWRKY27）含有 6 个 Motif，均属于 IIb 类转录因子；含有 5 个 Motif 的有 9 个转录因子；含有 4 个 Motif 的转录因子数为 12；含有 3 个 Motif 的转录因子数目最多，达到了 18 个，见图 3。

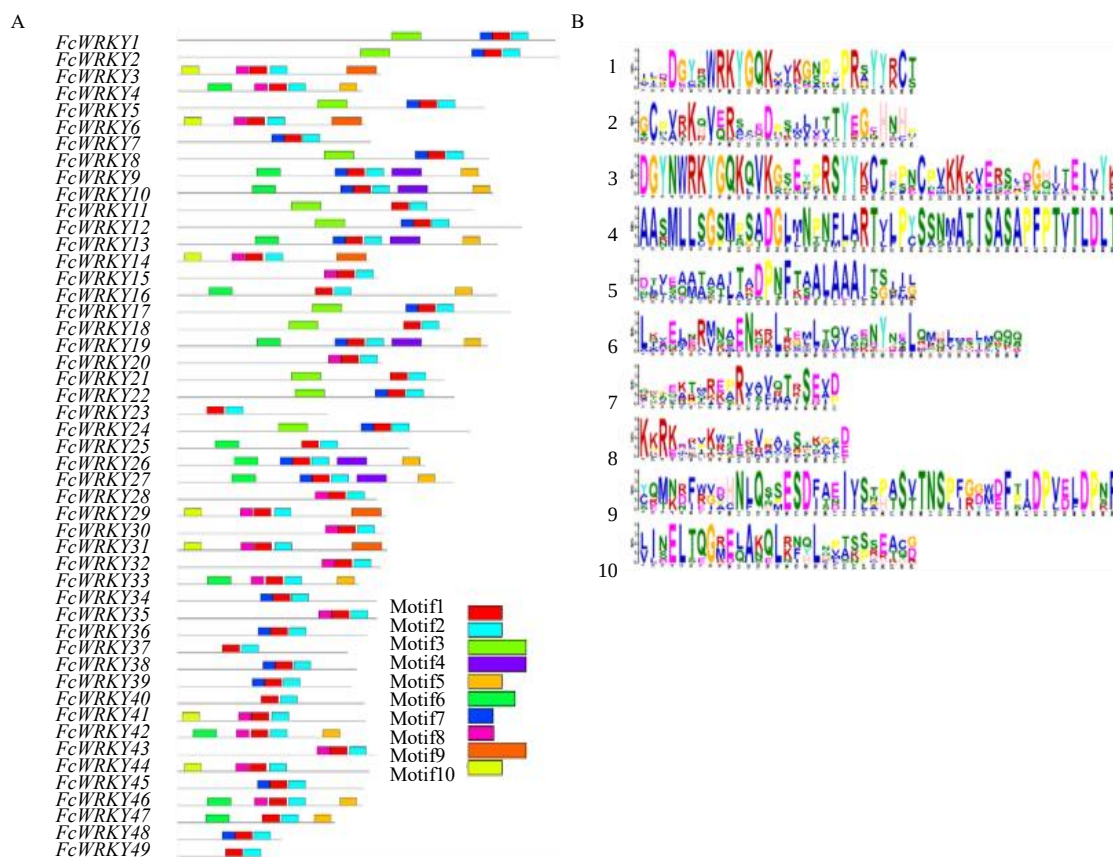
3.5 *WRKY* 基因家族转录本表达量分析及 qRT-PCR 验证

对转录组测序结果中叶片和枝皮中 *WRKY* 转录因子进行热图分析，结果如图 4-A 所示。其中显著差异基因有 16 个，分别是 *FcWRKY6*、*FcWRKY9*、*FcWRKY10*、*FcWRKY11*、*FcWRKY13*、*FcWRKY16*、*FcWRKY19*、*FcWRKY23*、*FcWRKY25*、*FcWRKY27*、*FcWRKY34*、*FcWRKY36*、*FcWRKY37*、*FcWRKY46*、*FcWRKY48*、*FcWRKY49*。其中 FcWRKY11 属于蛋白序列比对结果的第 I 类，FcWRKY46 属于第 IIa 类，

第 IIb 类包括 *FcWRKY9*、*FcWRKY13*、*FcWRKY19*、*FcWRKY25* 和 *FcWRKY27* 共 5 个显著差异基因，第 IIc 类包括 *FcWRKY34*、*FcWRKY36*、*FcWRKY48* 和 *FcWRKY49* 共 4 个显著差异基因，FcWRKY6 属于第 IIa 类，*FcWRKY23* 和 *FcWRKY37* 归为其它类别。对第 I、IIa、III 和其他类别中各选取 1 个显著差异基因，而对显著差异基因数目较多的 IIb 和 IIc 类中各选取 2 个基因进行 qRT-PCR 验证（图 4-B），其表达趋势与转录组结果一致，表明转录组测序结果可靠。由图 4-A 可知，除 FcWRKY11 外，其余 15 个显著差异的 *WRKY* 基因在叶片组中的表达量高于枝皮组，表明其可能与白蜡树叶片的生长发育有关。仅有 *FcWRKY11* 在枝皮中的表达量高于叶片，是叶片表达量的 8 倍，而白蜡树的干燥枝皮或干皮为其药用部位，主要成分为秦皮甲素和秦皮乙素等，*FcWRKY11* 在枝皮中的表达量显著高于叶片中的表达量，其与秦皮甲素和秦皮乙素的生物合成是否具有相关性，仍需进一步研究。

3.6 白蜡树 *WRKYs* 基因家族密码子分析结果

FcWRKYs 的总 GC 含量为 37.01%~50.79%，密码子第 3 位碱基上的 A、U、G、C 出现的平均频率分别为 38.18%、41.82%、25.39%和 22.30%，表明白蜡树 *FcWRKYs* 偏好使用以 A/U 结尾的密码子，ENC 值在 45.52~59.44，平均值为 53.24，表明密码子的偏好性较弱。密码子适用指数（codon adaptation index, CAI）、密码子偏好性指数（codon bias index, CBI）和最优密码子使用频



A-保守 Motif 分析; B-保守基序特征。

A-conserved Motifs; B-conserved motif signatures.

