

决明 *WRKY* 基因家族鉴定及其对茉莉酸甲酯的响应

徐 阳¹, 杜凯妮¹, 于 潇¹, 阎 岩^{1,2}, 杜宏涛^{1,2}, 陈国梁^{1,2*}, 毛仁俊^{1,2*}

1. 延安大学生命科学学院, 陕西 延安 716000

2. 陕西省黄土高原资源植物研究与利用重点实验室, 陕西 延安 716000

摘要: **目的** 利用生物信息学的方法分析决明 *WRKY* 转录因子家族成员, 为深入研究其生物学功能提供参考。**方法** 基于决明基因组注释信息, 利用生物信息学的方法对 *WRKY* 家族成员的理化性质、进化关系、基因结构、保守基序进行分析。通过实时荧光定量 PCR 的方法 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR), 测定茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 处理条件下决明 *WRKY* 与萜醌类代谢物合成途径关键酶基因的表达模式。**结果** 从决明基因组中共鉴定出 82 个 *SoWRKYs* 家族成员, 编码氨基酸数量为 69~1 394 aa, 蛋白相对分子质量为 8 006.1~158 759.11, 等电点 4.68~10.13, 除 *SoWRKY72* 为疏水性蛋白以外, 其余 *SoWRKYs* 均为亲水性蛋白。大部分 *SoWRKY* 蛋白定位于细胞核。82 个 *SoWRKYs* 不均匀地分布于 13 条染色体上。根据基因结构的特点将 *SoWRKYs* 家族成员分为 3 个亚家族。顺式作用元件分析表明 *SoWRKYs* 的表达受到光、激素和胁迫的影响。qRT-PCR 分析的结果表明 7 个 *SoWRKYs* 对于 MeJA 均有响应, 其中 *SoWRKY6* 和 *SoWRKY38* 在 6 h 表达水平最高, 而 *SoWRKY10/39/72/73* 的表达峰值出现在 12 h。*SoWRKYs* 与萜醌代谢途径关键酶基因之间的相关性分析表明, *SoWRKYs* 能够调节萜醌类物质合成途径 *SoCHS*、*SoICS*、*SoMenB* 等酶基因的表达。**结论** 为解析 *SoWRKYs* 对 MeJA 的响应提供了参考, 也为深入探究 *SoWRKYs* 在萜醌类物质积累调控中的功能奠定了理论基础。

关键词: 决明; *WRKY* 转录因子; 生物信息学分析; 茉莉酸甲酯; 基因表达分析

中图分类号: R286.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)21-7944-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.21.023

Characterization of *Senna obtusifolia* *WRKY* gene family and their response to methyl jasmonate

XU Yang¹, DU Kaini¹, YU Xiao¹, YAN Yan^{1,2}, DU Hongtao^{1,2}, CHEN Guoliang^{1,2}, MAO Renjun^{1,2}

1. College of Life Science, Yan'an University, Yan'an 716000, China

2. Shaanxi Key Laboratory of Research and Utilization of Resource Plants on the Loess Plateau, Yan'an 716000, China

Abstract: Objective To identify the *WRKY* transcription factor family by bioinformatics, and to provide a reference for further research on their biological function. **Methods** Based on the annotation information of the *Senna obtusifolia* genome, bioinformatics methods were employed to analyze the physicochemical properties, evolutionary relationships, gene structures, and conserved motifs of *WRKY* family. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to determine the expression patterns of *WRKY* and key enzyme genes involved in anthraquinone synthesis under the condition of methyl jasmonate (MeJA) treatment. **Results** A total of 82 *SoWRKYs* were identified from the *S. obtusifolia* genome, with their encoded proteins ranging from 69 to 1 394 amino acids in length. The molecular weight of *SoWRKYs* ranged from 8 006.1 to 158 759.11 and the isoelectric points ranged from 4.68 to 10.13. Except for *SoWRKY72*, which is a hydrophobic protein, all other *SoWRKYs* were hydrophilic proteins. Most of *SoWRKYs* localized in nucleus. 82 *SoWRKYs* were unevenly distributed on 13 chromosomes. *SoWRKYs* were divided into three subfamilies based on the domain characters. Cis-acting element analysis indicated that *SoWRKYs* can response to light, hormones, and stress. The results of qRT-PCR analysis showed that seven *SoWRKYs* can respond to MeJA, among which *SoWRKY6* and *SoWRKY38* had the highest expression levels at 6 h, while the expression peak of *SoWRKY10/39/72/73* appeared at 12 h. Correlation analysis between *SoWRKYs* and key enzyme genes showed that *SoWRKYs* could regulate the expression of key enzyme genes such as *SoCHS*, *SoICS* and *SoMenB*.

收稿日期: 2025-05-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32460096); 延安市高层次人才项目 (2019-23)

作者简介: 徐 阳, 硕士研究生, 研究方向为药用植物基因功能。E-mail: yangxuyanda@126.com

*通信作者: 毛仁俊, 副教授, 硕士生导师, 从事药用植物资源开发与利用研究。E-mail: mrjnwsuaf@126.com

陈国梁, 教授, 硕士生导师, 从事特色资源植物的遗传与育种研究。E-mail: glc9359@163.com

Conclusion The present study provides a reference for in-depth analysis of the response mechanism of *SoWRKYs* to MeJA. In addition, this study also lays a theoretical foundation for the further exploration of *SoWRKYs* function in regulating anthraquinone accumulation.

Key words: *Senna obtusifolia* L.; WRKY transcription factor; bioinformatics analysis; methyl jasmonate; gene expression analysis

决明子是我国著名的传统中药, 具有清热明目、调血脂、润肠通便等多种功效^[1]。决明子中富含的蒽醌、多糖和脂肪酸等成分是其发挥药理功效的物质基础^[2-4]。决明 *Senna obtusifolia* L. 是豆科决明, 属一年生草本植物, 是决明子的基原植物之一。目前关于决明的研究主要集中于化合物的分离鉴定、药理活性分析以及药材质量评价等方面, 而对于转录因子的鉴定与功能研究鲜见报道。

WRKY 是植物重要的转录因子家族之一, 因其 N 端高度保守的七肽结构域 WRKYGQK 而得名^[5-7]。WRKY 广泛参与植物对外界胁迫的响应, 具有多种调节功效。在药用植物次生代谢调控^[8]、抵抗病原菌^[9]和响应盐胁迫^[10]等多个方面已有报道。茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 作为一种重要的植物激素, 能够通过调节转录因子与结构基因的表达来调节次生代谢物积累^[11-12], 在连翘^[13]、秦艽^[14]、绞股蓝^[15]中已有报道。利用激素处理研究转录因子以及代谢途径关键酶基因的变化模式, 有助于明确调控元件的功能, 解析代谢物合成的分子机制, 是药用植物代谢调控领域研究的热点之一。

决明中蒽醌类化合物的生物合成途径至今尚未完全解析。已有的研究表明蒽醌类物质的合成能够经由多个丙二酰辅酶 A 在查耳酮合成酶等的催化下首先形成八酮链前体, 再经过还原反应、脱氢反应以及烯醇化反应等形成大黄酚蒽酮或四氢酮羧酸等蒽醌类前体^[16]; 亦或是经由莽草酸途径、甲基萘醌途径生成化合物 1,4-二羟基-2-萘酰辅酶 A, 再与甲基赤藓糖醇磷酸途径生成的二甲基烯丙基二磷酸三铵盐反应生成 9,10-蒽醌, 进而形成各种蒽醌类物质^[17-18]。转录因子在蒽醌合成途径中的功能研究鲜见报道。

