

## 北柴胡转录因子 *BcWRKY70* 基因鉴定与表达分析

冯飞雪<sup>1</sup>, 吕瑞华<sup>2</sup>, 李依民<sup>3,4\*</sup>, 张明英<sup>3</sup>, 王 凯<sup>1</sup>, 肇玉博<sup>1</sup>, 高 静<sup>3</sup>,  
彭 亮<sup>3</sup>, 张 岗<sup>3,4\*</sup>

(1. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000; 2. 陕西中医药大学医学技术学院, 陕西 咸阳 712046; 3. 陕西中医药大学药学院/陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, 陕西 咸阳 712046; 4. 陕西中医药大学省部共建特色秦药资源研究开发国家重点实验室(培育), 陕西 咸阳 712083)

**摘要:** WRKY 是植物特有的一类转录因子, 参与植物响应多种环境因子及生物胁迫的调控过程。为探究北柴胡 WRKY 家族成员 *WRKY70* 的基因功能, 本研究从北柴胡转录组数据库中克隆到 *BcWRKY70* 基因开放阅读框(ORF), 进行编码氨基酸序列及 DNA 启动子区域生物信息学分析, 并用实时荧光定量 PCR 检测 *BcWRKY70* 在不同组织部位与不同激素处理下的表达模式。结果表明, 北柴胡 *BcWRKY70* 基因 ORF 长 948 bp, 编码 316 个氨基酸, 具有典型的 WRKY 结构域, 不含信号肽, 预测定位在细胞核中; 系统进化分析显示 *BcWRKY70* 与棉花 *GhWRKY70* 亲缘关系最近。 *BcWRKY70* 基因启动子区包含响应干旱、茉莉酸甲酯、脱落酸等环境或激素因子的顺式元件。 qRT-PCR 结果显示 *BcWRKY70* 在北柴胡根中表达量最高, 且能快速应答茉莉酸甲酯和脱落酸的诱导。这些结果为下一步研究 *BcWRKY70* 在北柴胡抗逆中的分子作用机制提供科学依据。

**关键词:** 北柴胡; WRKY 转录因子; 克隆; 表达模式; 启动子区

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)11-3184-06

## Characterization and expression analysis of the transcription factor *BcWRKY70* in *Bupleurum chinense* DC.

FENG Fei-xue<sup>1</sup>, LÜ Rui-hua<sup>2</sup>, LI Yi-min<sup>3,4\*</sup>, ZHANG Ming-ying<sup>3</sup>, WANG Kai<sup>1</sup>, ZHAO Yu-bo<sup>1</sup>,  
GAO Jing<sup>3</sup>, PENG Liang<sup>3</sup>, ZHANG Gang<sup>3,4\*</sup>

(1. Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China; 2. College of Medical Technology, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 3. College of Pharmacy and Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 4. State Key Laboratory of Research and Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation), Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China)

**Abstract:** The plant-specific WRKY transcription factor family is involved in the regulation of the response of plants to various environmental factors and biological stress. To study the role of the *BcWRKY70* gene in *Bupleurum chinense* DC., we cloned the open reading frame (ORF) sequence of the *BcWRKY70* gene based on the transcriptome database. Bioinformatics analysis of *BcWRKY70* and promoter region analysis was carried out, and real-time qRT-PCR was used to detect the expression pattern of *BcWRKY70* in different tissues and under the different hormone treatments. The results show that the *BcWRKY70* ORF is 948 bp in length, encoding 316 amino acids with a typical

收稿日期: 2021-07-05; 修回日期: 2021-08-12.

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划(2019JQ-867); 陕西中医药大学博士科研启动经费(104080001); 陕西中医药大学学科创新团队项目(2019-QN01); 咸阳市中青年科技领军人才项目.

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-29-38185165, E-mail: 2051058@sntcm.edu.cn; jay\_gumling2003@aliyun.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0987

WRKY domain. Phylogenetic analysis showed that *BcWRKY70* is closely related to *GhWRKY70*. Its promoter region contains *cis*-elements that presumably respond to environmental factors such as drought, methyl jasmonic acid (MeJA), and abscisic acid (ABA). qRT-PCR analyses showed that *BcWRKY70* is most highly expressed in roots and can quickly respond to MeJA and ABA induction. This study provides a basis for further research on the molecular mechanism of *BcWRKY70* in *B. chinense* DC. resistance.