图 3 白蜡树 *WRKY* 基因家族保守基序分析

Fig. 3 Conserved motif analysis of *WRKY* gene family of *F. chinensis*

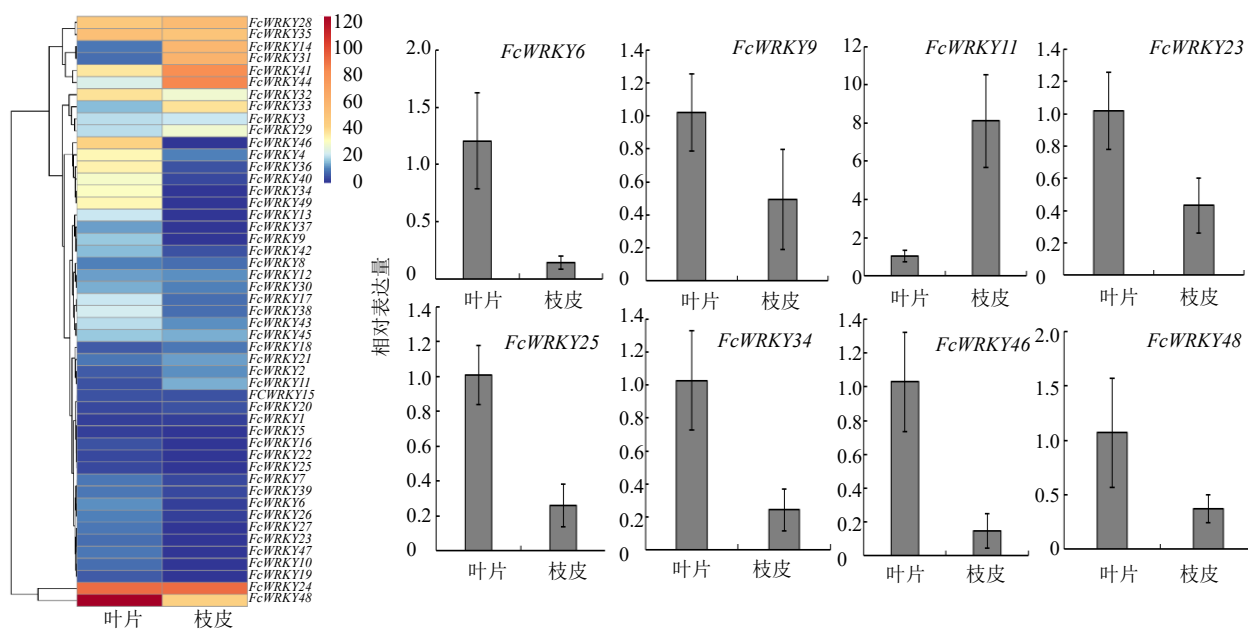


图 4 *FcWRKY* 基因表达量热图及 qRT-PCR 验证

Fig. 4 Expression heatmap of *FcWRKY* genes and qRT-PCR expression analysis

率 (frequency of optimal codons, FOP) 的平均值分别为 0.203 1、-0.079 和 -0.387 (表 3)。白蜡树 *FcWRKYs* 基因家族密码子 RSCU 分析结果如表 4 所示。20 个

高频密码子如表 4 所示, 高表达密码子有 29 个 (表 5), 既是高频密码子又是高表达密码子的确定为最优密码子, 分别是 CUU、AGG、和 UAU。

表 3 白蜡树 *FcWRKYs* 基因序列密码子组成及偏好性分析Table 3 Codon composition and codon bias analysis of *FcWRKYs* gene sequence of *F. chinensis*

