

## 马蓝 WRKY 转录因子家族生物信息学及表达特征分析

郭志英<sup>1,2</sup>, 李 卿<sup>4</sup>, 吴循循<sup>3</sup>, 陈军峰<sup>5</sup>, 黄玉香<sup>6</sup>, 马晓娟<sup>7</sup>, 刁 勇<sup>3\*</sup>, 张 磊<sup>2\*</sup>

(1. 福建技术师范学院食品与生物工程学院, 福建 福清 350300; 2. 中国人民解放军海军军医大学药学院, 上海 200433; 3. 华侨大学医学院, 福建 泉州 362021; 4. 中国人民解放军海军军医大学第二附属医院药剂科, 上海 200003; 5. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203; 6. 泉州医学高等专科学校药学院, 福建 泉州 362000; 7. 泉州市农业科学研究所, 福建 泉州 362212)

**摘要:** WRKY 转录因子是植物中一类保守的转录因子, 在植物生长发育和次生代谢过程中发挥重要的调控作用。本研究对马蓝 (*Baphicacanthus cusia*) 不同组织 (根、茎和叶) 的转录组数据进行分析, 共鉴定了 65 个马蓝 WRKY (BcWRKY) 家族成员。其编码氨基酸长度约为 221~706 aa, 等电点为 4.68~9.68, 分子质量为 25 711.8~75 475 Da, 二级结构主要为无规则卷曲, 亚细胞定位预测显示多数 BcWRKYs 定位在细胞核中。系统进化分析将其分为 3 大族, 其中第二大族 (Group II) 又可分为 5 个亚族 (Group IIa、Group IIb、Group IIc、Group IId 和 Group IIE)。结构域分析显示 BcWRKY 均含有高度保守的 WRKYGQK 基序。利用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 对马蓝根、茎和叶中高表达的 10 个 WRKY 基因进行检测, 发现均可响应脱落酸 (abscisic acid, ABA)、茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 和水杨酸 (salicylic acid, SA) 的诱导。本研究为进一步阐明马蓝中吲哚生物碱生物合成中 WRKY 转录因子的分子机制提供基础。

**关键词:** 马蓝; WRKY 转录因子; 生物信息学; 表达分析; 吲哚生物碱

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)09-2864-12

## Bioinformatics and expressional analysis of WRKY transcription factor family in *Baphicacanthus cusia*

GUO Zhi-ying<sup>1,2</sup>, LI Qing<sup>4</sup>, WU Xun-xun<sup>3</sup>, CHEN Jun-feng<sup>5</sup>, HUANG Yu-xiang<sup>6</sup>, MA Xiao-juan<sup>7</sup>, DIAO Yong<sup>3\*</sup>, ZHANG Lei<sup>2\*</sup>

(1. School of Food and Bioengineering, Fujian Polytechnic Normal University, Fuqing 350300, China; 2. School of Pharmacy, Navy Medical University, Shanghai 200433, China; 3. School of Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China; 4. Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200003, China; 5. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 6. School of Pharmacy, Quanzhou Medical College, Quanzhou 362000, China; 7. Quanzhou Institute of Agricultural Sciences, Quanzhou 362212, China)

**Abstract:** WRKY, a class of conserved transcription factors in plants, plays important roles in plant growth, development and secondary metabolism. In the present study, 65 WRKY members were identified from *de novo* transcriptome sequencing data of three different tissues (root, stems and leaves) of *Baphicacanthus cusia*. BcWRKY proteins contained from 221 to 706 amino acids and the isoelectric point is from 4.68 to 9.68. Molecular

收稿日期: 2022-04-14; 修回日期: 2022-05-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82003903); 福建省自然科学基金资助项目 (2020J05243); 福建省教育厅中青年教师教育科研项目 (JAT190483); 福建省重大科技专项专题项目 (2020NZ010008); 泉州市科技计划项目 (2019N031).

\*通讯作者 Tel: 86-595-22692516, E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn;

Tel: 86-021-81871307, E-mail: zhanglei@smmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0433

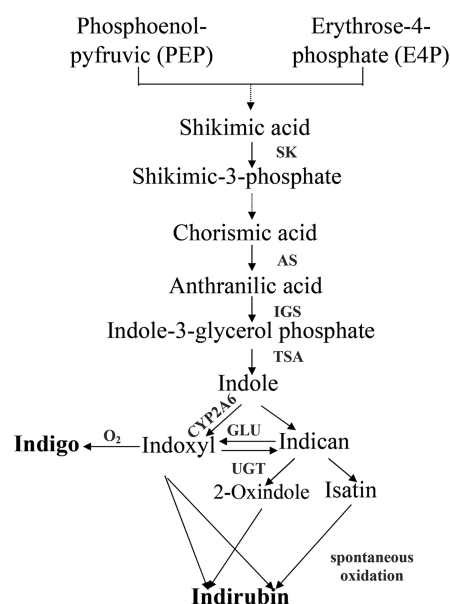
weights range from 25 711.8 to 75 475 Da. The main secondary structures of BcWRKYs protein are random coil. A subcellular localization prediction indicated that the putative BcWRKY proteins were enriched in the nuclear region. Phylogenetic analysis showed that BcWRKYs could be categorized into three groups and five subgroups (Group IIa, Group IIb, Group IIc, Group IId and Group IIe) in Group II. Structural analysis found that all BcWRKY proteins contained a highly conserved motif WRKYGQK. Finally, the transcriptional profiles of ten *BcWRKY* genes highly expressed in root, stem and leaf tissues under abscisic acid (ABA), methyl jasmonate (MeJA), or salicylic acid (SA) treatment were systematically investigated using qRT-PCR analysis. Results showed that a total of ten *BcWRKY* genes were differentially expressed in response to ABA, MeJA, and SA treatment. This work would be provided a basis for further elucidating the molecular mechanism of WRKY transcription factors in the biosynthesis of indole alkaloids in *B. cusia*.

**Key words:** *Baphicacanthus cusia*; WRKY transcription factor; bioinformatics; expression analysis; indole alkaloid

马蓝 (*Baphicacanthus cusia*) 是重要的爵床科多年生草本药用植物, 广泛分布于我国西南、华南及华东地区。马蓝的根入药称南板蓝根, 叶入药为大青叶, 常用于治疗病毒性肝炎、流感、感冒、肺炎、炎症、疱疹、丹毒、蛇咬伤等<sup>[1]</sup>。由其茎和叶加工而成的青黛, 以福建产品品质最佳, 被誉为“建青黛”, 是福建地道药材, 具有清热解毒、凉血、定惊之功效<sup>[2-3]</sup>。以靛蓝、靛玉红为代表的吲哚生物碱是青黛的主要活性成分, 其中靛玉红具有显著抗肿瘤活性<sup>[4,5]</sup>。黄黛片和当归龙荟丸是治疗白血病的两个经典复方, 青黛是复方中的重要组成部分, 药理研究表明复方中治疗白血病的主要活性成分就是来自青黛中的靛玉红<sup>[6-8]</sup>。

吲哚生物碱生物合成如图 1: 莽草酸 (shikimic acid) 经过多步反应形成分支酸 (chorismic acid), 分支酸在邻氨基苯甲酸合成酶 (anthranilate synthase, AS) 作用下形成邻氨基苯甲酸 (anthranilic acid) 后, 由吲哚-3-甘油磷酸合酶 (indole-3-glycerol phosphate synthase, IGS) 作用形成吲哚-3-甘油磷酸 (indole-3-glycerol phosphate), 在色氨酸合成酶  $\alpha$  亚基 (tryptophan synthase  $\alpha$ , TSA) 作用下形成吲哚 (indole)<sup>[9,10]</sup>。吲哚经不同羟基化酶催化分别在 2-位或 3-位发生羟基化反应, 然后再经糖基化或氧化生成吲哚苷 (indican), 吲哚苷在  $\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -glucosidase, GLU) 的作用下生成吲哚酚 (indoxyl)。吲哚酚不稳定容易转化成为靛红 (isatin)。在氧气存在的条件下, 吲哚酚或靛红自发二聚化反应生成靛蓝 (indigo) 和靛玉红 (indirubin)<sup>[11]</sup>。由于吲哚苷、吲哚酚极其不稳定, 催化靛蓝、靛玉红生物合成极其复杂, 因此通过途径基因对吲哚生物碱进行次生代谢工程有很大的难度。

WRKY 是植物中最大的转录因子家族之一, 具有高度保守的 WRKYGQK 氨基酸序列、C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 或 C<sub>2</sub>HC 锌指结构特征<sup>[12]</sup>。近年来大量研究表明 WRKY 通过调