目前, 决明 *GRAS*^[19]、*ARF*^[20]、*GSK*^[21] 基因家族已有报道, 然而关于 WRKY 转录因子的研究未见报道。因此, 本研究基于决明基因组的数据, 对 WRKY 家族成员进行鉴定, 并利用生物信息学的方法对其理化性质、进化关系、基因结构、保守基序等进行分析。此外, 利用 MeJA 处理决明, 研究 WRKY 转录因子与代谢途径关键酶基因的表达模

式, 为深入研究决明 WRKY (*SoWRKYs*) 的功能, 探究其在蒽醌类物质积累调控中的功能奠定基础。

1 材料

决明子收集于陕西天士力植物药业有限公司中药材种植基地。经延安大学生命科学学院阎岩教授鉴定为豆科决明属植物决明 *S. obtusifolia* L. 的种子。将种子除杂后置于培养皿中发芽, 待子叶长成后转移至四分之一浓度的霍格兰营养液中培养。水培盒置于光照培养箱中在光照/黑暗 (16 h/8 h), 光强 3 000 Lx, 温度 25 °C/20 °C (白天/夜间), 相对湿度 40% 的条件下生长 6 周。选择植株健康、长势均匀的决明进行 MeJA 处理。

2 方法

2.1 *SoWRKYs* 家族的鉴定

从 NABIC (http://nabic.rda.go.kr/Species/Senna_tora2) 下载决明基因组数据、GFF3 注释信息文件以及蛋白序列文件, 在 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 网站下载 WRKY 的隐马尔可夫模型, 登录号为 PF03106。使用 TBtools^[22] 筛选出 *SoWRKYs* 相应的 ID, 去重复之后利用 TBtools 提取对应的蛋白序列, 利用 NCBI 数据库中 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 进行 WRKY 蛋白序列的鉴定。

2.2 *SoWRKYs* 家族的染色体定位及理化性质分析

利用决明基因组 GFF3 注释文件获取 *SoWRKYs* 基因在染色体上的分布信息, 并使用 MG2C (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/) 进行可视化分析。将鉴定后的 *SoWRKYs* 蛋白序列导入 TBtools 进行氨基酸、等电点、相对分子质量、亲水性等分析。利用 Cell-PLoc 2.0 对 WRKY 家族成员进行亚细胞定位预测。

2.3 *SoWRKYs* 家族系统进化分析

通过 MEGA 7.0 软件对 *SoWRKYs* 蛋白质序列进行多重比对, 使用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树, bootstrap 值设置 1 000, 选择 PDIST 方法, 其他参数使用默认选项。利用 Chiplot (<https://www.chiplot.online/#>) 对进化树进行优化^[23]。

2.4 SoWRKYs 家族保守基序和基因结构分析

利用 MEME 在线软件对 *SoWRKYs* 家族成员进行保守基序 Motif 分析预测。将 NWK 文件、MEME 分析文件以及决明基因注释文件导入 TBtools 中，对进化树、Motif 分布和基因结构的分析结果进行可视化。

2.5 SoWRKYs 家族的共线性分析与启动子顺式作用元件分析

使用 TBtools 软件中 Super Fast 插件绘制决明与拟南芥 (https://plants.ensembl.org/Arabidopsis_thaliana/Info/Index)、大豆 (https://plants.ensembl.org/Glycine_max/Info/Index) 之间的共线性分析图。利用决明基因组文件和注释文件提取基因上游 2 000 bp 序列，获得 *SoWRKYs* 的启动子序列信息，上传至 plantcare 网站进行启动子序列预测。利用 TBtools 绘制启动子顺式作用元件图。

2.6 MeJA 溶液的配制与样品处理

利用浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 喷施处理决明叶片，以喷施 20%乙醇作为对照。取样时间参照杜桥等的实验方法^[24]，略有修改。分别于 MeJA 处理后的 0.5、3、6、12、24、48 h 取样，每个时间点分别选取 3 株决明进行试验，液氮速冻后置于 -80°C 冰箱待用。

2.7 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 分析

RNA 提取参照华越洋快速通用植物 RNA 提取试剂盒说明书进行。反转录采用 TIANGEN FastKing RT Kit 反转录试剂盒。通过 qRT-PCR 的方法，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的计算方式，以 *So18S RNA* 为内参基因，对表 1 中的基因进行定量分析。20 μL 的 qPCR 反应体系包含 ddH₂O 8.2 μL ，qPCR SYBR Mix (翌圣生物科技有限公司) 10 μL ，正反向引物各 0.4 μL ，cDNA 模板 1.0 μL 。qPCR 反应条件为预变性 95°C 、5 min，循环反应 95°C 、10 s， 60°C 、30 s，40 个循环。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primers for real-time fluorescence quantitative PCR

基因名	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
<i>So18sRNA</i>	TTGAAGAACGGTGATGCAGGTA	CACACTCTTGATGACTCCCACA
<i>SoWRKY1</i>	CGTGCCACAAAGGTGTTATA	ACGGAAGATTTTCATCCCAGA
<i>SoWRKY6</i>	CCGAGTGAAATGTGAATGG	CAGGCTTTGTATAATCTTGGAG
<i>SoWRKY10</i>	CTTAGATGGGTGATGGATG	TAAACCTGCTTACGAAGCTG
<i>SoWRKY38</i>	CGAAACCTGTATCTACCTCT	ATGAACTCAATCCTGACCCCT
<i>SoWRKY39</i>	GAGTAGGTCGGGACAAGAG	GATGTGGGAGAAACTGAAA
<i>SoWRKY72</i>	GAATCCTCGGGCGAAGAAG	GCTCGGTGCTGTGGCTGTA
<i>SoWRKY73</i>	ATCTCCACGCCGTAGTCAG	CAATTTCAAACCCCTTGCTT
<i>SoCHS</i> ^[25]	GGTCCTAGCGACACCCAT	GAGCCCAACCTCACGAAG
<i>SoICS</i> ^[26]	CCCATCCTCCATTACGC	AGAACCAAGACCCGCCAC
<i>SoMenB</i>	GCGCCTTCGCCTTCTTTATGTTA	AAGCATTTCTTCTCTGTCCTA
<i>SoDAHPS</i>	ACCACCACCACTCTGAAAATGGC	GGTGAAGAGGGATGGAAATGACG

2.8 数据分析

采用 Excel 2021 (Microsoft office 公司，美国)、GraphPad Prism 9 (GraphPad Software 公司，美国) 进行数据统计和显著性分析，其中数据显著性分析使用单向方差法。绘图制表利用 TBtools v2.130、GraphPad Prism 9 和 Adobe Illustrator 2021。

3 结果与分析

3.1 SoWRKYs 家族基因鉴定和理化性质分析

在 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 搜索并下载 WRKY 蛋白保守结构域 (PF03106) 隐马尔可夫模型 (HMM) 文件，通过 TBtools 初步筛选出 86 个 *SoWRKY* 转录因子基因家族成员，经 CDD 网站验证后最终得到 82 个 *SoWRKY* 基因，将其命名为 *SoWRKY1*~*SoWRKY82*。TBtools 分析结果显