基因名称	T3s	C3s	A3s	G3s	CAI	CBI	Fop	ENC	GC3s	GC	GC1	GC2	GC3	GC12
<i>FcWRKY1</i>	0.451	0.188 5	0.433	0.213 4	0.204	-0.06	0.389	49.8	0.306	0.416	0.525 9	0.401 9	0.32	0.464
<i>FcWRKY2</i>	0.440	0.219 0	0.338	0.248 1	0.191	-0.09	0.38	54.1	0.369	0.464	0.533 1	0.466 9	0.39	0.500
<i>FcWRKY3</i>	0.439	0.241 6	0.358	0.271 9	0.211	-0.07	0.393	53.0	0.381	0.415	0.446 1	0.399 4	0.40	0.423
<i>FcWRKY4</i>	0.393	0.225 4	0.426	0.222 7	0.191	-0.06	0.392	55.0	0.347	0.427	0.485 9	0.429 5	0.36	0.458
<i>FcWRKY5</i>	0.427	0.204 9	0.349	0.282 3	0.196	-0.04	0.406	54.6	0.378	0.463	0.537 7	0.454 5	0.39	0.496
<i>FcWRKY6</i>	0.427	0.207 5	0.470	0.215 0	0.184	-0.13	0.354	47.5	0.312	0.384	0.444 8	0.375 4	0.33	0.410
<i>FcWRKY7</i>	0.419	0.225 3	0.384	0.258 6	0.208	-0.10	0.383	52.5	0.370	0.434	0.490 8	0.423 3	0.39	0.457
<i>FcWRKY8</i>	0.454	0.172 3	0.333	0.302 9	0.210	-0.05	0.406	51.9	0.368	0.447	0.504 8	0.447 6	0.39	0.476
<i>FcWRKY9</i>	0.384	0.241 2	0.402	0.219 9	0.197	-0.06	0.395	54.3	0.366	0.451	0.501 9	0.457 4	0.39	0.480
<i>FcWRKY10</i>	0.369	0.294 2	0.395	0.185 8	0.191	-0.07	0.391	56.0	0.386	0.460	0.513 1	0.453 8	0.41	0.483
<i>FcWRKY11</i>	0.457	0.203 2	0.338	0.282 3	0.234	-0.02	0.415	55.1	0.374	0.439	0.517 0	0.412 8	0.39	0.465
<i>FcWRKY12</i>	0.463	0.203 4	0.339	0.239 8	0.198	-0.11	0.367	53.4	0.347	0.445	0.514 7	0.459 4	0.36	0.487
<i>FcWRKY13</i>	0.415	0.250 6	0.364	0.209 1	0.202	-0.07	0.388	53.7	0.367	0.455	0.508 3	0.465 7	0.39	0.487
<i>FcWRKY14</i>	0.433	0.236 2	0.377	0.252 3	0.228	-0.03	0.410	53.4	0.368	0.414	0.455 1	0.402 5	0.38	0.429
<i>FcWRKY15</i>	0.399	0.220 5	0.389	0.263 2	0.152	-0.15	0.339	55.4	0.373	0.427	0.460 2	0.433 6	0.39	0.447
<i>FcWRKY16</i>	0.422	0.229 7	0.408	0.205 2	0.204	-0.11	0.379	53.4	0.339	0.425	0.470 3	0.448 0	0.35	0.459
<i>FcWRKY17</i>	0.427	0.201 3	0.384	0.246 9	0.186	-0.12	0.374	53.0	0.348	0.436	0.455 5	0.487 5	0.36	0.472
<i>FcWRKY18</i>	0.438	0.191 8	0.442	0.211 7	0.208	-0.09	0.385	52.5	0.308	0.414	0.481 6	0.440 3	0.32	0.461
<i>FcWRKY19</i>	0.400	0.250 0	0.382	0.207 1	0.199	-0.06	0.392	54.8	0.365	0.458	0.519 4	0.462 1	0.39	0.491
<i>FcWRKY20</i>	0.454	0.206 6	0.34	0.285 7	0.167	-0.12	0.355	52.6	0.373	0.427	0.479 8	0.416 2	0.38	0.448
<i>FcWRKY21</i>	0.470	0.169 6	0.376	0.272 5	0.230	-0.06	0.404	54.4	0.338	0.425	0.498 9	0.420 9	0.35	0.460
<i>FcWRKY22</i>	0.424	0.209 5	0.296	0.321 8	0.199	-0.01	0.420	55.2	0.416	0.474	0.533 0	0.460 6	0.43	0.497
<i>FcWRKY23</i>	0.409	0.252 7	0.495	0.180 2	0.207	-0.10	0.376	49.3	0.318	0.394	0.464 6	0.378 0	0.34	0.421
<i>FcWRKY24</i>	0.469	0.226 8	0.361	0.222 2	0.216	-0.07	0.403	50.7	0.346	0.424	0.458 4	0.442 2	0.37	0.450
<i>FcWRKY25</i>	0.413	0.211 4	0.481	0.191 7	0.186	-0.12	0.362	53.4	0.303	0.407	0.500 0	0.394 9	0.33	0.447
<i>FcWRKY26</i>	0.385	0.259 3	0.377	0.220 4	0.190	-0.10	0.369	52.7	0.381	0.449	0.490 9	0.447 5	0.40	0.469
<i>FcWRKY27</i>	0.409	0.239 2	0.421	0.200 6	0.195	-0.17	0.339	56.8	0.342	0.425	0.476 3	0.426 7	0.37	0.452
<i>FcWRKY28</i>	0.359	0.245 4	0.223	0.410 6	0.226	-0.03	0.410	57.8	0.519	0.508	0.500 0	0.491 1	0.53	0.496
<i>FcWRKY29</i>	0.393	0.205 9	0.425	0.259 1	0.184	-0.12	0.361	52.8	0.355	0.431	0.491 5	0.420 5	0.38	0.456
<i>FcWRKY30</i>	0.315	0.258 4	0.315	0.368 6	0.167	-0.08	0.389	57.7	0.491	0.488	0.475 5	0.478 4	0.51	0.477
<i>FcWRKY31</i>	0.372	0.237 9	0.420	0.255 1	0.180	-0.12	0.362	54.0	0.377	0.430	0.470 3	0.413 6	0.40	0.442
<i>FcWRKY32</i>	0.348	0.250 9	0.231	0.424 0	0.222	-0.02	0.419	58.7	0.527	0.506	0.495 7	0.481 2	0.54	0.488
<i>FcWRKY33</i>	0.417	0.204 3	0.410	0.245 6	0.190	-0.13	0.357	53.4	0.347	0.420	0.472 3	0.426 7	0.36	0.450
<i>FcWRKY34</i>	0.448	0.210 1	0.354	0.266 7	0.199	-0.04	0.409	52.8	0.365	0.444	0.495 5	0.447 8	0.39	0.472
<i>FcWRKY35</i>	0.396	0.211 3	0.293	0.349 4	0.209	-0.02	0.415	59.4	0.440	0.48	0.500 0	0.482 1	0.46	0.491
<i>FcWRKY36</i>	0.422	0.227 8	0.398	0.256 8	0.222	-0.11	0.380	49.5	0.366	0.422	0.454 5	0.413 8	0.40	0.434
<i>FcWRKY37</i>	0.380	0.290 2	0.364	0.238 6	0.210	-0.05	0.408	55.0	0.412	0.462	0.481 0	0.456 7	0.44	0.469
<i>FcWRKY38</i>	0.493	0.227 1	0.369	0.246 2	0.250	-0.08	0.397	48.1	0.348	0.410	0.466 9	0.390 7	0.37	0.429
<i>FcWRKY39</i>	0.383	0.217 0	0.359	0.287 7	0.204	-0.06	0.404	57.6	0.397	0.479	0.546 1	0.481 2	0.41	0.514
<i>FcWRKY40</i>	0.537	0.207 3	0.387	0.168 2	0.250	-0.03	0.422	45.7	0.282	0.394	0.463 5	0.419 0	0.30	0.441
<i>FcWRKY41</i>	0.389	0.267 2	0.382	0.254 6	0.217	-0.06	0.405	56.0	0.398	0.439	0.482 6	0.410 1	0.42	0.446
<i>FcWRKY42</i>	0.409	0.220 7	0.393	0.245 3	0.204	-0.09	0.386	55.7	0.364	0.415	0.430 1	0.433 7	0.38	0.432
<i>FcWRKY43</i>	0.493	0.188 0	0.327	0.228 2	0.213	-0.03	0.411	49.6	0.327	0.418	0.439 8	0.463 9	0.35	0.452
<i>FcWRKY44</i>	0.407	0.194 0	0.443	0.288 3	0.195	-0.15	0.355	45.5	0.352	0.402	0.451 3	0.386 4	0.37	0.419
<i>FcWRKY45</i>	0.427	0.181 5	0.371	0.287 0	0.222	-0.04	0.405	53.6	0.363	0.435	0.485 8	0.432 2	0.38	0.459
<i>FcWRKY46</i>	0.364	0.227 3	0.425	0.246 8	0.173	-0.12	0.354	55.8	0.367	0.430	0.482 3	0.427 7	0.38	0.455
<i>FcWRKY47</i>	0.418	0.213 9	0.497	0.187 5	0.201	-0.13	0.354	47.4	0.299	0.370	0.422 1	0.368 8	0.32	0.395
<i>FcWRKY48</i>	0.485	0.166 7	0.450	0.214 9	0.216	-0.09	0.388	47.5	0.282	0.377	0.443 8	0.370 8	0.31	0.407
<i>FcWRKY49</i>	0.353	0.293 1	0.418	0.281 3	0.216	-0.04	0.414	56.9	0.421	0.427	0.466 7	0.373 3	0.43	0.420