**Figure 1** Schematic representation of the biosynthetic pathway for indole alkaloids

节代谢物生物合成途径关键酶基因的表达水平促进次生代谢产物的合成。日本黄连 (*Coptis japonica*) 中 *CjWRKY1* 通过结合途径基因 (*CYP80B2*、*4'OMT* 和 *CYP719A1*) 顺式作用元件调控小檗碱合成途径基因的表达, 影响小檗碱生物合成<sup>[13]</sup>。在加利福尼亚罂粟 (*Eschscholzia californica*) 中异源表达拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *AtWRKY1* 能够影响血根碱和白屈菜玉红碱的积累<sup>[14]</sup>。此外, 长春花 (*Catharanthus roseus*) 毛状根中过表达 *CrWRKY1* 能够上调萜类吲哚生物碱生物合成途径几个关键途径基因的表达水平, 影响萜类吲哚生物碱的生物合成<sup>[15]</sup>。截至目前, 马蓝中 WRKY 转录因子的系统研究暂未见报道。本研究认为 WRKY 转录因子在马蓝吲哚生物碱的代谢调控过程中具有同

样重要的研究价值。因此,本研究基于马蓝根、茎和叶不同组织的转录组测序结果,对马蓝转录组数据库中的序列进行生物信息学分析,共鉴定出65个马蓝WRKY (BcWRKY) 转录因子,利用生物信息学方法对编码的氨基酸基本理化性质、亚细胞定位、蛋白质二级结构、系统进化、表达模式等方面进行分析,旨在为揭示其在马蓝吲哚生物碱次生代谢方面所发挥的作用提供参考依据(图2)。

## 材料与方法

**植物材料生长与激素处理** 选取福建省莆田市仙游县书峰乡一马蓝种植示范田(25°25'N 118°39'E)种植的马蓝,经中国人民解放军海军军医大学生药教研室张汉明教授鉴定为爵床科马蓝(*B. cusia*)。选取其根、茎和叶3个器官(每个组织3个生物学重复)共9个样品使用Illumina HiSeq 2500高通量测序平台进行转录组测序。选取一定数量的未开花马蓝植株,地上部分分别喷洒100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的脱落酸(abscisic acid, ABA)、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)和100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水杨酸(salicylic acid, SA)(辅以黑色塑料袋避光保湿),处理后分别于0、1、2、4、6、8、12、16、24、36、48和72 h收取马蓝叶片,立即投入液氮速冻,于-80 °C保存备用(3个生物学重复)。

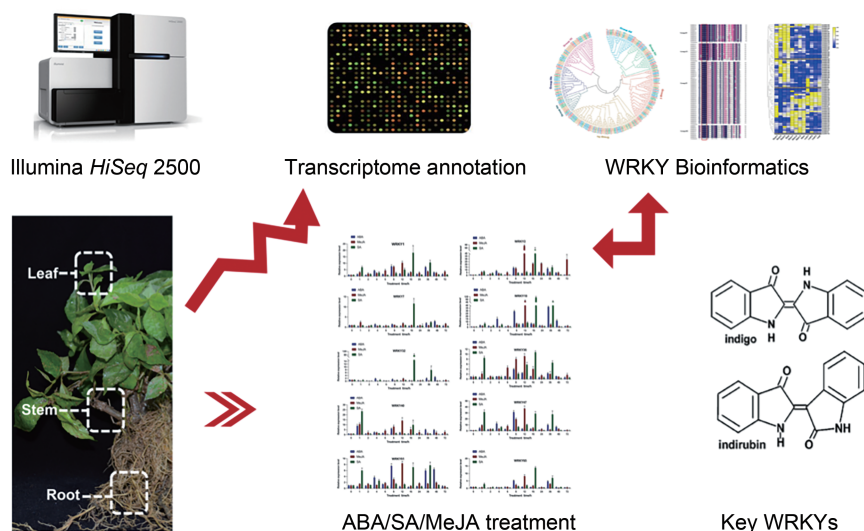
**马蓝WRKY基因的鉴定** 以WRKY转录因子高度保守的WRKYGQK七肽为查询序列,在马蓝转录组数据中搜索WRKY转录因子家族序列,得到大量含疑似WRKY结构域的蛋白序列;为保证获得的WRKY转录因子信息的准确性,将已鉴定含有WRKY保守结构域的蛋白序列在NCBI保守域数据库(NCBI Con-

served Domain Database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)中进行保守域分析,进一步鉴定具有WRKY功能域的蛋白序列。通过Vector NTI Advance 11软件对WRKY基因序列的完整性分析进行,删除不完整的序列;将具有完整开放阅读框(open reading frame, ORF)的序列翻译成氨基酸序列,利用功能域在线预测软件SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行保守结构域的验证。

**马蓝WRKY蛋白序列特征分析** 利用在线软件ExPASy Proteomics Server (<http://web.expasy.org/prot-param/>)对65条完整WRKY氨基酸序列进行蛋白质一级结构的理化特征分析。二级结构特征以在线软件SOPMA ([https://npsaprabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsasopma.html](https://npsaprabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsasopma.html))进行预测。WRKY蛋白的亚细胞定位采用在线软件PSORT (<http://www.genscript.com/psort.html>)进行预测,信号肽采用在线软件seqNLS (<http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/>)进行预测。采用在线软件MEME version 4.11.1 (<http://meme-suite.org/tools/meme>)进行保守结构域分析。

**进化分析** 从NCBI数据库中下载拟南芥、长春花和丹参(*Salvia miltiorrhiza*) WRKY完整的氨基酸序列用于进化分析。通过DNAMAN软件,分析马蓝不同族WRKY蛋白结构域之间的同源性和相似度。采用MEGA5.0软件的Neighbor-Joining算法构建进化树,条件为: position correction和pairwise deletion,使用1 000 bootstrap分析计算各节点支持率。

**BcWRKYs表达分析** 利用TransZol Up Plus RNA Kit试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)提取上述ABA、MeJA和SA诱导的马蓝材料的总RNA。用1%



**Figure 2** Screening of key WRKY transcription factors regulating indole alkaloid biosynthesis in *B. cusia* by bioinformatics and expression analysis

琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整度, 同时用 Nano-Drop 2000C 上测定 RNA 纯度。质量符合要求的 RNA 用 *TransScript* First-Strand cDNA Synthesis Supermix 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司) 进行 cDNA 第一链的合成。通过在线网站 primer 3 设计马蓝不同组织部位高表达 *BcWRKYs* 转录因子和 18S 内参基因<sup>[16]</sup>跨内含子的定量 PCR 引物, 具体序列如表 1 所示, 使用 *TransStart* Top Green qPCR Supper Mix 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司) 进行实时荧光定量 PCR 分析。仪器为 Thermal Cycler Dice, PCR 采用两步法, 按照  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值法计算基因相对表达量。

**Table 1** Real-time PCR primer sequences

Primer	Primer sequence (5'-3')
qBcWRKY2-F	AAGCGCGTGGAGAGATCATA
qBcWRKY2-R	TGTAGAGTTTTGACGGGCT
qBcWRKY36-F	CTCGTGCTATTACCGTTGC
qBcWRKY36-R	ACTGGGCATGGATCCTGAAA
qBcWRKY7-F	AAATGGAAGAAAACGCCGCT
qBcWRKY7-R	TCTTGAATTTGTGGACGGCG
qBcWRKY65-F	GAGACACGGAAACATGGACG
qBcWRKY65-R	CTGTTGGTAGCAGGGCATC
qBcWRKY32-F	AACTGGAGGAAATACGGGCA
qBcWRKY32-R	GGATCGTGATTGTGATGCC
qBcWRKY61-F	AAGCACAGTTGTATCCCCGA
qBcWRKY61-R	TGGTGTGGAAGGGATGGAAA
qBcWRKY19-F	ACCTAATTCGTTGCCGCAAA
qBcWRKY19-R	CGTCTTGAAGGAGCCCATTG
qBcWRKY40-F	ACAACCACTCGATTCCCACT
qBcWRKY40-R	CGAAATCTTCAACCCGGCG
qBcWRKY1-F	CTTCTCTCCCGAAATTGCCG
qBcWRKY1-R	TGGGGTGGTTATGAGTTCCC
qBcWRKY47-F	AGGGTGAGTGCTGAGAACAA
qBcWRKY47-R	TGGCCCTGTATTGACCACAT
18S-F	GCTTCCCTCCCGACAATTTTC
18S-R	AGTCGGGTGTTTGGGAATG