示，82 个 *SoWRKYs* 编码蛋白序列在 69~1 394 个氨基酸，最小值和最大值分别对应 *SoWRKY52* (69 aa) 和 *SoWRKY9* (1 394 aa)，相对分子质量介于 8 006.1~158 759.11，等电点为 4.68~10.13。50 个 *SoWRKYs* 蛋白等电点小于 7，为酸性蛋白，32 个等电点大于 7，为碱性蛋白；不稳定指数在 38.07~70.40，其中 4 个蛋白不稳定指数小于 40，是稳定蛋白，其他蛋白不稳定指数均大于 40，为不稳定蛋白 (表 2)。亲水性平均系数除 *SoWRKY72* 为疏水蛋白以外，其余均为亲水性蛋白。亚细胞定位预测分析表明 *SoWRKY9* 蛋白定位于细胞膜，*SoWRKY21* 可定位于细胞膜或细胞核，*SoWRKY72* 定位于叶绿体或细胞核，其余 *SoWRKYs* 蛋白均定位于细胞核 (表 2)。

表 2 *SoWRKYs* 家族成员蛋白理化性质及亚细胞定位
Table 2 Physicochemical properties and subcellular localization of *SoWRKYs*

名称	氨基酸数	相对分子质量	等电点	不稳定指数	亲水性系数	亚细胞定位
SoWRKY1	408	45 776.73	9.17	56.32	-0.591	细胞核
SoWRKY2	300	34 155.40	5.38	60.91	-0.644	细胞核
SoWRKY3	172	19 387.75	6.51	40.95	-0.451	细胞核
SoWRKY4	1 017	113 356.50	4.81	43.18	-0.440	细胞核
SoWRKY5	300	33 316.75	5.00	52.43	-0.780	细胞核
SoWRKY6	330	37 075.08	5.71	70.40	-1.002	细胞核
SoWRKY7	561	60 338.42	6.15	50.35	-0.656	细胞核
SoWRKY8	312	34 805.43	6.12	42.57	-0.915	细胞核
SoWRKY9	1 394	158 759.11	6.69	48.13	-0.307	细胞膜
SoWRKY10	394	43 067.61	8.59	41.95	-0.531	细胞核
SoWRKY11	256	28 020.13	5.98	66.02	-0.647	细胞核
SoWRKY12	438	47 905.89	5.87	53.13	-1.036	细胞核
SoWRKY13	520	57 368.76	5.78	54.06	-0.922	细胞核
SoWRKY14	178	20 288.12	6.24	50.42	-1.096	细胞核
SoWRKY15	178	20 136.60	7.82	38.56	-0.870	细胞核
SoWRKY16	153	17 408.01	10.13	41.67	-0.628	细胞核
SoWRKY17	290	31 183.43	9.98	60.88	-0.500	细胞核
SoWRKY18	242	26 590.79	6.12	55.33	-0.475	细胞核
SoWRKY19	236	26 879.37	8.36	44.67	-0.717	细胞核
SoWRKY20	217	24 498.81	5.48	45.54	-0.953	细胞核
SoWRKY21	823	90 431.79	8.43	43.59	-0.206	细胞膜/细胞核
SoWRKY22	301	32 756.40	5.80	47.16	-0.588	细胞核
SoWRKY23	619	67 430.65	6.04	48.89	-0.713	细胞核
SoWRKY24	239	27 359.02	6.79	40.15	-0.446	细胞核
SoWRKY25	735	79 951.82	5.94	53.20	-0.813	细胞核
SoWRKY26	514	57 048.49	7.08	57.49	-0.954	细胞核
SoWRKY27	325	34 555.13	5.18	63.25	-0.576	细胞核
SoWRKY28	165	18 022.20	6.91	48.32	-0.742	细胞核
SoWRKY29	364	41 424.15	5.26	60.30	-0.750	细胞核
SoWRKY30	555	61 901.42	6.20	55.16	-0.934	细胞核
SoWRKY31	360	38 605.01	6.48	50.82	-0.819	细胞核
SoWRKY32	345	39 391.02	5.27	56.77	-0.773	细胞核
SoWRKY33	274	30 971.51	5.22	52.60	-0.643	细胞核
SoWRKY34	337	36 744.55	9.65	58.08	-0.600	细胞核
SoWRKY35	229	26 728.91	5.59	50.56	-0.635	细胞核
SoWRKY36	241	27 750.62	4.80	55.87	-0.779	细胞核
SoWRKY37	767	82 307.19	5.76	44.50	-0.509	细胞核
SoWRKY38	474	52 813.21	6.33	59.62	-0.723	细胞核
SoWRKY39	525	56 679.27	8.65	51.09	-0.534	细胞核
SoWRKY40	305	33 492.35	7.17	54.66	-0.569	细胞核
SoWRKY41	255	28 934.12	5.15	57.32	-0.978	细胞核
SoWRKY42	361	40 595.88	9.63	56.38	-0.781	细胞核
SoWRKY43	451	50 509.09	9.13	56.34	-1.084	细胞核
SoWRKY44	184	20 665.95	9.28	46.08	-1.083	细胞核
SoWRKY45	479	52 078.05	7.69	62.76	-0.749	细胞核
SoWRKY46	325	36 373.69	8.76	54.99	-0.968	细胞核
SoWRKY47	284	31 728.35	6.07	64.84	-0.939	细胞核
SoWRKY48	551	60 925.70	6.45	39.18	-0.940	细胞核
SoWRKY49	608	65 961.98	6.63	49.78	-0.637	细胞核
SoWRKY50	804	91 931.27	7.24	42.10	-0.039	细胞核
SoWRKY51	511	57 199.68	7.66	48.13	-0.352	细胞核
SoWRKY52	69	8 006.10	9.91	38.07	-1.261	细胞核
SoWRKY53	371	40 856.55	6.24	46.10	-0.898	细胞核
SoWRKY54	517	57 246.85	8.08	53.46	-0.628	细胞核
SoWRKY55	666	75 053.59	8.47	46.26	-0.044	细胞核
SoWRKY56	603	66 077.00	6.88	57.00	-0.959	细胞核

表 2 (续)

名称	氨基酸数	相对分子质量	等电点	不稳定指数	亲水性系数	亚细胞定位
SoWRKY57	326	36 071.35	7.17	66.93	-0.647	细胞核
SoWRKY58	298	33 256.05	6.20	51.52	-0.752	细胞核
SoWRKY59	264	29 237.50	6.75	49.55	-0.519	细胞核
SoWRKY60	338	36 482.22	9.50	49.67	-0.589	细胞核
SoWRKY61	269	30 351.87	8.15	42.08	-0.770	细胞核
SoWRKY62	418	471 27.00	9.66	48.90	-0.631	细胞核
SoWRKY63	503	54 619.26	6.20	44.25	-0.688	细胞核
SoWRKY64	335	36 441.22	6.04	68.02	-0.749	细胞核
SoWRKY65	462	50 320.89	6.77	48.87	-0.802	细胞核
SoWRKY66	277	30 640.93	5.44	60.43	-0.578	细胞核
SoWRKY67	282	31 079.06	9.81	46.33	-0.710	细胞核
SoWRKY68	503	54 368.18	5.33	45.93	-0.702	细胞核
SoWRKY69	619	66 497.36	6.29	51.07	-0.640	细胞核
SoWRKY70	672	74 364.65	9.23	48.20	-0.677	细胞核
SoWRKY71	165	18 477.95	9.87	51.01	-1.095	细胞核
SoWRKY72	564	60 340.01	9.50	39.95	0.659	叶绿体/细胞核
SoWRKY73	325	34 479.07	5.94	56.26	-0.522	细胞核
SoWRKY74	188	21 356.71	9.10	39.02	-0.986	细胞核
SoWRKY75	527	57 608.21	7.73	63.37	-0.779	细胞核
SoWRKY76	300	31 999.95	4.68	68.53	-0.509	细胞核
SoWRKY77	296	33 159.61	5.12	67.96	-0.839	细胞核
SoWRKY78	414	45 561.53	5.73	52.50	-0.727	细胞核
SoWRKY79	462	51 114.28	5.38	56.08	-0.840	细胞核
SoWRKY80	377	41 864.16	9.52	54.50	-0.717	细胞核
SoWRKY81	254	28 820.21	4.85	57.91	-0.891	细胞核
SoWRKY82	289	32 380.16	6.73	58.53	-0.730	细胞核