**Key words:** *Bupleurum chinense* DC.; WRKY transcription factor; cloning; expression pattern; promoter region

WRKY 是高等植物特有的一类转录因子, 能够调节植物应答干旱、高盐、低温等环境胁迫, 从而参与调节植物的生长发育等生理过程<sup>[1]</sup>。WRKY 转录因子家族成员众多, 其最重要的结构特征是含有约 60 个氨基酸的 WRKY 结构域, 根据高度保守的 WRKYGQK 结构域 C2H2 或 C2HC 型锌指基序类型, 又分为 WRKY I、II、III 亚族, 各自发挥转录调控功能<sup>[2]</sup>。WRKY 转录因子可以特异识别并结合 DNA 序列的 W-box 元件, 从而调控靶基因的转录与表达<sup>[3]</sup>。自红薯 *WRKY* 基因 *SPFI* 首次克隆之后<sup>[4]</sup>, 许多植物的 WRKY 基因纷纷被鉴定, 广泛与植物应答逆境胁迫相关<sup>[5]</sup>。大豆 *WRKY27* 基因能够提高植物的耐寒性, 而大豆 *WRKY54* 基因则在调控植物应答盐胁迫与干旱胁迫中发挥作用<sup>[6]</sup>。拟南芥 *WRKY70* 在病原菌入侵后激活植物免疫激活因子 *SARD1*, 启动植物防御基因的表达<sup>[7]</sup>。*CHYR1* 通过介导 *WRKY70* 磷酸化/非磷酸化控制其与 *SARD1* 顺式元件的结合, 从而作为开关调节免疫和生长之间的平衡<sup>[8]</sup>。

柴胡是伞形科北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *B. scorzoniferifolium* Willd. 的干燥根, 始载于《神农本草经》, 是药用历史悠久的大宗药材, 辛、苦、微寒, 有疏散退热、疏肝解郁的功效<sup>[9]</sup>。现代药理学研究显示, 柴胡主要药效成分为柴胡皂苷、黄酮类及多糖类化合物等, 有抗癌、抗炎、保心护肝等药理功效<sup>[10-12]</sup>。然而北柴胡的研究多集中于活性成分药效机制领域, 关于柴胡皂苷生源合成的转录调控及抗逆分子机制研究鲜有报道<sup>[13]</sup>。

在分析北柴胡转录组<sup>[12]</sup>数据时发现了一条在柴胡根中高表达的 EST 序列, 比对分析显示与拟南芥 *WRKY70* 基因同源性较高, 为了进一步研究该基因在北柴胡逆境应答及柴胡皂苷生源合成中的功能, 本研究克隆该基因 *BcWRKY70*, 进行编码蛋白理化性质、结构、亚细胞定位、系统进化等生物信息学分析, 并用 qRT-PCR 检测不同组织、不同激素处理下基因表达模式, 为后续深入基因功能提供依据。

## 材料与方法

**材料** 北柴胡样品采集于陕西中医药大学药用植

物园, 由陕西中医药大学药学院王继涛高级实验师鉴定为伞形科植物北柴胡 *B. chinense* DC.。收集盛花期时北柴胡植株的根、茎、叶和花组织材料, 液氮速冻、并于 -80 °C 冻存备用。用少量乙醇溶解脱落酸 (abscisic acid, ABA) 和茉莉酸甲酯 (methyl jasmonic acid, MeJA), 分别加水稀释至终浓度为 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。用 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的脱落酸溶液和 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的茉莉酸甲酯溶液喷施萌发 60 d 的北柴胡幼苗叶片, 在处理 0、4、8 和 12 h 后收集叶片, 每个处理 5 株, 液氮速冻后保持。