## 结果与分析

### 1 BcWRKY 鉴定与特性分析

本文以 WRKY 转录因子高度保守的 WRKYGQK 七肽为查询序列, 应用 tBLASTn 进行同源比对, 从马蓝转录组数据库中共筛选出 96 个具有 WRKYGQK 结构域的 BcWRKYs 成员。进一步通过基因 ORF 预测, 发现 65 条序列具有完整的 ORF (表 2), 并将其分别命名为 BcWRKY1、BcWRKY2、BcWRKY3、……、BcWRKY65。序列长度从 868 bp (BcWRKY62) ~ 7 558 bp (BcWRKY53) 不等, 编码的氨基酸长度为 221 aa (BcWRKY27)~706 aa (BcWRKY28)。相对分子质量为 25 711.8 (BcWRKY27)~75 475 (BcWRKY28), 平均相对分子质量为 42 768.55。等电点为 4.68 (BcWRKY30)~9.68 (BcWRKY7), 其中有 40 个蛋白 pI 小于 7, 说明多数蛋白表现偏酸性。60 个 WRKY 蛋白

的不稳定系数 (instability index, II) 大于 40, 最小的为 32.65 (BcWRKY11), 最大的为 74.88 (BcWRKY30), 说明超过 90% 的马蓝 WRKY 家族蛋白为不稳定蛋白。65 个 WRKY 家族蛋白的脂溶性指数 (aliphatic index, AI) 介于 45.33~86.16, 均小于 100; 另外, 其亲水性平均系数 GRAVY 均小于 0, 以上结果表明 65 个 WRKY 蛋白为亲水性蛋白。接下来, 采用 PSORT 对 BcWRKY 蛋白的亚细胞定位进行预测, 以上 WRKY 蛋白分布有细胞核、细胞质、氧化物酶体、叶绿体、线粒体等部位, 其中大约 65% 的 BcWRKY 蛋白分布在细胞核, 剩余约 35% 的 BcWRKY 在细胞核中分布的概率也超过 50%, 说明大多数的 BcWRKY 应为核蛋白。

BcWRKY 蛋白的二级结构预测结果 (表 2) 表明, 65 个 BcWRKY 蛋白主要由  $\alpha$ -螺旋、延伸链和无规则卷曲组成。 $\beta$ -折叠的比例均较小, 无规则卷曲所占比例较大, 63 个蛋白的无规卷曲比例超过 50%。59 个 BcWRKY 蛋白表现为无规则卷曲 >  $\alpha$ -螺旋 > 延伸链 >  $\beta$ -折叠, 其余 6 个蛋白 BcWRKY10、BcWRKY15、BcWRKY32、BcWRKY37、BcWRKY56 和 BcWRKY60 表现为无规则卷曲 > 延伸链 >  $\alpha$ -螺旋 >  $\beta$ -折叠。

### 2 马蓝 WRKY 转录因子家族成员的系统进化分析

为分析马蓝与其他物种 WRKY 转录因子家族的进化关系, 使用 MEGA5.0 软件对 65 个马蓝 BcWRKYs、72 个拟南芥 AtWRKYs、61 个丹参 SmWRKYs 和 51 个长春花 CrWRKYs 蛋白的氨基酸序列采用邻接法构建系统进化树 (图 3)。结果显示, 4 个物种的 WRKYs 可归类到 7 个分支 (I、IIa、IIb、IIc、IId、IIe、III), 但是不同物种中 WRKY 成员在不同分支中的分布是不均匀的。其中, Group II 中 WRKY 成员数都是最多的。另外, 除了拟南芥, 马蓝、长春花和丹参中 Group I 中 WRKY 数量都比 Group III 少。根据进化树分类情况和拟南芥中 WRKY 转录因子的分类系统, 马蓝的 65 个 BcWRKY 蛋白中有 12 个属于 Group I, 44 个属于 Group II, Group II 又可分为 IIa、IIb、IIc、IId 和 IIe 5 个亚族, 数量分别为 3、9、17、7 和 8 个, 剩下 9 个属于 Group III。WRKY 核心保守结构域 (60 个氨基酸残基) 多重序列比对的结果显示同一大族的 BcWRKY 除了 WRKYGQK 七肽序列及锌指结构相同外, 整个 WRKY 结构域中的氨基酸残基序列也存在高度相似性 (图 4)。65 个 BcWRKYs 蛋白中有 12 个含有两个 WRKYGQK 域, 锌指结构序列为 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 属于 Group I。另外的 53 个 WRKY 蛋白均只含有一个典型的 WRKY 结构域, 其中 44 个 BcWRKY 蛋白的锌指结构和 Group I 中的相同, 属于 Group II, 9 个 BcWRKY 属于 Group III, 锌指结构是 C<sub>2</sub>H/C。