3.2 *SoWRKYs* 的染色体定位分析

染色体定位分析表明 82 个 *SoWRKYs* 不均匀地分布于 13 条染色体上。9 号染色体上分布的 *SoWRKYs* 最多, 有 17 个, 约占 *SoWRKYs* 总数的

20.7%。其中 *SoWRKY50/52/54/56* 以及 *SoWRKY51/53/55* 分别形成基因簇。*SoWRKYs* 在 4 号和 10 号染色体上分布最少, 每条染色体仅含有 2 个 *SoWRKYs*, 仅占 *SoWRKYs* 总数的 2.4% (图 1)。

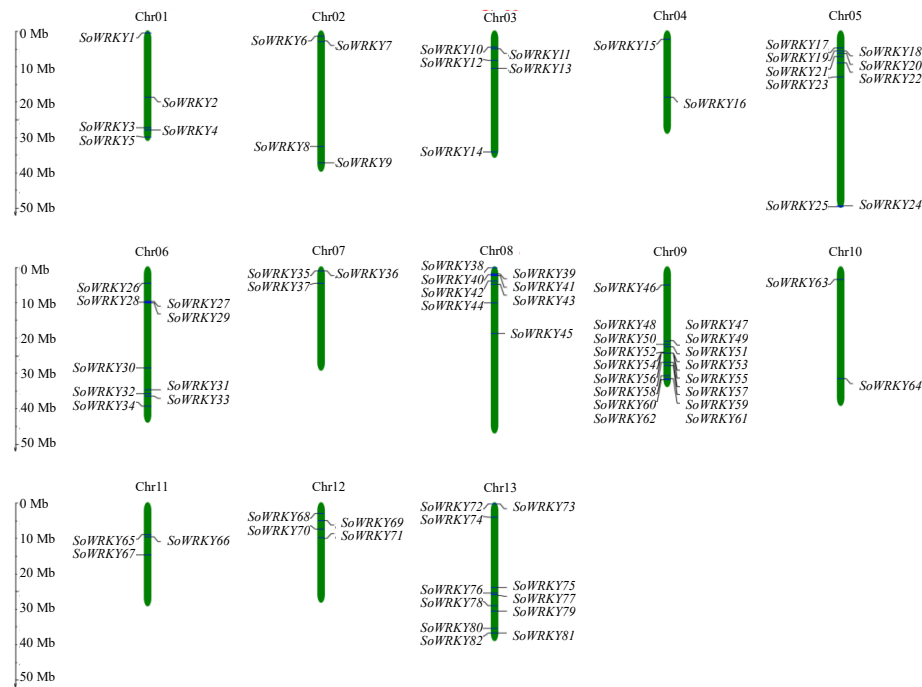


图 1 *SoWRKYs* 家族成员的染色体定位
Fig. 1 Chromosome distribution of *SoWRKYs*

3.3 *SoWRKYs* 的系统进化分析

利用 MEGA 7.0 软件对筛选得到的 82 条 *SoWRKYs* 进行多序列比对, 并采用邻接法构建系统进化树(图 2)。根据其 N 端七肽保守结构域的数量以及 C 端锌指结构类型, 将 *SoWRKYs* 分为 3 个亚家族, 其中第 II 亚家族 *SoWRKYs* 成员数量最多,

达到 58 个, 而第 III 亚家族 *SoWRKYs* 数量最少, 仅为 11 个。第 I 亚家族成员 N 端有 2 个 WRKY 结构域, C 端是 C₂H₂ 锌指结构; 第 II 亚家族成员大多 N 端包含有 1 个 WRKY 结构域, C 端锌指结构与第 I 亚家族相同; 第 III 亚家族 N 端有 1 个 WRKY 结构域, C 端锌指结构为特殊的 C₂HC 型。

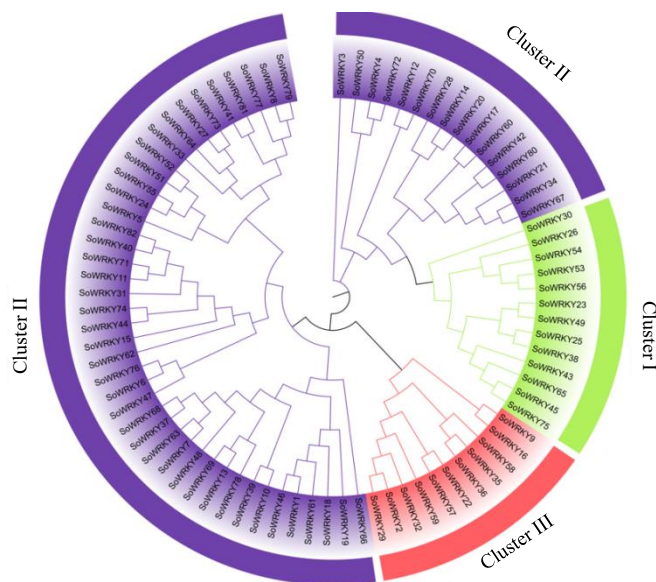


图 2 *SoWRKYs* 家族系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic analysis of *SoWRKYs*

3.4 *SoWRKYs* 家族保守基序和基因结构分析

SoWRKYs 家族成员中共鉴定到 10 个保守基序, 命名为 Motif 1~Motif 10。*SoWRKY8*、*SoWRKY33*、*SoWRKY41*、*SoWRKY77*、*SoWRKY79*、*SoWRKY81* 等均含有相同排序的 Motif 1、Motif 2、Motif 3 和 Motif 4, 而 *SoWRKY66* 仅含有 Motif 2, *SoWRKY16* 仅含有 Motif 1。除了 *SoWRKY72*、*SoWRKY73* 之外, Motif 8 几乎存在于同一亚族中, 说明基因的保守基序与其特定的功能相关(图 3)。*SoWRKYs* 结构相对较复杂, 大多数基因均含有多个蛋白质编码序列(图 4)。10 个基序的序列长度从 11 个氨基酸(Motif 3 和 Motif 4)到 47 个氨基酸(Motif 7)不等(图 5)。