表 4 白蜡树 *FcWRKYs* 同义密码子相对使用度 (RSCU) 分析

Table 4 Relative synonymous codon usage value (RSCU) of synonymous codons from *FcWRKYs* of *F. chinensis*

氨基酸	密码子	数量	RSCU 值	氨基酸	密码子	数量	RSCU 值
Phe	UUU	400	1.24	Asp	GAU*	730	1.49
	UUC	244	0.76		GAC	249	0.51
Leu	UUA	182	0.90	Glu	GAA	770	1.23
	UUG*	300	1.48		GAG	482	0.77
	CUU*	293	1.44	Pro	CCU*	419	1.31
	CUC	116	0.57		CCC	168	0.52
	CUA	147	0.72		CCA*	485	1.51
Ile	CUG	179	0.88		CCG	211	0.66
	AUU*	374	1.46	Thr	ACU*	388	1.33
	AUC	198	0.77		ACC	230	0.79
	AUA	195	0.76		ACA*	407	1.40
Met	AUG	466	1.00	Ala	ACG	138	0.47
Val	GUU*	383	1.53		GCU*	401	1.43
	GUC	174	0.69		GCC	231	0.83
	GUA	183	0.73		GCA*	375	1.34
	GUG	264	1.05		GCG	111	0.40
Tyr	UAU*	340	1.25	Cys	UGU	171	1.06
	UAC	204	0.75		UGC	151	0.94
His	CAU*	321	1.30	TER	UGA	17	1.04
	CAC	174	0.70		UAA*	26	1.59
Gln	CAA	624	1.18		UAG	6	0.37
	CAG	432	0.82	Gly	GGU	312	1.12
Asn	AAU*	728	1.26		GGC	196	0.70
	AAC	426	0.74		GGA*	393	1.41
Lys	AAA	649	1.07		GGG	216	0.77
	AAG	567	0.93	Trp	UGG	110	1.00
Ser	UCU*	608	1.60		AGA*	386	2.37
	UCC	259	0.68		AGG*	244	1.50
	UCA*	547	1.44		CGU	93	0.57
	UCG	224	0.59		CGC	50	0.31
	AGU	369	0.97		CGA	121	0.74
	AGC	280	0.73		CGG	85	0.52