**试剂** RNA 提取试剂盒 Plant RNA kit (R6827-01)、反转录试剂盒 One step RT-PCR Kit 购自 OMEGA 公司; Plasmid Miniprep kit II (PD1213) 购自 Biomiga EZgene™ 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京百泰克生物技术公司; Universal Genome Walker™ Kit 购自 Clontech 公司; SYBR Green® II Premix Ex Taq™、限制性内切酶 *EcoRV*、*Pvu II*、*Stu I* 和 *Dra I*、pMD19-T simple vector 均购自大连宝生物 (TaKaRa) 公司; 大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  为本实验室保存。

**核酸提取** 采用 RNA 提取试剂盒 Plant RNA kit 和反转录试剂盒 One step RT-PCR kit 完成样品 RNA 提取及反转录, 获得的 cDNA 保存于 -20 °C 冰箱备用。按照改良的 CTAB 法<sup>[14]</sup>提取北柴胡基因组 DNA, 保存于 -20 °C 冰箱备用。

***BcWRKY70* 基因克隆** 根据北柴胡转录组数据库中 EST 序列信息, 设计上下游扩增的特异性引物 (表 1), 以北柴胡 cDNA 为模板, 扩增 *BcWRKY70* ORF 序列。反应程序为 95 °C 变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 55 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经胶回收与 pMD19-T simple vector 连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 阳性克隆送至北京擎科生物科技有限公司测序。

***BcWRKY70* 启动子区克隆及序列分析** 按照 Universal Genome Walker™ Kit 操作说明, 用“DNA-walking”方法克隆启动子区。用限制性内切酶 *EcoRV*、*Pvu II*、*Stu I* 和 *Dra I* 消化北柴胡基因组 DNA, 将得到的酶切反应物与基因组步移接头相连, 即构建北柴胡基因组 DNA 步移文库。根据北柴胡 *BcWRKY70* 基因序列设计步移引物 pWRKY70-GSP1 和 pWRKY70-

**Table 1** Primer sequences used for PCR analysis

| Name             | Primer sequences (5'-3')               |
|------------------|--|
| BcWRKY70-F       | GAAAACCTTTTGGTAAAGT                    |
| BcWRKY70-R       | CGTAATGTTAGGTAATATCATG                 |
| AP1              | GTAATACGACTCACTATAGGGC                 |
| AP2              | ACTATAGGGCACGAGTGGT                    |
| pWRKY70-GSP1     | GCACGGAAGCATCTTGACTGAAGCATAC           |
| pWRKY70-GSP2     | GTAGTTCTCGTTTCATTAGATTCAGGAGG<br>TAGCA |
| $\beta$ -ACTIN-F | TGCCCGATGGTCAAGTTATC                   |
| $\beta$ -ACTIN-R | GGATTCTGCAGCTTCCATTC                   |
| qWRKY70F         | TACATCAAGGTACTTCTCAGT                  |
| qWRKY70R         | CAGGATGGACGTTGGACGC                    |

GSP2, 分别和接头引物 AP1、AP2 进行两轮巢式 PCR 反应。反应程序为 95 °C 变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 120 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。将所得 PCR 反应产物进行测序。利用在线工具 Plant-CARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 对 *BcWRKY70* 基因启动子区的顺式作用元件进行分析。

***BcWRKY70* 基因生物信息学分析** 用 DNAMAN 分析 *BcWRKY70* 基因编码氨基酸序列理化性质。利用在线工具 Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/>) 进行氨基酸序列的同源性比对; 信号肽及跨膜结构域用 Signal P 和 TMHMM 进行分析; 利用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 分析预测蛋白质的二级、三级结构。运用 MEGA 7.0 软件采用邻接法 (neighbour-joining) 构建植物 WRKY 蛋白进化树。