**Table 2** The WRKY family genes in *B. cinerea*

Gene name	ID (mRNA)	Number of amino acids	Molecular weight/Da	pI	Aliphatic index	Grand average of hydrophobicity (GRAVY)	Instability index	Subcellular localization	Alpha helix	Extended strand	Beta turn	Random coil
<i>BcWRKY1</i>	c190_g1_i1	539	58 635.3	6.9	51.09	-0.874	57.73	nucl: 7, pero: 3, chlo: 2, mito: 2	11.32	10.39	3.34	74.95
<i>BcWRKY2</i>	c1090_g1_i1	332	36 905.8	6.22	46.17	-0.897	63.53	nucl: 14	24.1	8.13	1.81	65.96
<i>BcWRKY3</i>	c6524_g1_i1	338	36 881.5	5.53	52.01	-0.788	59.47	nucl: 12, chlo: 1	14.2	11.24	3.25	71.3
<i>BcWRKY4</i>	c6524_g1_i2	338	36 881.5	5.53	52.01	-0.788	59.47	nucl: 12, chlo: 1	14.2	11.24	3.25	71.3
<i>BcWRKY5</i>	c13968_g1_i1	342	38 447.4	6.46	46.55	-0.913	63.72	nucl: 13	25.44	7.89	3.51	63.16
<i>BcWRKY6</i>	c13968_g1_i2	342	38 447.4	6.46	46.55	-0.913	63.72	nucl: 13	25.44	7.89	3.51	63.16
<i>BcWRKY7</i>	c16804_g1_i1	331	35 780.5	9.68	61.66	-0.618	51.3	nucl: 14	20.24	8.76	2.72	68.28
<i>BcWRKY8</i>	c17876_g1_i1	496	54 203.7	9.17	59.88	-0.659	47.43	nucl: 14	31.05	13.1	4.23	51.61
<i>BcWRKY9</i>	c27862_g1_i1	360	40 237.4	5.17	57.25	-0.728	52.16	nucl: 13.5, cyto_nucl: 7.5	19.17	11.94	3.33	65.56
<i>BcWRKY10</i>	c29172_g1_i2	573	62 035.5	7.01	57.03	-0.797	49.42	nucl: 14	8.55	13.26	4.19	74
<i>BcWRKY11</i>	c41505_g1_i1	440	47 882.4	8.01	68.57	-0.585	32.65	nucl: 7.5, cyto_nucl: 6, cyto: 3.5, chlo: 2	28.86	9.77	3.41	57.95
<i>BcWRKY12</i>	c41505_g1_i2	476	51 867	8.01	69.12	-0.528	32.93	nucl: 6, cyto: 4, chlo: 2, vacu: 1	29.41	10.08	2.52	57.98
<i>BcWRKY13</i>	c50218_g1_i2	508	57 144.8	6.71	52.24	-0.875	47.08	nucl: 14	12.4	11.61	2.36	73.62
<i>BcWRKY14</i>	c62580_g1_i1	324	36 600.5	5.27	66.51	-0.822	42.22	nucl: 13	27.47	12.04	3.7	56.79
<i>BcWRKY15</i>	c66932_g1_i2	480	52 271.8	7.25	57.33	-0.789	57.55	nucl: 14	12.29	12.92	3.12	71.67
<i>BcWRKY16</i>	c70343_g1_i2	321	34 333	9.61	64.45	-0.416	35.24	nucl: 14	19.94	10.28	4.98	64.8
<i>BcWRKY17</i>	c70386_g1_i1	315	35 480.1	5.16	54.89	-0.709	56.74	nucl: 14	28.57	7.94	4.13	59.37
<i>BcWRKY18</i>	c72750_g1_i1	430	47 429	7.56	61.51	-0.72	35.15	nucl: 13	31.63	14.42	4.65	49.3
<i>BcWRKY19</i>	c74396_g1_i1	326	36 371.2	5.68	54.17	-0.837	55.78	nucl: 14	29.45	13.8	3.99	52.76
<i>BcWRKY20</i>	c76584_g1_i2	459	49 228.3	5.63	58.52	-0.703	54.09	nucl: 13	18.3	7.84	3.92	69.93
<i>BcWRKY21</i>	c76584_g1_i3	435	47 343.3	5.2	53.68	-0.735	54.35	nucl: 13	18.16	9.66	2.99	69.2
<i>BcWRKY22</i>	c80274_g1_i2	337	37 705.9	6.27	54.48	-0.818	67.19	nucl: 13.5, cyto_nucl: 7.5	28.49	8.01	2.67	60.83
<i>BcWRKY23</i>	c80450_g1_i1	333	36 496.8	5.7	57.78	-0.808	48.49	nucl: 13	21.02	9.01	4.5	65.47
<i>BcWRKY24</i>	c80916_g1_i3	264	29 442.1	7.1	76.86	-0.637	56.42	nucl: 13	36.74	15.53	1.52	46.21
<i>BcWRKY25</i>	c80916_g1_i5	352	39 583	8.08	86.16	-0.379	44.39		32.67	14.49	2.56	50.28
<i>BcWRKY26</i>	c83416_g1_i1	288	32 644.7	6.39	74.1	-0.614	47.66	nucl: 7, cyto: 4, plas: 1, extr: 1	29.86	7.64	4.86	57.64
<i>BcWRKY27</i>	c83416_g1_i2	221	25 711.8	6.16	63.94	-0.597	39.98	nucl: 7, cyto: 3, pero: 2, extr: 1	25.79	14.03	6.79	53.39
<i>BcWRKY28</i>	c83588_g1_i3	706	75 475	5.67	54.29	-0.728	49.68	nucl: 14	11.19	9.77	3.4	75.64
<i>BcWRKY29</i>	c86119_g1_i1	509	56 066.3	6.38	59.88	-0.922	61.36	nucl: 14	15.52	9.43	2.95	72.1
<i>BcWRKY30</i>	c86991_g1_i3	305	34 099.5	4.68	57.84	-0.943	74.88	nucl: 12, mito: 1	11.8	9.84	2.62	75.74
<i>BcWRKY31</i>	c87043_g1_i4	401	44 753.9	5.75	50.07	-0.837	67.53	nucl: 12, chlo: 1	16.46	12.22	2.24	69.08
<i>BcWRKY32</i>	c87440_g1_i2	487	53 658.1	7.64	62.87	-0.729	59.71	nucl: 14	13.35	15.81	3.49	67.35
<i>BcWRKY33</i>	c89989_g2_i2	313	34 038.6	7.8	47.51	-0.77	55.18	nucl: 14	23	7.03	1.92	68.05
<i>BcWRKY34</i>	c89989_g2_i3	285	30 892.1	7.13	45.33	-0.792	58.42	nucl: 14	21.05	11.23	1.75	65.96
<i>BcWRKY35</i>	c90764_g1_i1	465	50 697.8	8.24	69.53	-0.556	46.95	nucl: 10, cyto: 2, chlo: 1	32.26	10.32	2.8	54.62
<i>BcWRKY36</i>	c91203_g1_i1	562	59 939.7	7.15	61.55	-0.608	50.73	nucl: 11, mito: 2	29.18	11.03	4.27	55.52
<i>BcWRKY37</i>	c91932_g1_i2	499	55 054.2	6.32	63.09	-0.78	61.98	nucl: 12, chlo: 1	11.02	13.63	3.21	72.14
<i>BcWRKY38</i>	c92553_g1_i1	473	52 040.9	8.35	55.05	-0.765	49.29	nucl: 14	26.22	9.09	1.9	62.79
<i>BcWRKY39</i>	c92742_g1_i2	329	36 034.4	6.25	58.42	-0.669	49.89	nucl: 14	34.04	9.42	1.52	55.02
<i>BcWRKY40</i>	c93652_g2_i2	320	35 087	5.82	58.56	-0.692	57.68	nucl: 14	22.19	6.88	5	65.94
<i>BcWRKY41</i>	c93652_g2_i3	282	30 864.2	5.91	54.08	-0.774	52.53	nucl: 14	23.05	7.8	4.26	64.89
<i>BcWRKY42</i>	c94067_g1_i1	343	38 490.6	9.62	65.07	-0.786	52.13	nucl: 13	22.74	9.62	4.66	62.97
<i>BcWRKY43</i>	c94067_g1_i2	351	39 396.5	9.55	61.71	-0.829	58.95	nucl: 14	27.92	13.68	4.27	54.13
<i>BcWRKY44</i>	c94067_g1_i4	343	38 490.6	9.62	65.07	-0.786	52.13	nucl: 13	22.74	9.62	4.66	62.97
<i>BcWRKY45</i>	c94386_g1_i1	434	47 408.4	8.85	67.37	-0.676	51.02	nucl: 6, cyto: 5, chlo: 2	12.9	11.52	3.46	72.12
<i>BcWRKY46</i>	c94386_g1_i2	434	47 408.4	8.85	67.37	-0.676	51.02	nucl: 6, cyto: 5, chlo: 2	12.9	11.52	3.46	72.12
<i>BcWRKY47</i>	c95444_g2_i5	335	37 510.2	8.06	69.52	-0.788	47.91	nucl: 9, cyto: 4	27.76	11.64	1.49	59.1