3.5 *SoWRKYs* 的共线性分析与顺式作用元件分析

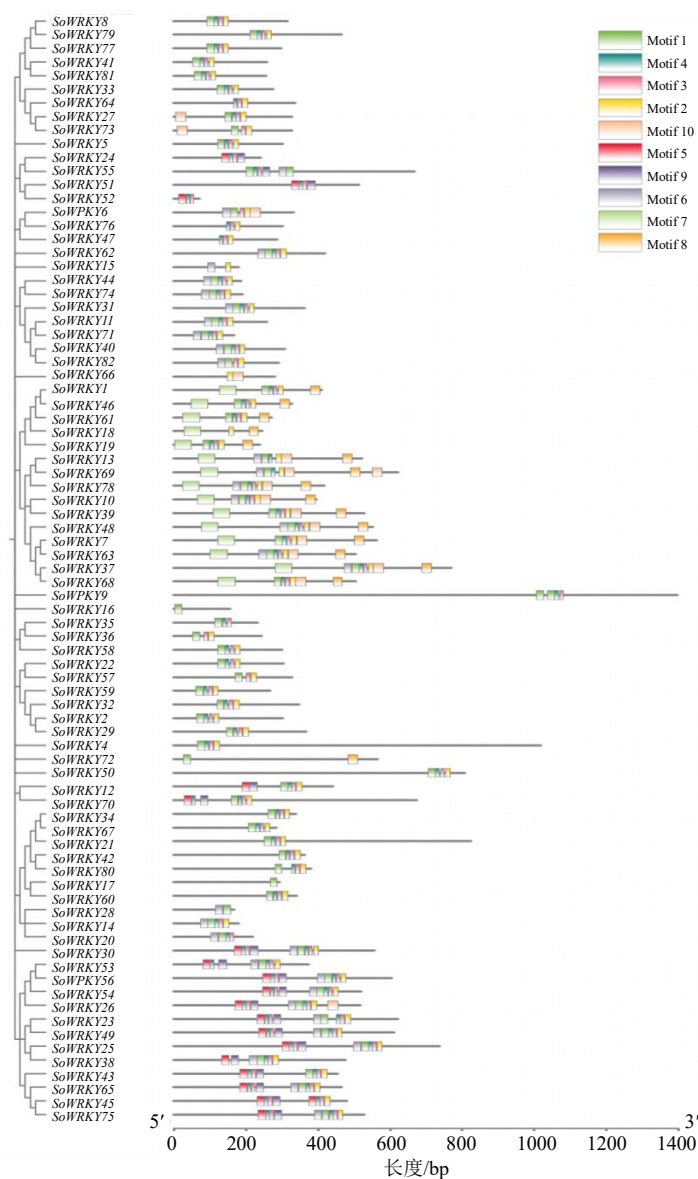
决明与拟南芥的共线性分析表明, 除决明第 7 条染色体上与拟南芥无共线性基因之外, 其余 12 条染色体与拟南芥均存在多个共线性基因(图 6)。与拟南芥相比, 决明与大豆之间具有更多的共线性基因, 且每条染色体上均存在与大豆共线性的

WRKY, 表明 *SoWRKYs* 在同科植物中可能具有较高的保守性。

为明确 *SoWRKYs* 启动子区域的顺式作用元件在激素响应、光响应、环境胁迫响应过程中的作用, 利用 Plantcare 查找 *SoWRKYs* 启动子区域含有的顺式作用元件(图 7)。在顺式作用元件功能分类中, 所有 *SoWRKYs* 中均存在光响应元件和激素响应元件。由图 7 可知, *SoWRKYs* 受到 MeJA、水杨酸(salicylic acid, SA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)以及赤霉素(gibberellin, GA)等的诱导。

3.6 *SoWRKYs* 对 MeJA 处理的响应

MeJA 处理对 *SoWRKYs* 的表达产生了显著影响, 不同基因的表达模式各不相同(图 8)。在 0.5 h 时 MeJA 处理显著下调了 *SoWRKYs* 的表达水平。除 *SoWRKY1* 和 *SoWRKY72* 之外, 其他 5 个 *SoWRKYs* 表达水平较低。此外, 不同基因由下降转为上升的时间点不同, *SoWRKY1* 和 *SoWRKY38* 对于 MeJA 响应较快, 在处理 3 h 后表达上调, *SoWRKY6* 的表达水平

图 3 *SoWRKYs* 基因保守基序分析Fig. 3 Converged domain pattern analysis of *SoWRKYs*

在 6 h 显著上调, 而 *SoWRKY10*、*SoWRKY39*、*SoWRKY72* 及 *SoWRKY73* 对于 MeJA 响应相对较慢, 在 12 h 开始表达上调。*SoWRKY6* 和 *SoWRKY38* 在 6 h 表达水平最高, 而 *SoWRKY10/39/72/73* 的表达峰值出现在 12 h。

3.7 关键酶基因对 MeJA 处理的响应

为了进一步探讨 *SoWRKYs* 在萜醌类物质代谢中的潜在功能, 对代谢途径中的 4 个关键酶基因 3-脱氧-D-阿拉伯庚基磺酸-7-磷酸合成酶基因 (3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid-7-phosphate synthase, *SoDAHPS*)、查耳酮合成酶基因 (chalcone synthase, *SoCHS*)、异分支酸合成酶基因 (isochorismate synthase, *SoICS*) 以及萜钾酸盐合成酶基因

(naphthalate synthetase, *SoMenB*) 的表达水平进行了分析。结果表明 *SoDAHPS* 表现为先降低后升高的整体趋势, 在 6 h 表达量最低, 48 h 表达量最高; *SoCHS* 和 *SoMenB* 表现出了相似的表达模式, 在处理前 6 h 表达水平较低, 随后表达量有所提升。*SoICS* 则表现为波动的变化趋势, 在 12 h 达到最大值 (图 9)。利用微生物云平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 对 *SoWRKYs* 和关键酶基因表达水平进行相关性分析, 结果表明 *SoWRKYs* 和关键酶基因之间具有显著相关性, *SoWRKYs* 与 *SoCHS*、*SoICS*、*SoMenB* 表现为正相关, 而与 *SoDAHPS* 表现为负相关。