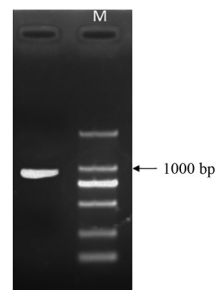
***BcWRKY70* 基因的表达模式分析** 以北柴胡根、茎、叶、花, ABA 和 MeJA 处理不同时间点的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应, 以  $\beta$ -actin 基因为内参, 检测不同样本中北柴胡 *BcWRKY70* 基因的表达量。反应体系为 20  $\mu$ L, 包含 10  $\mu$ L SYBR Green® II Premix Ex Taq™、5  $\mu$ L 稀释 50 倍的 cDNA 模板、3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O 以及待扩增基因上下游引物各 1  $\mu$ L (10 mmol·L<sup>-1</sup>); 反应条件为 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 反应 1 min, 循环 40 次。同时绘制熔解曲线, 包括不加模板的对照在内, 所有 qRT-PCR 反应就技术重复和实验重复各 3 次, 利用 Step One Plus® Real-Time (Applied Biosystems, US) 进行 qRT-PCR 检测, 用 2<sup>- $\Delta\Delta Ct$</sup>  法<sup>[15]</sup> 对实验数据进行处理。

## 结果与分析

### 1 *BcWRKY70* 基因的克隆

根据北柴胡转录组数据库中的序列信息, 采用扩增引物对 *BcWRKY70-F/BcWRKY70-R* 对北柴胡 cDNA 模板进行 PCR 扩增。电泳检测可见一条约为 1 000 bp

条带 (图 1)。经过切胶回收、连接 T 载体、转化大肠杆菌、测序后, 获得北柴胡 *BcWRKY70* 基因开放阅读框序列 (GenBank 登录号 MT235144)。

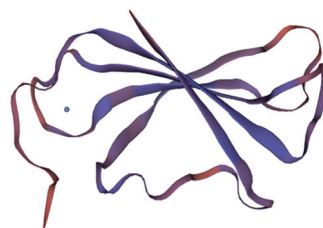


**Figure 1** PCR product of *BcWRKY70* ORF. The left lane shows the amplified PCR product; M: DNA Ladder DL 2000

### 2 *BcWRKY70* 编码蛋白理化性质分析

*BcWRKY70* 基因 ORF 948 bp, 编码 316 个氨基酸。预测编码蛋白分子质量为 36.03 kDa, 等电点为 8.13。该蛋白质含有 34 个碱性氨基酸 (10.76%), 出现频率最高的氨基酸为丝氨酸 (10.13%)、天冬氨酸 (8.23%) 和赖氨酸 (7.28%), 含有 125 个疏水性氨基酸和 82 个极性氨基酸, 蛋白质带正电荷。*BcWRKY70* 含有 1 个 WRKY 结构域, C 端含有 C2HC 结构, 属于 WRKY III 类亚族成员。二级结构预测显示, *BcWRKY70* 蛋白有 70.21% 无规卷曲、17.6%  $\alpha$ -螺旋、7.49%  $\beta$  转角和 4.7%  $\beta$  片层组成。预测蛋白的稳定指数 (stability index (II)) 为 44.18, 提示其属于不稳定蛋白。Signal P 4.1 预测显示 *BcWRKY70* 蛋白无信号肽结构, 属于非分泌蛋白。亚细胞定位结果显示, *BcWRKY70* 蛋白定位于细胞核内。

以拟南芥 AtWRKY1 (PDB ID: 2ayd.1) A 链为模板<sup>[16]</sup>, 利用 SWISS-MODEL 进行三维建模。预测显示, *BcWRKY70* 由  $\beta$  片层折叠包围形成的空间可以与 DNA 或者二价金属离子结合 (图 2)。



**Figure 2** Three-dimensional structure of deduced *BcWRKY70* protein by SWISS-MODEL

### 3 *BcWRKY70* 基因 5' 侧翼区顺式作用元件分析

采用“DNA-walking”方法克隆获得 *BcWRKY70* 基因 5' 侧翼区, 长 1 589 bp, 其中, ATG 上游 +56 bp 处为预测的转录起始位点。PlantCARE 分析 5' 侧翼区结果显