*为高频密码子

*indicates high frequency codon

3.7 中性绘图、ENC-plot 分析和 PR2 偏倚分析结果

中性绘图分析结果如图 5 所示，GC₁、GC₂、GC₃ 和 GC 的平均含量分别为 48.34%、43.22%、39.00%和 43.44%。GC₁₂ 分布范围为 39.54%~51.36%。GC₁₂ 与 GC₃ 的相关系数为 0.491 1，回归系数为 0.265 7。白蜡树 *FcWRKYs* 中少部分基因沿对角线分布，大部分基因分布于对角线上方，表明

自然选择是影响 *FcWRKYs* 基因密码子偏好性的主要因素。

ENC-plot 分析结果如图 6 所示，少部分基因分布在标准曲线周围，其它大部分基因均位于标准曲线下方，表明自然选择是影响其密码子偏好性的主要因素，与中性绘图分析结果一致。

PR2 偏倚分析结果中（图 7），PR2 平面图中 4 个区域的散点分布不均匀，表明突变不是密码子偏

表 5 白蜡树 *FcWRKYs* 高、低表达基因密码子使用统计结果
Table 5 Statistics of codons in high and low expression genes of *FcWRKYs* in *F. chinensis*

氨基酸	密码子	高表达基因		低表达基因		Δ RSCU	氨基酸	密码子	高表达基因		低表达基因		Δ RSCU
		数量	RSCU	数量	RSCU				数量	RSCU	数量	RSCU	
Phe	UUU	21	1.14	30	1.33	-0.19	Ser	UCU	40	2.02	37	2.16	-0.14
	UUC*	16	0.86	15	0.67	0.19		UCC*	14	0.71	8	0.47	0.24
Leu	UUA	6	0.75	12	1.29	-0.54	Pro	UCA	23	1.16	23	1.34	-0.18
	UUG	13	1.63	16	1.71	-0.08		UCG*	20	1.01	9	0.52	0.49
	CUU*	10	1.25	9	0.96	0.29		CCU	21	1.06	15	1.22	-0.16
	CUC*	6	0.75	6	0.64	0.11		CCC	6	0.30	7	0.57	-0.27
	CUA*	5	0.63	5	0.54	0.09		CCA	26	1.32	24	1.96	-0.64
Ile	CUG*	8	1.00	8	0.86	0.14	Thr	CCG*	26	1.32	3	0.24	1.08
	AUU	18	1.29	23	1.57	-0.28		ACU	18	1.13	18	1.26	-0.13
	AUC*	18	1.29	12	0.82	0.47		ACC	12	0.75	11	0.77	-0.02
	AUA	6	0.43	9	0.61	-0.18		ACA	14	0.88	24	1.68	-0.80
Met	AUG	28	1.00	15	1.00	0	Ala	ACG*	20	1.25	4	0.28	0.97
Val	GUU	22	1.29	21	1.79	-0.50		GCU	20	1.13	15	1.46	-0.33
	GUC*	11	0.65	6	0.51	0.14		GCC*	11	0.62	4	0.39	0.23
	GUA	9	0.53	13	1.11	-0.58		GCA	18	1.01	21	2.05	-1.04
	GUG*	26	1.53	7	0.60	0.93		GCG*	22	1.24	1	0.10	1.14
Tyr	UAU*	17	1.31	16	0.97	0.34	Cys	UGU	8	0.67	13	1.30	-0.63
	UAC	9	0.69	17	1.03	-0.34		UGC*	16	1.33	7	0.70	0.63
TER	UAA	0	0	2	2.00	-2.00	Trp	UGA*	3	3.00	1	1.00	2.00
	UAG	0	0	0	0	0		UGG	3	1.00	7	1.00	0.00
His	CAU	19	1.41	19	1.46	-0.05	Arg	CGU*	10	0.91	4	0.60	0.31
	CAC	8	0.59	7	0.54	0.05		CGC*	5	0.45	2	0.30	0.15
Gln	CAA	23	1.02	27	1.17	-0.15		CGA	3	0.27	3	0.45	-0.18
	CAG*	22	0.98	19	0.83	0.15		CGG*	14	1.27	0	0.00	1.27
Asn	AAU	20	0.98	44	1.42	-0.44	Ser	AGU	11	0.55	12	0.70	-0.15
	AAC*	21	1.02	18	0.58	0.44		AGC	11	0.55	14	0.82	-0.27
Lys	AAA	25	0.71	26	0.88	-0.17	Arg	AGA	12	1.09	27	4.05	-2.96
	AAG*	45	1.29	33	1.12	0.17		AGG*	22	2.00	4	0.60	1.40
Asp	GAU	26	1.27	41	1.64	-0.37	Gly	GGU*	19	1.19	8	0.76	0.43
	GAC*	15	0.73	9	0.36	0.37		GGC*	14	0.88	3	0.29	0.59
Glu	GAA	17	0.67	54	1.50	-0.83		GGA	9	0.56	20	1.90	-1.34
	GAG*	34	1.33	18	0.50	0.83		GGG*	22	1.38	11	1.05	0.33