4 讨论

药用植物中含有的次生代谢物是其发挥药理

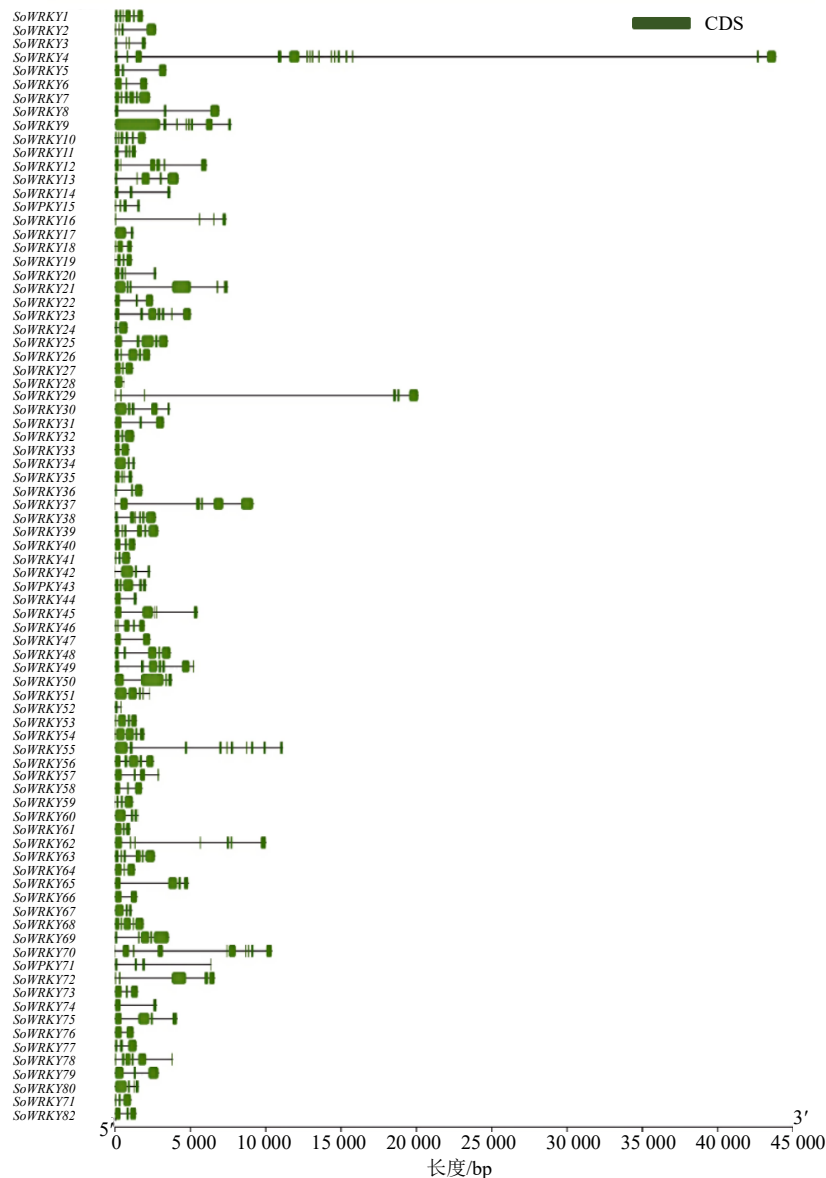


图 4 *SoWRKYs* 基因结构分析

Fig. 4 Gene structure analysis of *SoWRKYs*

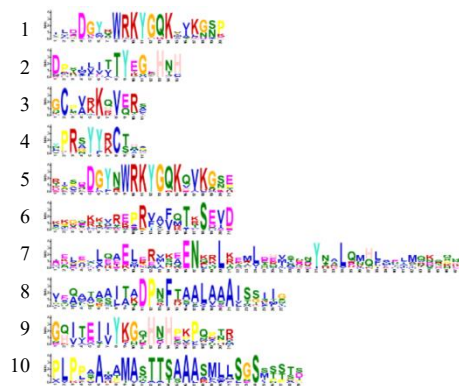


图 5 *SoWRKYs* 保守基序

Fig. 5 Conserved motif sequence of *SoWRKYs*

活性和保健功效的物质基础。转录因子作为一种重要的基因调控元件,能够广泛参与次生代谢物的积累过程。此外,转录因子的表达受到外源激素、生物因子、逆境胁迫等多种因素的影响。本研究首次鉴定了 *SoWRKY* 并对其进行了生物信息学分析,并利用 MeJA 处理初步研究了 *SoWRKYs* 的表达模式,有助于深入了解该基因家族的功能。

SoWRKYs 家族成员其含有多种不同基序, 表明其具有丰富的生物学功能。同一分枝上的 *SoWRKYs* 具有相似的保守基序组成, 不同分枝基序的数量以及分布均有差异, 表明同一分枝上的成员具有类似的功能^[27-28]。保守基序分析表明 Motif 1 具有完整

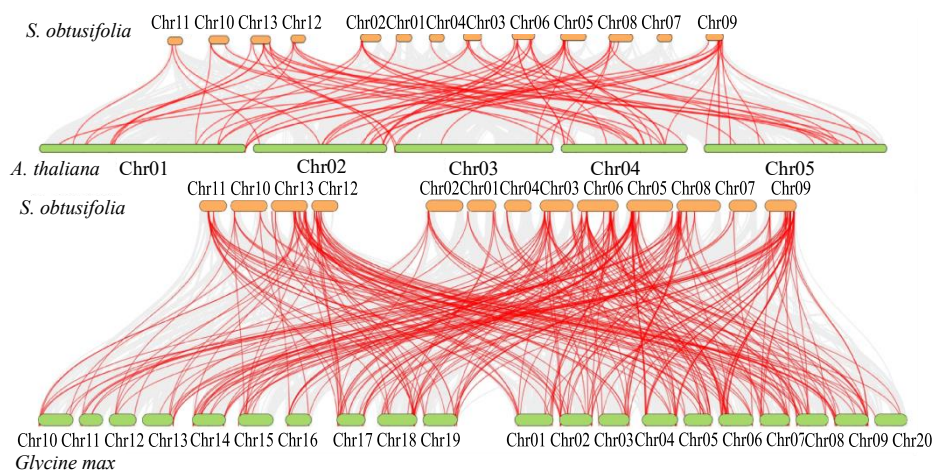
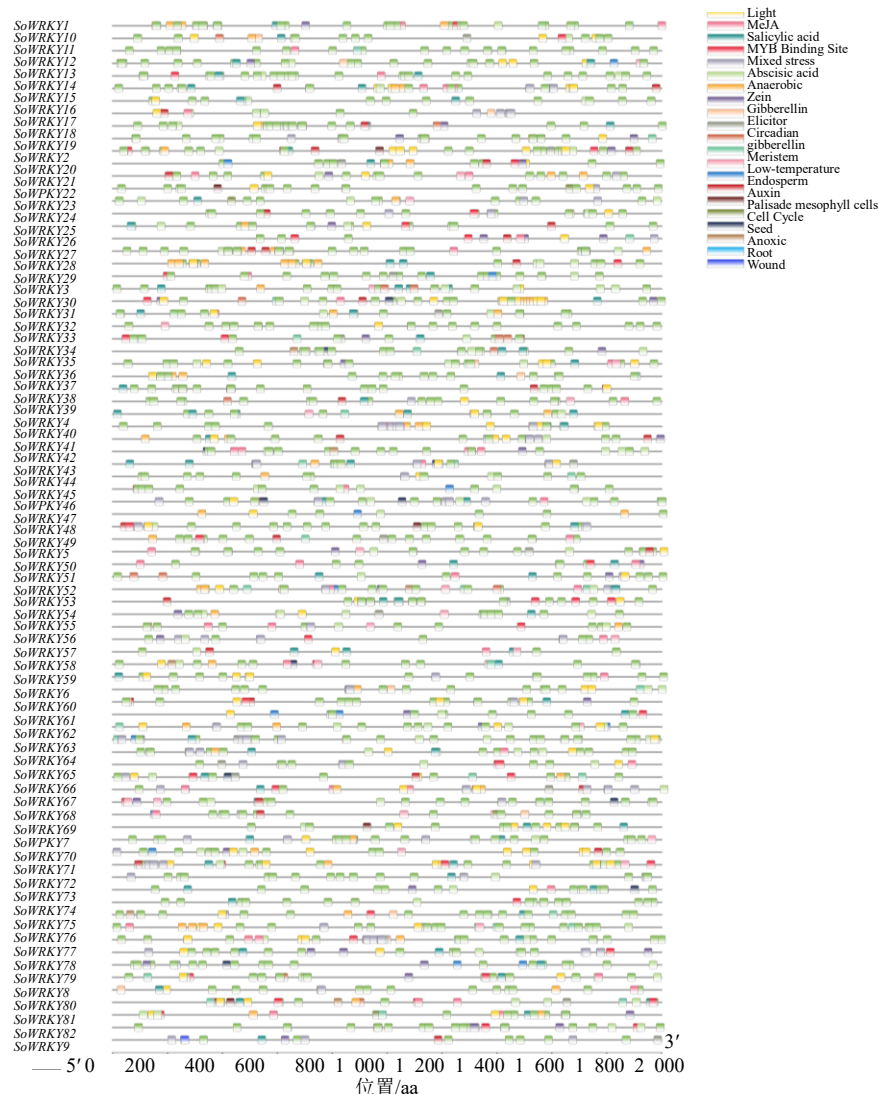