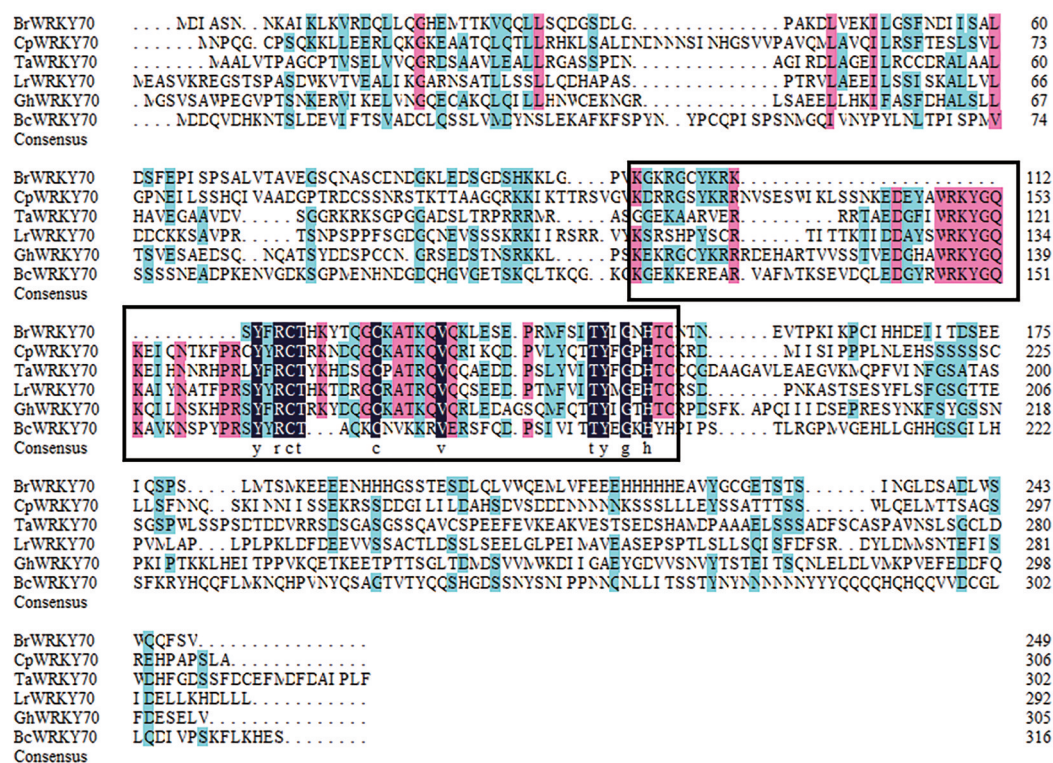
示,除了常规启动子元件之外,*BcWRKY70*启动子区含有大量与环境、生长调节相关的作用元件(表3),如脱落酸反应元件ABRE、茉莉酸甲酯反应元件TGACG-motif和CGTCA-motif、低温响应元件LTR、参与干旱诱导反应的MYB结合位点ARE以及防御和应激反应中的顺式作用元件TC-rich repeats。这些元件说明*BcWRKY70*可能与响应环境和激素相关。

#### 4 *BcWRKY70* 基因多序列比对与进化树分析

利用DNAMAN对*BcWRKY70*和其他已报道WRKY70蛋白之间进行多序列比对(图3)。结果显示,*BcWRKY70*蛋白与芜菁(*Brassica rapa*, XM\_009105752)、牛角瓜(*Calotropis procera*, MN105122)、岷江百合(*Lilium regale*, MG149587)、小麦(*Triticum aestivum*, KY784578)的WRKY70蛋白同源性分别为