*为高表达密码子

*indicates high expression codon

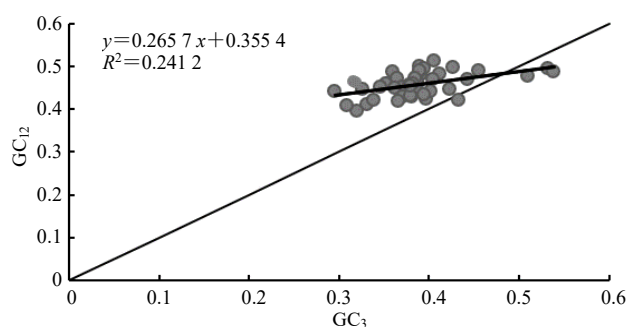


图 5 *FcWRKYs* 中性绘图分析
Fig. 5 Neutrality plot analysis of *FcWRKYs*

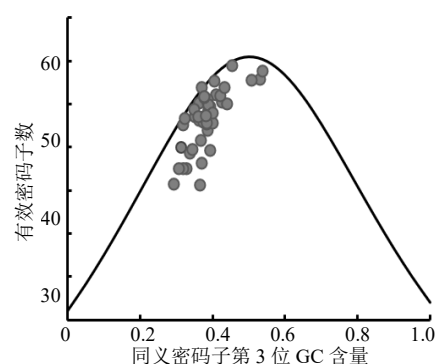


图 6 *FcWRKYs* ENC-plot 绘图分析
Fig. 6 ENC-plot analysis of *FcWRKYs*

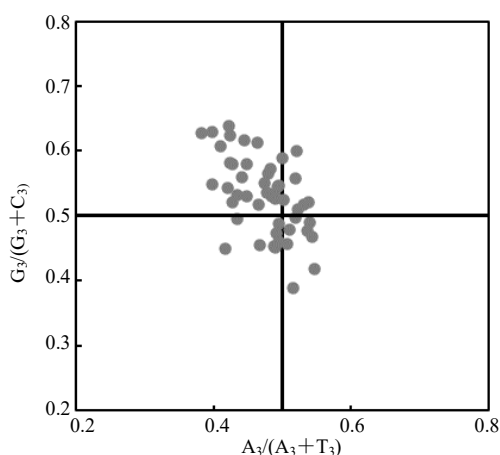


图 7 白蜡树 *FcWRKYs* PR2 偏倚分析

Fig. 7 PR2 bias analysis of *Fraxinus chinensis* *FcWRKYs*

好性的唯一影响因素。大部分基因位于左上方 ($G_3 > C_3$, $T_3 > A_3$)。表明 *FcWRKYs* 基因密码子偏好性除受到自然选择的影响, 也会受到碱基突变压力的影响。

4 讨论

由于白蜡树基因组序列尚未公布, 限制了其基因功能的研究。全长转录组测序技术能够直接获得高质量全长转录本, 可作为二代测序数据拼接的参考^[26]。在前期全长转录组测序基础上, 对白蜡树 *WRKY* 基因家族进行分析, 共鉴定到 49 个 *WRKY* 基因。根据结构特点, 将白蜡树 *WRKY* 基因家族分为 3 类, 其成员分别包含 11、30 和 7 个, 可见第 II 类成员数量最多, 占比 62.5%。第 I 大类中, 包含 12 个拟南芥 *WRKY* 转录因子, 其中 *AtWRKY1* 和 *FcWRKY1*, *AtWRKY32* 和 *FcWRKY11*、*FcWRKY11*, *AtWRKY33* 和 *FcWRKY24*, *AtWRKY26* 和 *FcWRKY17* 具有同源关系。IIb 类别中, *AtWRKY9* 和 *FcWRKY25* 具有同源关系。IIe 类别中, 仅包含 *FcWRKY40* 一个 *WRKY* 蛋白。*WRKY* 保守结构域的变异基序为 *WRKYGKK*, *WRKYGMK* 和 *WRKYGRK*, 在茶树^[27]*WRKY* 基因家族中有 *WRKYGKK* 和 *WRKYGRK* 2 种变异基序, 此外在秦艽^[20]和枣树^[28]的 *WRKY* 基因家族中均有变异序列。大豆 *GmWRKY6* 和 *GmWRKY21* 的核心序列突变为 *WRKYGKK*, 丧失与顺式作用元件 W-box 相结合的能力, 从而影响 *WRKY* 转录因子与靶基因的相互作用^[29]。白蜡树 *WRKY* 基因家族中 *FcWRKY49* 核心序列发生突变为 *WRKYGKK*, 推测其可能无法与 W-box 进行结合。

苯丙烷代谢是植物重要的次级代谢途径之一, 包含香豆素、木脂素、黄酮等多类代谢产物, 在植物的生长发育中具有重要功能^[30]。*WRKY* 转录因子在多种植物中可作为次级代谢产物生物合成的调节因子。丹参中 9 个 *SmWRKY* (*SmWRKY1*、*SmWRKY7*、*SmWRKY19*、*SmWRKY29*、*SmWRKY45*、*SmWRKY52*、*SmWRKY56*、*SmWRKY58* 和 *SmWRKY68*), 可能参与了丹参酮和酚酸的生物合成^[31], 这 9 个基因属于 *WRKY* 类型的第 II 类 (IIa、IIb、IIc 和 IIe) 与第 III 类; 拟南芥 *AtWRKY23* 转录因子通过刺激黄酮醇的局部生物合成从而促进根系正常生长和发育^[32]。东莨菪内酯和东莨菪苷属于香豆素类物质, 烟草阿魏酰-CoA 6'-羟化酶 1 (*NaF6'H1*) 是东莨菪内酯和东莨菪苷生物合成的关键酶^[33], 烟草 *NaWRKY70* 与 *NaF6'H1* 启动子中的 W box 相结合, 从而激活 *NaF6'H1* 基因的表达, 增加东莨菪内酯和东莨菪苷的合成量^[34]。前期课题组利用非靶向代谢组学技术对白蜡树枝皮和叶片差异代谢物进行了分析和鉴定, 利用联川生物云平台相关性网络图在线工具 (<https://www.omicstudio.cn/tool/64>) 将筛选得到的 16 个显著差异 *WRKY* 基因的 FPKM 值与代谢组学分析中的显著差异代谢物秦皮甲素和秦皮乙素进行相关性分析。结果共筛选到 8 个基因与秦皮甲素和秦皮乙素具有显著相关性, 其中 *FcWRKY36*、*FcWRKY10*、*FcWRKY9*、*FcWRKY6*、*FcWRKY13*、*FcWRKY37* 和 *FcWRKY48* 与秦皮甲素、秦皮乙素均呈负相关。*FcWRKY13* 与秦皮甲素负相关系数最大, 为 -0.997 29; 与秦皮乙素负相关系数最大的基因是 *FcWRKY9*, 相关系数为 -0.970 10。*FcWRKY11* 与秦皮甲素和秦皮乙素均呈正相关, 相关系数分别为 0.947 66 和 0.935 85。筛选得到的 8 个基因属于 *WRKY* 类型的第 I 类 (1 个)、第 II 类 (IIb 类 3 个、IIc 类 2 个)、第 III 类 (1 个) 和其他 (1 个), 这与文献报道的参与丹参酮和酚酸生物合成的 *WRKY* 基因的类型部分一致^[31]。秦皮甲素和秦皮乙素是白蜡树枝皮中的主要成分, 属于香豆素类物质, 其生物合成途径尚未阐明。通过相关性分析, 筛选出以上白蜡树 *WRKY* 基因家族中 8 个基因与秦皮甲素、秦皮乙素具有显著相关性, 但是其在秦皮甲素和秦皮乙素的生物合成途径中是否具有调控作用, 后期仍需要功能验证。