图 6 决明与拟南芥、大豆的共线性分析

Fig. 6 Collinearity analysis between *S. obtusifolia* and *A. thaliana*, and *S. obtusifolia*图 7 *SoWRKYs* 家族成员顺式作用元件分析Fig. 7 Cis-regulatory element analysis of *SoWRKYs*

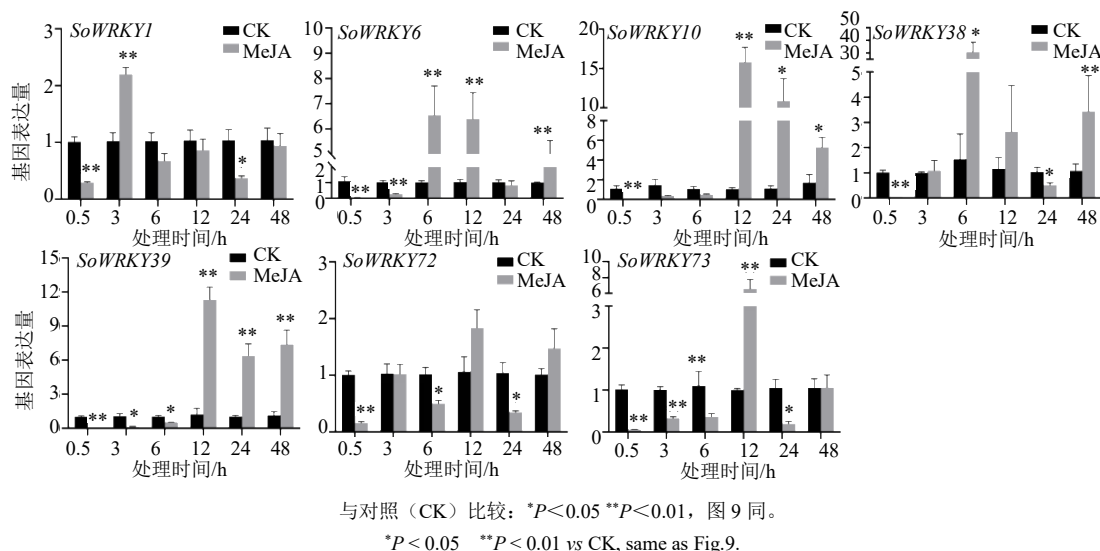


图 8 *SoWRKYs* 在 MeJA 处理下的表达模式

Fig. 8 Expression levels of *SoWRKYs* with MeJA treatment

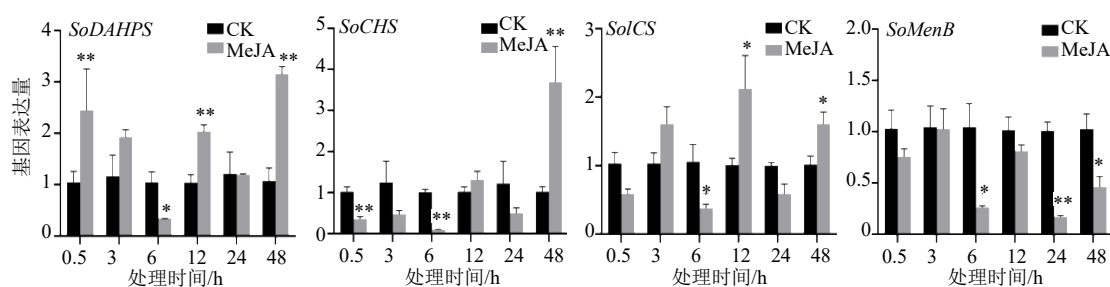


图 9 代谢途径关键酶基因在 MeJA 处理下的表达模式

Fig. 9 Expression pattern of metabolic key enzyme genes with MeJA treatment

的 WRKYGQK 结构域。Motif 5 同样具有七肽结构域, 但仅有部分 *SoWRKYs* 包含 Motif 5, 这表明 *SoWRKYs* 部分成员在进化过程中为适应环境而产生了新的结构域, 蛋白功能也随之发生了变化, 为其家族成员功能多样性奠定了结构基础。

顺式作用元件分析的结果表明 *SoWRKYs* 包含诸如光响应、防御与应激、MeJA 等多种响应元件, 这与长春花^[29]、颠茄^[30]、莲^[31]等的 WRKY 研究结论一致, 表明富含多种响应元件是启动子中普遍存在的特点。MeJA 作为一种重要的植物激素和信号分子, 能够通过调节转录因子的表达进而调控 1 个或多个次生代谢途径相关基因, 最终影响次生代谢物的合成^[12, 32]。本研究中的 7 个 *SoWRKYs* 均能够响应 MeJA, 但响应模式有所不同。例如 *SoWRKY1* 对于 MeJA 响应较快, 在 3 h 表达显著提升, 而 *SoWRKY39* 和 *SoWRKY73* 则在 12 h 显著高表达。与

本研究结果相似, 对马蓝的 WRKY 的研究也表明, 不同的 *BcWRKYs* 对于 MeJA 处理有不同的响应模式。大多数 *BcWRKYs* 在处理 12 h 达到最大值后表现出下降趋势, 而 *BcWRKY1* 在 72 h 又显著上调^[33]。同样, 丹参 *SmWRKYs* 在 MeJA 处理的不同时期表达模式有显著差异, 其对 MeJA 的响应是分阶段逐步完成的, 以便更好的执行其调节丹参酮合成的功能^[12]。

3-脱氧-D-阿拉伯庚基磺酸 7-磷酸合成酶 (3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid-7-phosphate synthase, *DAHPS*)、查耳酮合成酶 (chalcone synthase, *CHS*)、异分支酸合成酶 (isochorismate synthase, *ICS*) 等是决明蒽醌类物质合成上游途径的关键酶^[34-35]。因此, *SoDAHPS*、*SoCHS* 以及 *SoMenB* 基因对于蒽醌类代谢物的合成具有重要作用。相关性分析的结果表明 *SoWRKYs* 与 *SoCHS*、

SoICS 和 *SoMenB* 3 个莽草酸途径中的下游关键酶基因存在正相关, 而与途径中的首个关键酶基因 *SoDAHPS* 表现为负相关。表明 *SoWRKYs* 能够通过不同的调节方式调控代谢途径基因的表达, 从而影响蒽醌类代谢物的积累。胡黄连中的 *PkdWRKY* 和 *PksWRKY* 分别作为正、负调节者来调控胡黄连糖甙的生物合成。*PkdWRKY* 能够通提高代谢途径中 *DXR*、*IPPL*、*PMVK* 的表达, 从而促进胡黄连糖苷的合成, 而 *PksWRKY* 则抑制了相关基因的表达^[36]。Wang 等^[37]对红花石蒜 *WRKY* 的研究也表明, *LrWRKY3/7/21/26/27/28* 能够正向调节花青素合成途径的关键酶基因如 *ANS*、*4CL*、*CHS*、*CHI* 等的表达, 从而参与石蒜花瓣中花青素的合成。Yin 等^[38]对秦艽 *WRKY* 的研究表明 12 个 *GmWRKYs* 参与到了环烯醚萜的生物合成, 其中 *GmWRKY1/6/12/17/33/34/38/39* 能够调节龙胆苦苷的合成, 而 *GmWRKY7/14/26/41* 参与了另一种次生代谢物马前苷酸的合成。