**Table 3** *cis*-Elements analyses in *BcWRKY70* 5'-flanking region

| <i>cis</i> -Element | Site   | Sequence     | Function   |
|---------------------|--------|--------------|--|
| ABRE                | -1 354 | ACGTG        | ABA responsive                                       |
| TGACG-motif         | -877   | TGACG        | MeJA responsive                                      |
| 3-AF3 binding site  | +838   | CACTATCTAAC  | Part of conserved array module (CAM3)                |
| LTR                 | -1 126 | CCGAAA       | Low temperature responsive                           |
| ARE                 | -147   | AAACCA       | Anaerobic induced                                    |
| MBS                 | +157   | CAACTG       | Drought induced MYB binding site                     |
| TC-rich repeats     | +1 365 | GTTTTCTTAC   | <i>cis</i> -element in defense and stress process    |
| LAMP                | -330   | CTTTATCA     | Light responsive                                     |
| CGTCA-motif         | +877   | CGTCA        | MeJA responsive                                      |
| O2-site             | +895   | GATGATGTGG   | <i>cis</i> -element in regulation on Zein metabolism |
| AuxRR-core          | +770   | GGTCCAT      | Auxin responsive                                     |
| CAT-box             | -881   | GCCACT       | <i>cis</i> -element related to meristem expression   |
| TGA-box             | -1 082 | AACGAC       | Auxin responsive                                     |
| Chs-CMA1a           | +214   | TTACTTAA     | Light responsive                                     |
| Gc-motif            | -742   | CCCCCG       | Enhancer involved in hypoxia specific induction      |
| AT-rich element     | +1 280 | ATAGAAATCAA  | AT-rich DNA binding protein ATBP-1 binding site      |
| Chs-CMA2b           | -1 199 | GAACCTACACAC | Light responsive                                     |
| Box III             | -1 063 | ATCATTTCAC   | Protein binding site                                 |
| Sp1                 | +1 547 | GGGCGG       | Light responsive                                     |
| TGA-box             | +216   | TGACGTAA     | Auxin responsive                                     |
| G-box               | +1 231 | TACGTG       | Light responsive                                     |



**Figure 3** The sequence alignment of *BcWRKY70* and other WRKY70 homologues WRKY conserved domains were boxed

86.8%、85%、82.5% 和 82.1%，表明 *BcWRKY70* 蛋白在植物中高度保守。

利用 MEGA 7.0 软件，采用邻接法构建 *BcWRKY70* 蛋白与其他已报道 13 种植物的 WRKY70 蛋白的进化树。结果显示 (图 4)，*BcWRKY70* 蛋白与棉花 *GhWRKY70* 蛋白聚为一支。

### 5 *BcWRKY70* 基因表达模式分析

运用 qRT-PCR 检测 *BcWRKY70* 基因在不同组织部位中的表达量，结果显示，*BcWRKY70* 在北柴胡根、茎、叶和花中均有表达，根中表达量最高，且与其他部位的表达量差异显著 (图 5A)；*BcWRKY70* 受到 MeJA 和 ABA 处理强烈诱导 (图 5B、5C)，表明 *BcWRKY70* 基因参与北柴胡激素应答反应。

### 讨论

近年来药用植物基因组学发展迅速，国内外已经开展青蒿、丹参、西洋参、甘草、人参、三七等多种药用植物的大规模转录组与基因组测序研究。目前，赤芝、杜仲、人参、黄芩、铁皮石斛等重要药用植物基因组先后公布<sup>[17]</sup>，为药用植物活性成分合成途径解析及分子辅助育种提供重要基础，同时也急需对这些基因组展开精细化的功能基因组学研究。

北柴胡功能基因研究方面，柴胡皂苷合成关键酶基因环阿屯醇合酶和鲨烯合酶<sup>[18,19]</sup>、MeJA 响应转录因子以及成花基因 *BcSVP*、*BcPAF1*、*BcCO*、*BcFT*<sup>[20]</sup> 已有报道，

为北柴胡中与柴胡皂苷合成以及发育过程基因鉴定提供基础。本课题组在分析北柴胡转录组时，发现一条根中高表达的 EST 序列与拟南芥 *WRKY70* 同源性最高，鉴于拟南芥 *WRKY70* 在应答病原菌入侵后防御过程中的重要作用<sup>[7,8]</sup>，推测该 EST 在北柴胡抗逆过程发挥重要作用。因此，本研究克隆 *BcWRKY70* 基因。*BcWRKY70* 属于 WRKY 家族 III 类亚家族成员，预测定位于细胞核内，与 *GhWRKY70* 亲缘关系最近，且与陆地棉 *GhWRKY70* 蛋白特征<sup>[21]</sup> 相似。*BcWRKY70* 基因在根中表达量高，推测其可能在根中发挥重要的调控功能。