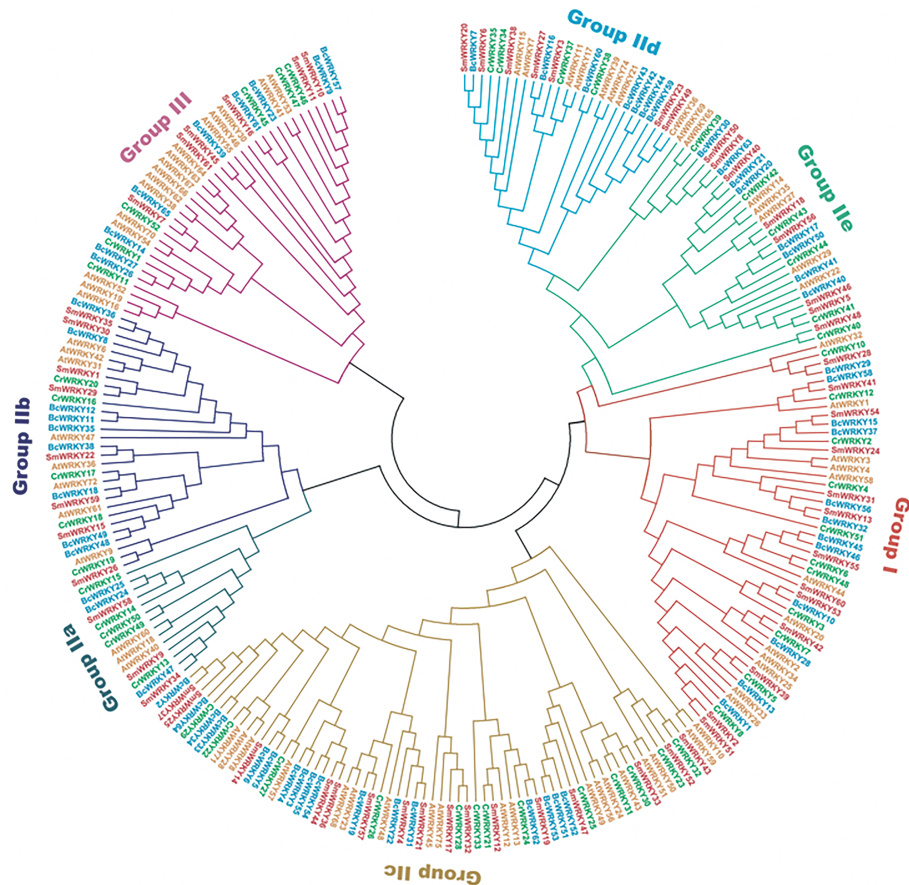
Continued

Gene name	ID (mRNA)	Number of amino acids	Molecular weight/Da	pI	Aliphatic index	Grand average of hydrophaticity (GRAVY)	Instability index	Subcellular localization	Alpha helix	Extended strand	Beta turn	Random coil
<i>BcWRKY48</i>	c96888_g1_i1	652	71 147.5	5.5	57.33	-0.885	48.71	nucl: 14	22.85	11.35	2.45	63.34
<i>BcWRKY49</i>	c96888_g1_i2	643	70 023.4	5.54	58.13	-0.854	48.86	nucl: 14	24.11	11.66	2.8	61.43
<i>BcWRKY50</i>	c97318_g2_i1	342	37 501.1	5.19	50.76	-0.701	55.24	nucl: 13	20.76	9.94	3.51	65.79
<i>BcWRKY51</i>	c100352_g1_i1	291	32 267.8	5.49	69.76	-0.56	46.9	nucl: 12, cyto: 1	23.37	14.78	2.75	59.11
<i>BcWRKY52</i>	c100352_g1_i2	292	32 365.9	5.58	70.51	-0.544	46.32	nucl: 10.5, cyto_nucl: 6.5, cyto: 1.5	25.68	13.36	2.4	58.56
<i>BcWRKY53</i>	c100352_g1_i3	291	32 267.8	5.49	69.76	-0.56	46.9	nucl: 12, cyto: 1	23.37	14.78	2.75	59.11
<i>BcWRKY54</i>	c101248_g1_i1	322	34 890.6	6.1	58.82	-0.515	51.96	nucl: 14	16.77	10.56	5.59	67.08
<i>BcWRKY55</i>	c101248_g1_i2	323	35 011.8	6.2	59.85	-0.477	50.97	nucl: 14	14.55	13	4.95	67.49
<i>BcWRKY56</i>	c104028_g5_i3	486	52 929.4	9.1	62.76	-0.74	58.38	nucl: 14	10.7	13.37	2.67	73.25
<i>BcWRKY57</i>	c105450_g1_i1	355	39 505.9	5.39	68.99	-0.586	43.81	nucl: 14	18.87	8.45	3.66	69.01
<i>BcWRKY58</i>	c106015_g1_i1	626	68 756.2	6.74	51.55	-1.164	57.26	nucl: 14	16.61	11.98	3.35	68.05
<i>BcWRKY59</i>	c106804_g1_i1	337	37 659.6	9.16	63.35	-0.727	52.72	nucl: 14	23.44	11.87	2.97	61.72
<i>BcWRKY60</i>	c188033_g1_i1	278	30 793.1	5.82	56.44	-0.851	73.28	nucl: 13	13.67	14.75	5.04	66.55
<i>BcWRKY61</i>	c188115_g1_i1	343	38 310.1	5.63	69.33	-0.577	49.76	nucl: 11, extr: 2	21.28	8.75	3.5	66.47
<i>BcWRKY62</i>	c190466_g1_i1	239	27 381.7	8.82	62.76	-0.712	49.04	nucl: 12, chlo: 1	22.59	12.13	3.35	61.92
<i>BcWRKY63</i>	c218496_g1_i1	291	32 188.5	5.24	52.03	-0.857	59.63	nucl: 14	17.87	10.31	3.09	68.73
<i>BcWRKY64</i>	c249596_g2_i1	295	32 804.4	6.06	46.31	-0.933	62.97	nucl: 14	30.51	5.76	4.07	59.66
<i>BcWRKY65</i>	c250035_g1_i1	374	40 753.1	6.77	56.39	-0.676	51	nucl: 14	22.99	13.1	5.35	58.56

### 3 马蓝WRKY家族蛋白的结构域

利用MEME 5.4.1在线软件对65个BcWRKYs氨

基酸序列进行基序保守性和多样性分析,发现基序的长度为15~48 aa不等,WRKY蛋白中的基序数量在



**Figure 3** Phylogenetic tree of WRKY transcription factor family in *B. cusia*. BcWRKYs (blue), SmWRKYs (red), AtWRKYs (orange) and CrWRKYs (green)