在物种适应性进化过程中, 密码子形成了一定的偏好性, 并具有物种和基因差异^[24]。白蜡树

FcWRKYs 的总 GC 含量为 37.01%~50.79%，密码子第 3 位碱基上的 A、U、G、C 出现的平均频率分别为 38.18%、41.82%、25.39%和 22.30%，ENC 值在 45.52~59.44，表明白蜡树 FcWRKYs 偏好使用以 A/U 结尾的密码子，并且偏好性较弱。这与甘蓝型油菜^[35]、拟南芥^[36]、银杏^[37]和向日葵^[38]WRKY 转录因子的研究结果一致，均偏好以 A/U 结尾的密码子，而水稻^[36]WRKY 转录因子偏好以 G/C 结尾。中性绘图分析和 ENC-plot 绘图分析均表明自然选择是影响 FcWRKYs 密码子偏好性的主要因素。此外，PR2 偏倚分析表明 FcWRKYs 基因密码子偏好性除受到自然选择的影响，亦会受到碱基突变压力的影响。这与银杏 WRKY 基因家族密码子偏好性影响因素的研究结果一致^[37]，而向日葵^[38]和蒺藜苜蓿^[39]WRKY 转录因子密码子偏好性主要受突变压力的影响，表明不同物种 WRKY 基因家族密码子偏好性的影响因素并不完全一致。

本研究基于前期对白蜡树叶片、枝皮的全长转录组测序结果，对其中的 WRKY 基因家族成员进行鉴定，得到 49 个 FcWRKY 基因，并对其进行了理化性质分析、构建系统进化树、保守基序分析和密码子偏好性分析。通过 qRT-PCR 方法对 8 个 WRKY 基因的表达式进行了验证，与转录组测序结果表达趋势一致。为白蜡树中 WRKY 基因功能的进一步研究提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 周军辉, 谢斌, 石新卫, 等. 多基原秦皮药材中秦皮甲素和秦皮苷的纯化工艺研究 [J]. 西北药学杂志, 2014, 29(5): 449-452.
- [2] 钱正明, 吴梦奇, 谭国英, 等. 高效液相色谱紫外等吸收波长法快速测定秦皮中秦皮甲素和秦皮乙素 [J]. 色谱, 2023, 41(8): 690-697.
- [3] Chang H C, Wang S W, Chen C Y, et al. Secoiridoid glucosides and anti-inflammatory constituents from the stem bark of *Fraxinus chinensis* [J]. *Molecules*, 2020, 25(24): 5911.
- [4] Sun X C, Li H R. Full-length transcriptome combined with RNA sequence analysis of *Fraxinus chinensis* [J]. *Genes Genomics*, 2023, 45(5): 553-567.
- [5] 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.
- [6] 杨教童, 李鹏飞, 肖巧巧. 金银花 WRKY 基因家族的鉴定与功能分析 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2023, 45(7): 87-96.
- [7] Krishnamurthy P, Vishal B, Bhal A, et al. WRKY9 transcription factor regulates cytochrome P450 genes *CYP94B3* and *CYP86B1* leading to increased root suberin and salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Physiol Plant*, 2021, 172(3): 1673-1687.
- [8] Rinerson C I, Scully E D, Palmer N A, et al. The WRKY transcription factor family and senescence in switchgrass [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 912.
- [9] Chen C B, Xie F F, Shah K, et al. Genome-wide identification of WRKY gene family in pitaya reveals the involvement of *HmoWRKY42* in betalain biosynthesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10568.
- [10] Guo X Q, Ullah A, Siuta D, et al. Role of WRKY transcription factors in regulation of abiotic stress responses in cotton [J]. *Life*, 2022, 12(9): 1410.
- [11] Song H, Cao Y P, Zhao L G, et al. Review: WRKY transcription factors: Understanding the functional divergence [J]. *Plant Sci*, 2023, 334: 111770.
- [12] Hussain R M F, Kim H K, Khurshid M, et al. Overexpression of AtWRKY50 is correlated with enhanced production of sinapic derivatives in *Arabidopsis* [J]. *Metabolomics*, 2018, 14(3): 25.
- [13] Thakur V, Bains S, Kaur R, et al. Identification and characterization of *SlbHLH*, *SlDof* and *SlWRKY* transcription factors interacting with *SIDPD* gene involved in costunolide biosynthesis in *Saussurea lappa* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 173: 146-159.
- [14] Zhou W, Yang S, Yang L, et al. Genome-wide identification of the *Hypericum perforatum* WRKY gene family implicates *HpWRKY85* in drought resistance [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 352.
- [15] Li J, Yu H W, Liu M L, et al. Transcriptome-wide identification of WRKY transcription factors and their expression profiles in response to methyl jasmonate in *Platycodon grandiflorus* [J]. *Plant Signal Behav*, 2022, 17(1): 2089473.
- [16] Qu R J, Cao Y W, Tang X Q, et al. Identification and expression analysis of the WRKY gene family in *Isatis indigotica* [J]. *Gene*, 2021, 783: 145561.
- [17] Ma J C, Lu J, Xu J M, et al. Genome-wide identification of WRKY genes in the desert poplar *Populus euphratica* and adaptive evolution of the genes in response to salt stress [J]. *Evol Bioinform Online*, 2015, 11(Suppl 1): 47-55.
- [18] Parvathy S T, Udayasuriyan V, Bhadana V. Codon usage bias [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(1): 539-565.
- [19] Angellotti M C, Bhuiyan S B, Chen G R, et al. CodonO:

- Codon usage bias analysis within and across genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(Web Server issue): W132-W136.
- [20] 何懿菡, 尹洋洋, 胡伟, 等. 秦艽 WRKY 转录因子家族生物信息学分析 [J]. 中草药, 2022, 53(23): 7499-7506.
- [21] 梁浩, 孙海, 邵财, 等. 人参 *PgWRKY22* 基因的克隆及在磷胁迫下的表达分析 [J]. 中草药, 2023, 54(13): 4286-4294.
- [22] 张佳琪, 刘晓冉, 陈佳茜, 等. 参与连翘苯丙烷合成途径的 WRKY 转录因子的筛选与鉴定 [J]. 中草药, 2023, 54(18): 6055-6064.
- [23] 刘涛, 尹登攀, 金吉芬, 等. 南五味子属叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. 西北林学院学报, 2023, 38(5): 102-109.
- [24] 李媛, 多杰措, 熊辉岩, 等. 大麦 *HD-Zip* 基因家族密码子偏好性分析 [J]. 麦类作物学报, 2020, 40(2): 144-153.
- [25] 王占军, 吴子琦, 王朝霞, 等. 3 个茶树品种 *WOX* 基因家族的进化及密码子偏好性比较 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2022, 46(2): 71-80.
- [26] Byrne A, Cole C, Volden R, *et al.* Realizing the potential of full-length transcriptome sequencing [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2019, 374(1786): 20190097.
- [27] Wang P J, Yue C, Chen D, *et al.* Genome-wide identification of *WRKY* family genes and their response to abiotic stresses in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Genes Genomics*, 2019, 41(1): 17-33.
- [28] Chen X, Chen R H, Wang Y F, *et al.* Genome-wide identification of *WRKY* transcription factors in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* mill.) and their involvement in fruit developing, ripening, and abiotic stress [J]. *Genes*, 2019, 10(5): 360.
- [29] Zhou Q Y, Tian A G, Zou H F, *et al.* Soybean *WRKY*-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Plant Biotechnol J*, 2008, 6(5): 486-503.
- [30] 尚军, 吴旺泽, 马永贵. 植物苯丙烷代谢途径 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2022, 38(11): 1467-1476.
- [31] 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): 1593.
- [32] Grunewald W, De Smet I, Lewis D R, *et al.* Transcription factor *WRKY23* assists auxin distribution patterns during *Arabidopsis* root development through local control on flavonol biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(5): 1554-1559.
- [33] Sun H H, Wang L, Zhang B Q, *et al.* Scopoletin is a phytoalexin against *Alternaria alternata* in wild tobacco dependent on jasmonate signalling [J]. *J Exp Bot*, 2014, 65(15): 4305-4315.
- [34] Song N, Wu J S. *NaWRKY70* is a key regulator of *Nicotiana attenuata* resistance to *Alternaria alternata* through regulation of phytohormones and phytoalexins biosynthesis [J]. *New Phytol*, 2024, 242(3): 1289-1306.
- [35] 李冠英, 王政, 张志燕, 等. 甘蓝型油菜 *WRKY* 基因家族碱基组成及密码子使用特性分析 [J]. 生物学杂志, 2013, 30(4): 42-45.
- [36] 刘汉梅, 何瑞, 张怀渝, 等. 拟南芥和水稻转录因子 *WRKY* 同义密码子的偏好性分析 [J]. 四川农业大学学报, 2010, 28(1): 20-27.
- [37] 石元豹, 汪贵斌, 杨晓明, 等. 银杏 *WRKY* 家族基因密码子使用偏向性分析 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(5): 1503-1511.
- [38] Gao Y, Lu Y, Song Y, *et al.* Analysis of codon usage bias of *WRKY* transcription factors in *Helianthus annuus* [J]. *BMC Genom Data*, 2022, 23(1): 46.
- [39] 宋辉, 王鹏飞, 马登超, 等. 蒺藜苜蓿 *WRKY* 转录因子密码子使用偏好性分析 [J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(2): 203-212.

[责任编辑 时圣明]