为进一步分析 *BcWRKY70* 的调控元件，本研究采用 DNA walking 获得 *BcWRKY70* 基因 5' 侧翼区，分析发现该区域共含有 21 个顺式作用元件，包含调节发育、应答环境因子、响应 ABA 和 MeJA 的顺式作用元件以及与 MYB 转录因子结合的位点，提示 *BcWRKY70* 基因可能参与胁迫应答或者激素响应，并且可能会与 MYB 转录因子结合并受其调控。进一步的 qRT-PCR 结果显示 *BcWRKY70* 基因受脱落酸与茉莉酸甲酯的显著诱导，与启动子区域作用元件分析结果相互支持。*BcWRKY70* 基因在根中表达量最高，而根中是柴胡皂苷的积累部位，提示 *BcWRKY70* 基因可能参与柴胡皂苷的生物合成。这些结果显示北柴胡 *BcWRKY70* 基因可能在激素间协同、逆境胁迫以及柴胡皂苷合成等方面发挥作用。

大量研究表明 *WRKY* 基因响应多种植物激素，例

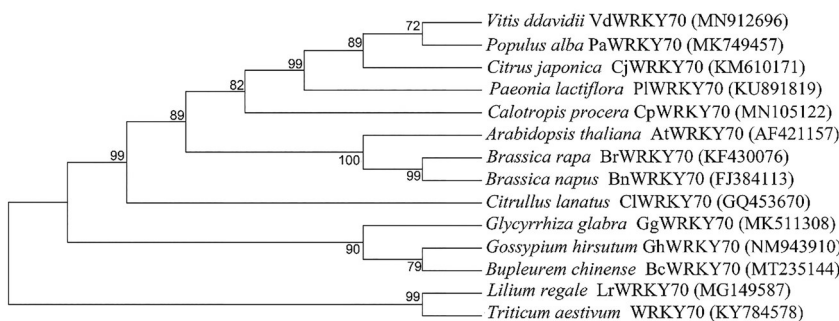


Figure 4 Neighbour-joining phylogenetic tree of the WRKY70 protein sequences in plants

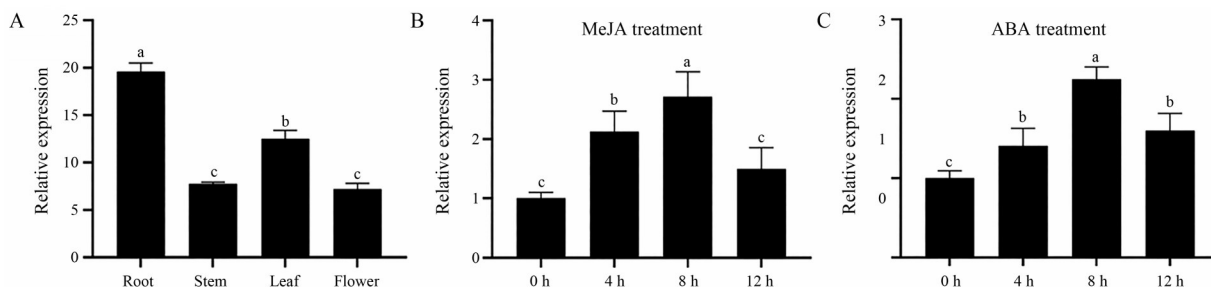


Figure 5 The expression patterns of *BcWRKY70* in different tissues and under MeJA and ABA treatments. Small letters a, b, c, d represent difference between groups

如乙烯、水杨酸、赤霉素、茉莉酸或脱落酸等, 从而发挥其调控功能<sup>[22]</sup>。茉莉酸在植物抗病虫防御及逆境反应中具有重要的生理功能<sup>[23]</sup>。植物遭受干旱、高盐等逆境胁迫时, 通过 ABA 信号转导, 调节气孔关闭, 减少水分损失, 抵御干旱和盐害, 并且诱导多种基因表达与生理反应, 抵御胁迫<sup>[24]</sup>。本研究结果显示 *BcWRKY70* 基因受 MeJA、ABA 诱导, 表明该基因可能通过茉莉酸与脱落酸信号途径参与北柴胡抗逆反应, 具体作用机制尚待进一步研究。