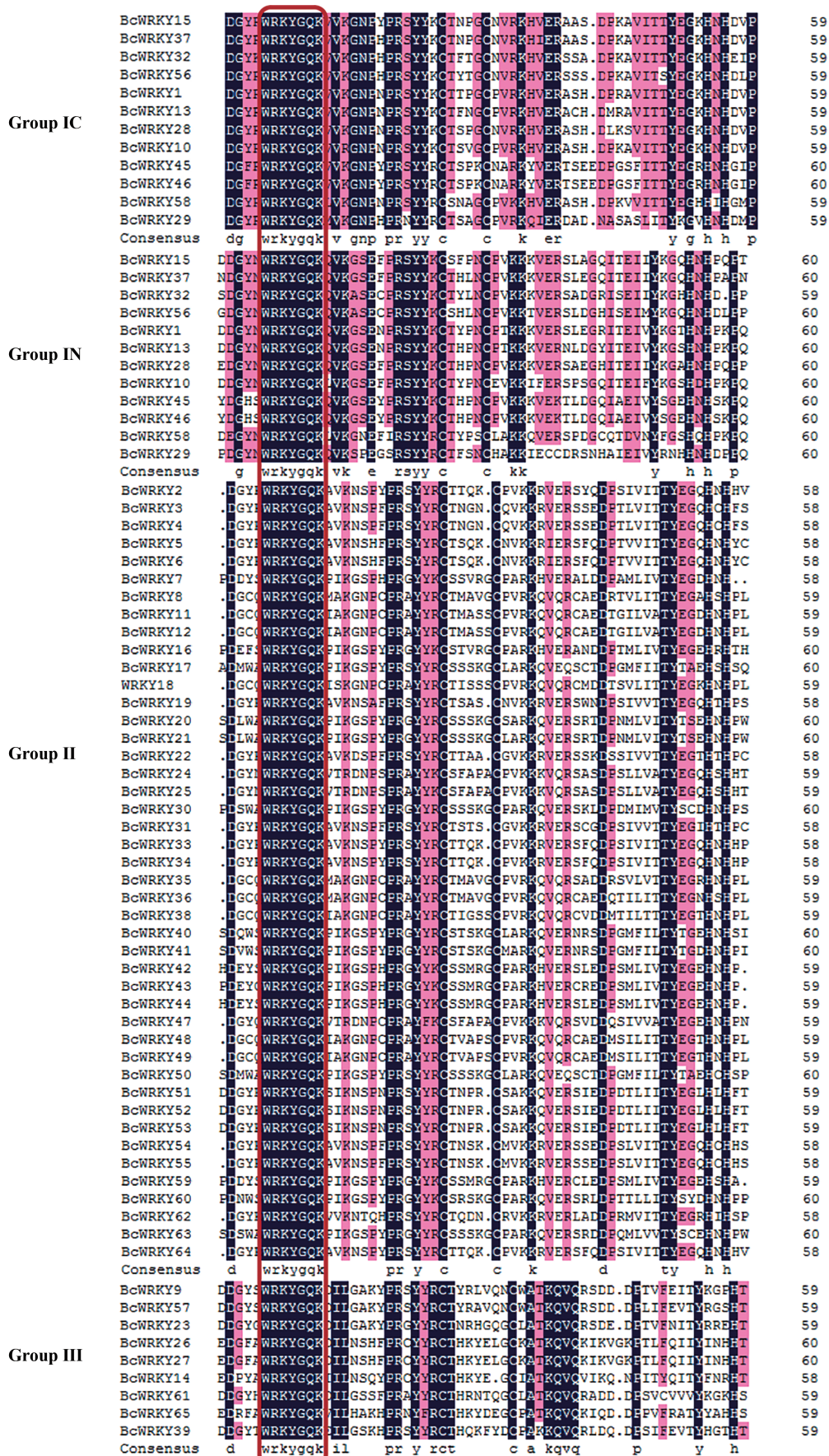


Figure 4 Alignment of conserved motifs of the BcWRKY family in *B. cusia*

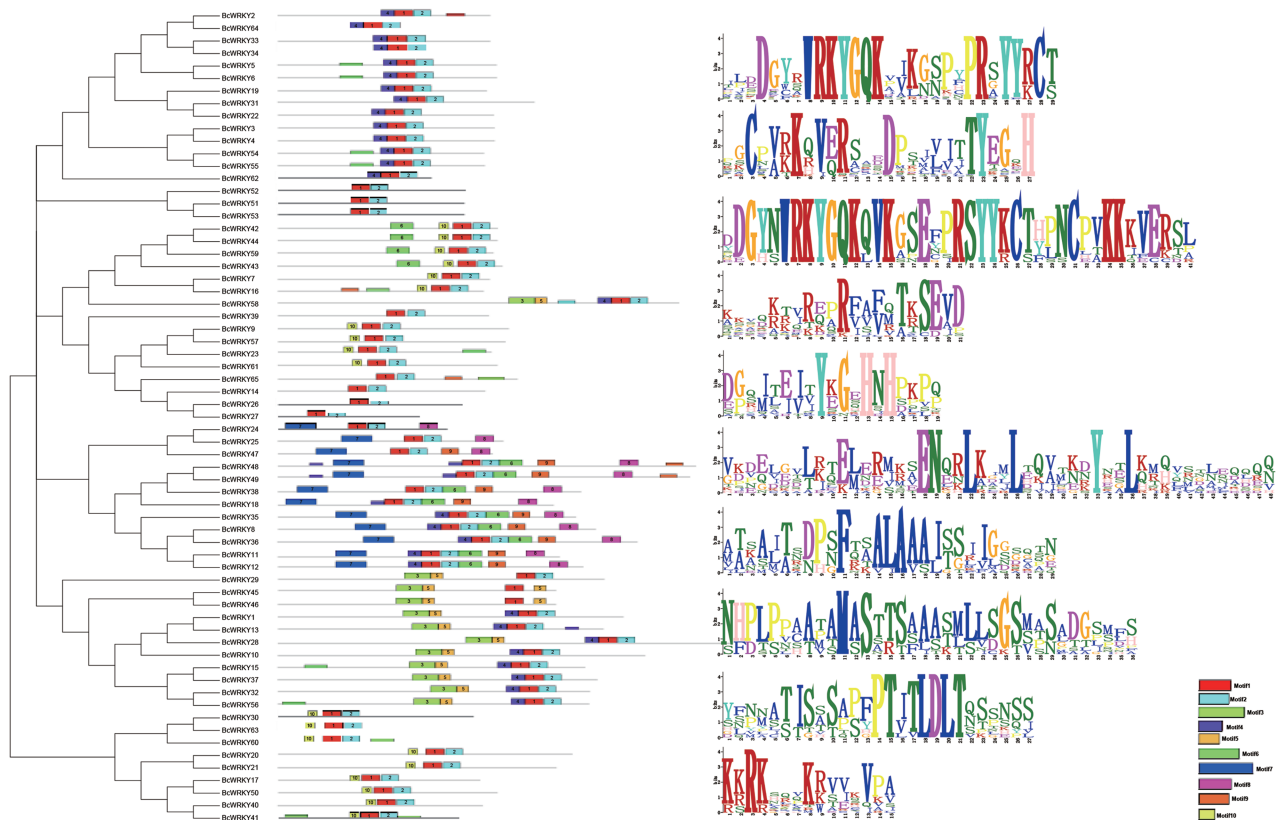
2~7个之间。如图5所示,大多数WRKY蛋白具有相似的基序组成,其中基序1含有29个氨基酸存在于全部的BcWRKYs氨基酸序列中,其最佳匹配序列为ILDDGYRWRKYGQKVIKGSPPYRSTYRCT,SMART软件分析表明该基序具有核心序列WRKYGQK结构。与WRKYGQK核心结构域高度保守性不同,锌指结构在不同大族的WRKY中差异较大。Group I和第Group II的锌指结构为C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>型,其中Group I锌指结构的序列为C-X<sub>4</sub>-C-X<sub>22</sub>-HXH,Group II锌指结构序列为C-X<sub>4</sub>-C-X<sub>23</sub>-HXH或C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>23</sub>-HXH或C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>23</sub>-H-N<sub>1</sub>-H。Group III中成员的锌指结构为C<sub>2</sub>HC型,序列为C-X<sub>7</sub>-C-X<sub>23</sub>-HXC或C-X<sub>7</sub>-C-X<sub>24</sub>-HXC(图4)。

#### 4 马蓝BcWRKY基因表达分析

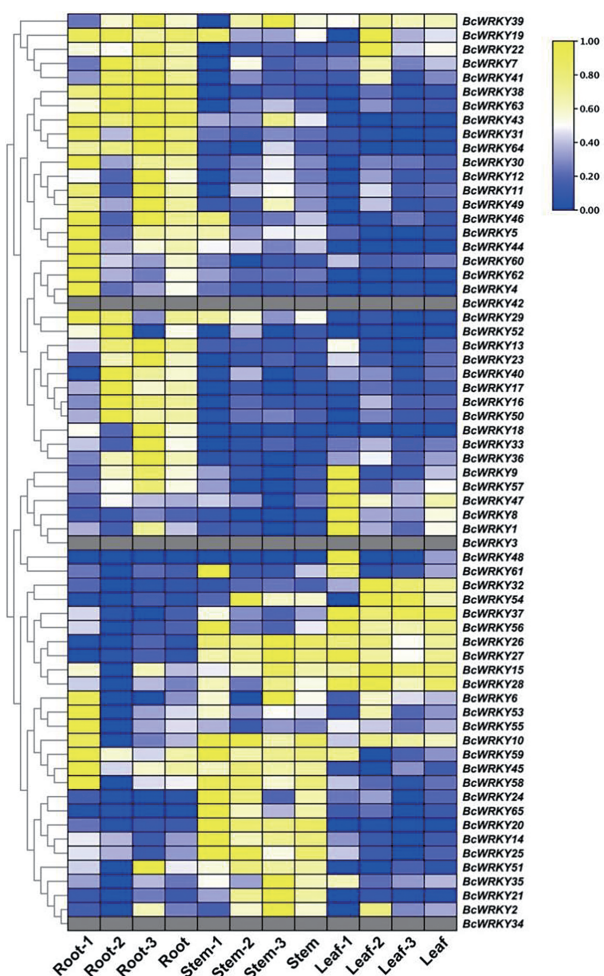
针对WRKY广泛参与植物发育和生理过程的特性,从马蓝根、茎和叶3个组织中的转录组数据中分析了BcWRKYs的表达特征。聚类分析结果显示65个BcWRKY的表达模式可分为4大类群:第I类群BcWRKY基因在根、茎和叶中都表达,表达水平比较一致。第II类群BcWRKY基因在根中表达量最高;第III类群主要在茎中高表达。第IV类群在马蓝茎和叶中表达量较高,其中有少部分BcWRKY在叶中表达变化比较明显,如BcWRKY47、-32、-1在叶中高表达而在根

和茎中表达量低,同时在叶中低表达而在根和茎中表达明显上调的有BcWRKY40、-50、-63、-64(图6)。

大量研究表明WRKY基因的表达水平受多种植物激素,如乙烯、水杨酸、赤霉素、茉莉酸或脱落酸等调控<sup>[7]</sup>。为进一步探索马蓝BcWRKY基因的功能,对马蓝地上部分进行了ABA、MeJA和SA三种激素诱导处理。通过qPCR分析10条在不同器官中高表达的BcWRKY基因的转录水平,发现10条WRKY基因表达水平均响应ABA、MeJA和SA的诱导(图7)。在ABA诱导条件下,10条WRKY基因相对表达水平变化比较复杂,其中WRKY1、WRKY2、WRKY19、WRKY36、WRKY47、WRKY61和WRKY65出现两个高峰,分别在8和36h达到最大值;WRKY7和WRKY32在ABA的诱导下在48h达到表达水平的最大值;WRKY40先上升后下降,在ABA诱导1h时即达到表达水平的最大值,为0h的8.93倍。10个WRKY基因随着MeJA处理时间的增加表现出不同的变化,总体呈先上升后下降的趋势。这些基因的相对表达水平均在12h时达到最大值。WRKY2在MeJA诱导12h的表达水平是0h的74倍,WRKY19在MeJA诱导12h的表达水平是0h的60倍,WRKY47在MeJA诱导12h的表达水平是0h的37.4倍。在SA诱导下大部分WRKY基因的表达水平在



**Figure 5** Conservation and diversity of motifs in 65 BcWRKY proteins. The bit score indicates the frequency of the amino acids at each position in the sequences



**Figure 6** Hierarchical clustering and expression profiles of the 65 *BcWRKYs* in different organs/tissues in *B. cusia*. Blocks with colors indicate low/down expression (blue), high/up expression (yellow) or no expression/no change (gray)

16 h时达到最大值。比较特殊的是 *WRKY40* 在 1 h 达到最大值, 为 0 h 的 23.58 倍; 剩下 *WRKY36*、*WRKY47*、*WRKY61* 和 *WRKY65* 基因在 SA 诱导后 1、12、16 和 36 h 时间点出现多个表达水平的高峰。