综上所述, 本研究对 *SoWRKYs* 进行了鉴定和生物信息学分析, 并初步探究了 7 个 *SoWRKYs* 对于外源 MeJA 的响应模式, 为后续深入研究家族成员的功能奠定了基础。然而, 目前公布的决明基因组中仍存在未定位基因, 基因注释信息不够完善, 因此对于 *SoWRKYs* 的功能需要通过多种实验进一步验证。

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. 2020: 145.
- [2] 黄和, 李伟叨, 王晖, 等. 决明属药用植物化学成分研究进展 [J]. 中药材, 2020, 43(4): 1020-1026.
- [3] Kim D H, Kim S, Jung W Y, *et al.* The neuroprotective effects of the seeds of *Cassia obtusifolia* on transient cerebral global ischemia in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(7): 1473-1479.
- [4] Jung H A, Ali M Y, Jung H J, *et al.* Inhibitory activities of major anthraquinones and other constituents from *Cassia obtusifolia* against β -secretase and cholinesterases [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 191: 152-160.
- [5] Yang L, Fang S Y, Liu L, *et al.* WRKY transcription factors: Hubs for regulating plant growth and stress responses [J]. *J Integr Plant Biol*, 2025, 67(3): 488-509.
- [6] 罗贵, 朱历勇, 谷雷, 等. WRKY 转录因子调控植物次生代谢物研究进展 [J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2025, 53(3): 115-128.
- [7] Mahiwal S, Pahuja S, Pandey G K. Review: Structural-functional relationship of WRKY transcription factors: Unfolding the role of WRKY in plants [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 257(Pt 2): 128769.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Xiu H, Nuruzzaman M, Guo X Q, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of eight *PgWRKY* genes in *Panax ginseng* responsive to salt and hormones [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3): 319.
- [11] Schluttenhofer C, Yuan L. Regulation of specialized metabolism by WRKY transcription factors [J]. *Plant Physiol*, 2015, 167(2): 295-306.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 李茹芳, 刘世彪, 赵娜, 等. 绞股蓝鲨烯合成酶基因 *GpSSI* 的克隆、序列与表达分析及 MeJA 对其表达的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2713-2720.
- [16] Kang S H, Lee W H, Sim J S, *et al.* *De novo* transcriptome assembly of *Senna occidentalis* sheds light on the anthraquinone biosynthesis pathway [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 12: 773553.
- [17] Rama Reddy N R, Mehta R H, Soni P H, *et al.* Next generation sequencing and transcriptome analysis predicts biosynthetic pathway of sennosides from *Senna (Cassia angustifolia Vahl.)*, a non-model plant with potent laxative properties [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129422.
- [18] Deng Y, Zheng H, Yan Z C, *et al.* Full-length transcriptome survey and expression analysis of *Cassia obtusifolia* to discover putative genes related to auranthio-obtusin biosynthesis, seed formation and development, and stress response [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2476.
- [19] 冯昭, 刘世鹏, 覃洋. 决明 *GRAS* 基因家族全基因组鉴定及其在盐和干旱胁迫条件下的表达分析 [J]. 中国生物工程杂志, 2023, 43(1): 1-17.

- [20] 冯昭, 刘世鹏, 吕蕊花, 等. 决明 *Aux/IAA* 和 *ARF* 基因家族鉴定、表达及蛋白互作分析 [J]. 药学学报, 2024, 59(3): 751-763.
- [21] 冯昭, 覃洋, 刘世鹏, 等. 决明 *GSK* 基因家族全基因组鉴定及其表达分析 [J]. 药学学报, 2023, 58(5): 1383-1394.
- [22] Chen C J, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [23] Xie J M, Chen Y R, Cai G J, *et al.* Tree visualization by one table (tvBOT): A web application for visualizing, modifying and annotating phylogenetic trees [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(W1): W587-W592.
- [24] 杜桥, 唐璟, 李依民, 等. 基于全长转录组测序的掌叶大黄 *GRAS* 基因家族鉴定 [J]. 中草药, 2025, 56(2): 617-625.
- [25] 钟德馨, 方袁梦梦, 郭壮浩, 等. 决明查耳酮合成酶全长基因序列的克隆与分析 [J]. 生物技术通报, 2013, 29(5): 99-104.
- [26] 李关荣, 艾义, 谭燕, 等. 决明异分支酸合酶基因的克隆及表达分析 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2014, 36(9): 1-8.
- [27] Wei S W, Gao L W, Zhang Y D, *et al.* Genome-wide investigation of the NAC transcription factor family in melon (*Cucumis melo* L.) and their expression analysis under salt stress [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(9): 1827-1839.
- [28] 王鹏杰, 陈笛, 林滢, 等. 8 个茶树 *WRKY* 转录因子基因的克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 685-693.
- [29] Yang Z R, Patra B, Li R Z, *et al.* Promoter analysis reveals *cis*-regulatory motifs associated with the expression of the *WRKY* transcription factor *CrWRKY1* in *Catharanthus roseus* [J]. *Planta*, 2013, 238(6): 1039-1049.
- [30] 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.
- [31] Li J, Xiong Y C, Li Y, *et al.* Comprehensive analysis and functional studies of *WRKY* transcription factors in *Nelumbo nucifera* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5006.
- [32] 李莹, 张广辉, 王前, 等. 茉莉酸甲酯对三七叶总黄酮含量及其应答基因表达量的影响 [J]. 中草药, 2023, 54(2): 631-640.
- [33] 郭志英, 李卿, 吴循循, 等. 马蓝 *WRKY* 转录因子家族生物信息学及表达特征分析 [J]. 药学学报, 2022, 57(9): 2864-2875.
- [34] Mao R J, Bai Z Q, Wu J W, *et al.* Transcriptome and HPLC analysis reveal the regulatory mechanisms of aurantio-obtusin in space environment-induced *Senna obtusifolia* lines [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(2): 898.
- [35] Kang S H, Pandey R P, Lee C M, *et al.* Genome-enabled discovery of anthraquinone biosynthesis in *Senna tora* [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5875.
- [36] Sharma T, Kawoosa T, Gahlan P, *et al.* Two light responsive *WRKY* genes exhibit positive and negative correlation with picroside content in *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth, an endangered medicinal herb [J]. *3 Biotech*, 2020, 10(6): 255.
- [37] Wang N, Song G W, Zhang F J, *et al.* Characterization of the *WRKY* gene family related to anthocyanin biosynthesis and the regulation mechanism under drought stress and methyl jasmonate treatment in *Lycoris radiata* [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2423.
- [38] Yin Y, Fu H, Mi F, *et al.* Genomic characterization of *WRKY* transcription factors related to secoiridoid biosynthesis in *Gentiana macrophylla* [J]. *BMC Plant Biol*, 2024, 24(1): 66.

[责任编辑 时圣明]