**作者贡献:** 第一作者冯飞雪完成相关实验及论文撰写工作; 通讯作者张岗、李依民负责设计、指导实验及论文修改; 吕瑞华、高静、张明英参与实验及数据分析; 王凯、肇玉博、彭亮参与数据分析及对论文的修改。

**利益冲突:** 无任何利益冲突。

## References

- Agarwal P, Reddy MP, Chikara J. WRKY: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 3883-3896.
- Zhang Y, Wang L. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants [J]. *BMC Evol Biol*, 2005, 5: 1.
- Brand LH, Fischer NM, Harter K, et al. Elucidating the evolutionary conserved DNA-binding specificities of WRKY transcription factors by molecular dynamics and *in vitro* binding assays [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 9764-9778.
- 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: 563-571.
- Zhan ZG. Advances in biosynthesis and regulation of the active ingredient of *Salvia miltiorrhiza* based on multi-omics approach [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2892-2903.
- Yin G, Xu H, Xiao S, et al. The large soybean (*Glycine max*) WRKY TF family expanded by segmental duplication events and subsequent divergent selection among subgroups [J]. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 148.
- Zhou M, Lu Y, Bethke G, et al. *WRKY70* prevents axenic activation of plant immunity by direct repression of *SARD1* [J]. *New Phytol*, 2018, 217: 700-712.
- Liu H, Liu B, Lou S, et al. *CHYR1* ubiquitinates the phosphorylated *WRKY70* for degradation to balance immunity in *Arabidopsis thaliana* [J]. *New Phytol*, 2021, 230: 1095-1109.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 293.
- Wu D, Gao Y, Xiang H, et al. Exploration into mechanism of antidepressant of *Bupleuri Radix* based on network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 210-219.
- Xie WN, Peng HB, Li Y, et al. Liver with liver stagnation and spleen deficiency syndrome and intestinal microflora [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2021, 27: 129-137.
- Sui C, Zhang J, Wei J, et al. Transcriptome analysis of *Bupleurum chinense* focusing on genes involved in the biosynthesis of saikosaponins [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 539.
- Han WJ, Xu J, Zhu CR, et al. Gene cloning and prokaryotic expression of transcription factor BcZIP179 from *Bupleurum chinense* DC. [J]. *World Sci Technol Mod Chin Med (世界科学技术-中医药现代化)*, 2020, 22: 3116-3121.
- Allen GC, Flores-Vergara MA, Krasynanski S, et al. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1: 2320-2325.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: e45.
- Duan MR, Nan J, Liang YH, et al. DNA binding mechanism revealed by high resolution crystal structure of *Arabidopsis thaliana* WRKY1 protein [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: 1145-1154.
- Chen SL, Song JY, Sun C, et al. Herbal genomics: examining the biology of traditional medicines [J]. *Science*, 2015, 347: S27-S29.
- Li JC, Qi WT, Wang C, et al. Full-length clone and expression analysis of CAS gene in *Bupleurum chinense* DC. [J]. *Mol Plant Breed (分子植物育种)*, 2021, 19: 2899-2905.
- Sui C, Wei JH, Zhan QQ, et al. Cloning and sequence analysis of squalene synthase gene and cDNA in *Bupleurum chinense* DC. [J]. *Acta Hort Sin (园艺学报)*, 2010, 37: 283-290.
- Li M, Zhang QF, Pu GB, et al. Cloning and spatio-temporal expression analysis of flowering genes in *Bupleurum chinense* DC. [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1188-1196.
- Liu DM, Lou XY, Yu Y. Cloning and expressing analysis of transcription factor GhWRKY70 in upland cotton [J]. *Southwest China J Agric Sci (西南农业学报)*, 2019, 32: 967-972.
- Sun SH, Yu DQ. WRKY transcription factors in regulation of stress response in plant [J]. *Biotechnol Bull (生物技术通报)*, 2016, 32: 66-76.
- Dai YJ, Luo XF, Zhou WG, et al. Plant systemic signaling under biotic and abiotic stressed conditions [J]. *Chin Bull Bot (植物学报)*, 2019, 54: 255-264.
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17: 3470-3488.