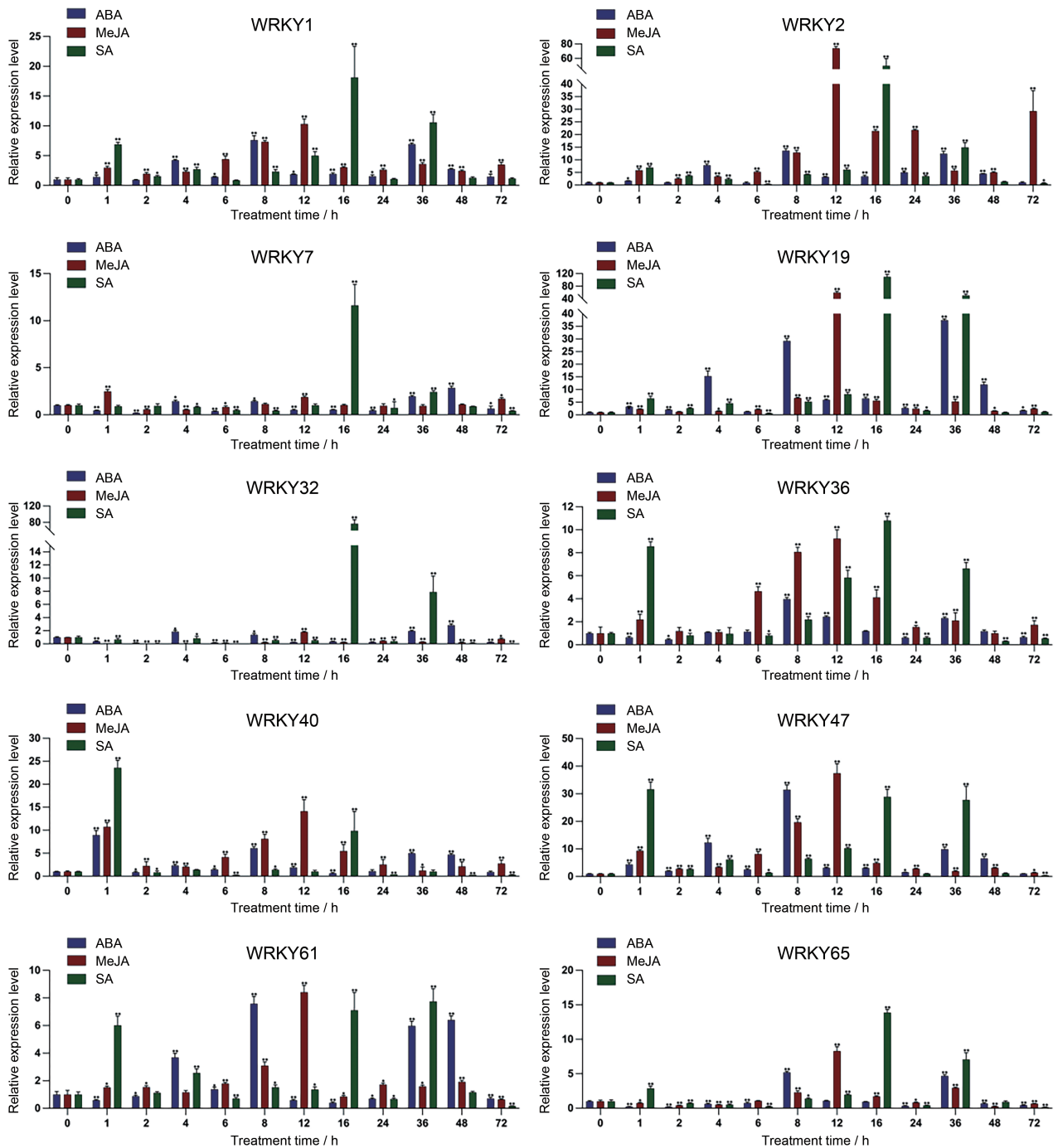
## 讨论

WRKY 转录因子在植物多种生理过程中发挥重要的作用, 参与了由各种生物和非生物胁迫介导的调控过程<sup>[18,19]</sup>。随着高通量测序技术的发展, WRKY 复杂的结构特征和功能已在多种药用植物中得到系统的研究, 主要有长春花 (52)<sup>[20]</sup>、丹参 (61)<sup>[21]</sup>、菘蓝 (*Isatis indigotica*) (64)<sup>[22]</sup>、白木香 (*Aquilaria sinensis*) (70)<sup>[23]</sup> 及人参 (*Panax ginseng*) (137)<sup>[24]</sup>。本研究对药用植物马蓝中的 WRKY 基因进行鉴定, 将有助于更广泛地了解该基因家族。

WRKY 蛋白的两个最突出和最明确的结构特征是

WRKY 结构域和锌指基序, 这为它们分类为 Group I~Group III 提供了基础<sup>[25]</sup>。本研究根据 WRKY 保守结构域和锌指结构的不同, 将马蓝中 65 个 *BcWRKYs* 成员分为 3 个大族 (I、II、III), 其中第 II 大族又可分为 5 个亚族 (IIa、IIb、IIc、IId 和 IIe)。马蓝 Group I 中有 12 个 *BcWRKYs* 均含有两个 WRKYGQK 域和两个 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指结构, 分布在序列的 C 端和 N 端。有关 WRKY 家族进化的研究认为, 在藻类中发现的 WRKY 属于 Group I, 是进化过程中最古老的 WRKY, Group II 和 Group III 的 WRKY 域是来自 Group I 的后代, 且 C 端 WRKY 域相当保守, 在决定 DNA 结合过程中起主导作用<sup>[26]</sup>。马蓝中 Group II 的数量最多, 为 44 个 *BcWRKYs* 成员, 意味着该家族的成员在进化过程中可能会经历更多的基因重复; 有趣的是 IIa 亚族是唯一一组在马蓝、丹参、长春花和拟南芥之间具有相同数量的 WRKY, 均只含有 3 个 WRKY 成员, 说明 IIa 亚族中 WRKY 在不同物种之间高度保守。拟南芥<sup>[20]</sup>和玉米 (*Z. mays*)<sup>[27]</sup>等植物 Group III 中 WRKY 不仅数目多 (拟南芥 11 个, 占 20% 和玉米 36 个, 占 28%), 而且基因扩增明显。与之不同的是, 马蓝 Group III 中的 *BcWRKY* 成员仅有 9 个, 无扩增现象, 这与丹参、人参和黄瓜 Group III 中 WRKY 成员数量较少的情形类似<sup>[21,24,28]</sup>。此外, Group III 中的 WRKY 在植物进化过程中变异较大, 暗示了在不同种属植物中该组成员的功能有较高的歧化性。考虑到 Group III 的 WRKY 在植物进化和适应中起着至关重要的作用, 而马蓝中 Group III 数量相对较少, 所以马蓝中 WRKY 家族的扩增可能是由其他大族的扩增引起的。此外, 对 65 个 *BcWRKY* 蛋白的 WRKY 域保守基序的分析显示, WRKYGQK 是 WRKY 基因最保守的基序, 锌指结构基序在序列长短和结构上差异较大。与其他大族 *BcWRKY* 蛋白 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指结构不同, Group III 中 WRKY 成员的锌指结构为 C<sub>2</sub>HC 型, 这反映了不同类型的 WRKY 基因所经历选择压力和进化模式是不同的。系统进化树将 *BcWRKYs* 分为 I、IIa+IIb、IIc、IId+IIe 和 III 五大分支, 因此可以知道 Group II 中 WRKY 不是单系的, 这与多种植物 WRKY 系统发育关系的研究结果一致<sup>[27,29,30]</sup>。不同物种的基因家族的系统发育树不仅有助于了解成员之间的系统发育关系, 而且还可以根据鉴定的功能进化枝推测蛋白质的功能。长春花中 *CrWRKY1* 能够影响萜类吲哚生物碱的生物合成, 马蓝中 *BcWRKY14*、-26 和 -27 是 *CrWRKY1* 的直系同源基因, 表明它们可能在马蓝吲哚生物碱生物合成中发挥着类似于 *CrWRKY1* 的作用。

研究表明马蓝地上部分靛蓝、靛玉红等吲哚生物碱活性成分含量明显高于根中的含量<sup>[1,3]</sup>, 转录组表达



**Figure 7** Expression verification of the selected *BcWRKY* genes revealed by qPCR. Expression patterns of ten selected *BcWRKY* genes in response to abscisic acid (ABA,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), methyl jasmonate (MeJA,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and salicylic acid (SA,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) treatments after 72 h. The *18S* gene was used as an internal control to normalize the data. Error bars are standard deviations of three biological replicates. Statistical significance was determined by Student's *t*-test (\*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ). Asterisks indicate the difference between treated and nontreated plants

谱分析结果显示 *WRKY3*、*WRKY34* 和 *WRKY42* 这 3 个 *BcWRKYs* 在马蓝根、茎和叶组织中不表达, 剩下的 *BcWRKYs* 大部分具有明显的组织特异性, 意味着 *BcWRKYs* 可能在马蓝生长发育次生代谢调控发挥多种功能。此外, 还注意到 *BcWRKY14* 在叶中特异性的

低表达, *BcWRKY26* 在叶中表达水平特别高, 这两个基因在长春花中的直系同源基因是能够调节萜类吲哚生物碱合成的 *CrWRKY1*, 因此猜测 *BcWRKY14* 和 -26 也可能参与马蓝中生物碱的次生代谢调控。

大量研究表明植物激素可调节多种植物代谢物

(黄酮、生物碱、倍半萜等)的合成<sup>[31,32]</sup>。Lin等<sup>[3]</sup>使用不同浓度的MeJA处理马蓝植株,通过测定处理组与对照组靛蓝、靛玉红的含量,发现MeJA通过调控途径基因的水平进而调控吲哚生物碱生物合成。Hashemi等<sup>[33]</sup>使用SA处理白屈菜,血根碱含量有显著改善,SA诱导48 h后,白屈菜碱的积累提高了2.52倍。SA诱导24 h后小檗碱的积累达到4.89倍的最大值。在MeJA诱导72 h后,白屈菜碱的量显著增加了9.63倍。在MeJA诱导24 h后,与对照相比,血根碱含量的最高积累水平为13.22倍。Harfi等<sup>[34]</sup>使用0.1 mmol·L<sup>-1</sup> SA处理了曼陀罗的毛状根,发现曼陀罗中莨菪碱的含量提高了2倍。本研究通过qPCR实验对根茎叶组织中高表达的*BcWRKY*基因进行检测,发现这10个*BcWRKY*的表达均受ABA、MeJA和SA三种激素调控,表明这些*BcWRKY*亦可能在马蓝吲哚生物碱的生物合成及代谢中发挥重要作用。WRKY蛋白通过结合靶基因的W-box ((C/T)TGAC(T/C))区域促进靶基因转录表达<sup>[35]</sup>。本课题组前期对已知的一些参与吲哚生物碱生物合成的关键酶基因(图1)启动子进行分析,发现多个基因启动子含WRKY转录因子特异结合的元件W-box。其中,ASA启动子包含有2个W-box,这提示马蓝WRKY转录因子可能参与吲哚生物碱合成途径的调控。为进一步阐释*BcWRKY*在马蓝吲哚生物碱生物合成过程中所发挥的作用,对于生物信息学分析及响应激素诱导的候选WRKY转录因子后期还需要结合生物化学与分子生物学等实验进行功能验证研究,例如利用酵母单杂交实验验证WRKY转录因子与途径基因启动子的结合情况,以及对*BcWRKY*基因过表达或敲除来进一步分析和阐明它们的功能,通过多种方法揭示马蓝吲哚生物碱的调控机制。

本研究在缺少马蓝基因组信息的情况下,通过生物信息学的方法较为全面地分析了马蓝中WRKY转录因子家族。通过分析马蓝根、茎和叶中WRKY表达谱筛选出10个在茎和叶中表达水平较高的*BcWRKY*,并分析ABA、MeJA和SA诱导后这10个*BcWRKY*的表达水平,初步筛选出马蓝吲哚生物碱生物合成相关的WRKY转录因子。本研究丰富了植物WRKY基因家族信息,深化了对马蓝WRKY转录因子家族的认识,为今后解析它们在吲哚生物碱等药效成分调控的分子功能及开展马蓝优质种质研究提供参考。

**作者贡献:** 郭志英是本研究的执行人,负责论文设计、实验、数据分析及论文撰写;通讯作者刁勇、张磊负责论文指导;李卿、陈军峰负责数据分析指导;黄玉香、马晓娟参与样品采集与定量实验;吴循循参与数据分析与图表制作。所有

作者参与论文修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Gu W, Zhang Y, Hao XJ, et al. Indole alkaloid glycosides from the aerial parts of *Strobilanthes cusia* [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77: 2590-2594.
- [2] Yu J, Zhang YH, Ning SJ, et al. Molecular cloning and metabolomic characterization of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene from *Baphicacanthus cusia* [J]. *BMC Plan Biol*, 2019, 19: 485.
- [3] Lin WJ, Huang W, Ning SJ, et al. Comparative transcriptome analyses revealed differential strategies of roots and leaves from methyl jasmonate treatment *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek and differentially expressed genes involved in tryptophan biosynthesis [J]. *PLoS One*, 2019, 14: e0212863.
- [4] Wang HZ, Wang ZY, Wei CY, et al. Anticancer potential of indirubins in medicinal chemistry: biological activity, structural modification, and structure-activity relationship [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 223: 113552.
- [5] Wu XX, Chen XF, Jia D, et al. Characterization of anti-leukemia components from *Indigo naturalis* using comprehensive two-dimensional K562/cell membrane chromatography and *in silico* target identification [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25491.
- [6] Wang L, Zhou GB, Liu P, et al. Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-*Indigo naturalis* as an effective treatment for promyelocytic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 4826-4831.
- [7] Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, et al. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases [J]. *Nat Cell Biol*, 1999, 1: 60-67.
- [8] Li L, Liang HQ, Liao SX, et al. Chemical studies of *Strobilanthes Cusia* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1993, 28: 238-240.
- [9] Chen JF, Li Q, Wang Y, et al. Comprehensive transcriptomic profiling of *Isatis indigotica* leaves reveals biosynthesis of indole active ingredients [J]. *Sci Sin Vit (中国科学:生命科学)*, 2018, 48: 412-422.
- [10] Warzecha H, Frank A, Peer M, et al. Formation of the indigo precursor indican in genetically engineered tobacco plants and cell cultures [J]. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5: 185-191.
- [11] Lee JY, Shin YS, Shin HJ, et al. Production of natural indirubin from indican using non-recombinant *Escherichia coli* [J]. *Biore-sour Technol*, 2011, 102: 9193-9198.
- [12] Schluttenhofer C, Yuan L. Regulation of specialized metabolism by WRKY transcription factors [J]. *Plant Physiol*, 2015, 167: 295-306.
- [13] Kato N, Dubouzet E, Kokabu Y, et al. Identification of a WRKY protein as a transcriptional regulator of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica* [J]. *Plant Cell Physiol*,

- 2007, 48: 8-18.
- [14] Yamada Y, Shimada T, Motomura Y, et al. Modulation of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis by heterologous expression of CjWRKY1 in *Eschscholzia californica* cells [J]. PLoS One, 2017, 12: e0186953.
- [15] Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, et al. The transcription factor CrWRKY1 positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. Plant Physiol, 2011, 157: 2081-2093.
- [16] Huang YX, Tan HX, Yu J, et al. Stable internal reference genes for normalizing real-time quantitative PCR in *Baphicacanthus cusia* under hormonal stimuli and UV irradiation, and in different plant organs [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 668.
- [17] Feng FX, Lv RH, Li YM, et al. Characterization and expression analysis of the transcription factor *BcWRKY70* in *Bupleurum chinense* DC [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 3184-3189.
- [18] Xiao Y, Feng JX, Li Q, et al. IiWRKY34 positively regulates yield, lignan biosynthesis and stress tolerance in *Isatis indigotica* [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10: 2417-2432.
- [19] Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. Trends Plant Sci, 2000, 5: 199-206.
- [20] Schluttenhofer C, Pattanaik S, Patra B, et al. Analyses of *Catharanthus roseus* and *Arabidopsis thaliana* WRKY transcription factors reveal involvement in jasmonate signaling [J]. BMC Genomics, 2014, 15: 502.
- [21] Li C, Li DQ, Shao FJ, et al. Molecular cloning and expression analysis of WRKY transcription factor genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. BMC Genomics, 2015, 16: 200.
- [22] Qu RJ, Cao YW, Tang XQ, et al. Identification and expression analysis of the WRKY gene family in *Isatis indigotica* [J]. Gene, 2021, 783: 145561.
- [23] Xu YH, Sun PW, Tang XL, et al. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg [J]. Sci Rep, 2020, 10: 3018.
- [24] Di P, Wang P, Yan M, et al. Genome-wide characterization and analysis of WRKY transcription factors in *Panax ginseng* [J]. BMC Genomics, 2021, 22: 834.
- [25] Eulgem T, Somssich IE. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling [J]. Curr Opin Plant Biol, 2007, 10: 366-371.
- [26] Zhang YJ, Wang LJ. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants [J]. BMC Evol Biol, 2005, 5: 1.
- [27] Wei KF, Chen J, Chen YF, et al. Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in maize [J]. DNA Res, 2012, 19: 153-164.
- [28] Ling J, Jiang WJ, Zhang Y, et al. Genome-wide analysis of WRKY gene family in *Cucumis sativus* [J]. BMC Genomics, 2011, 12: 471.
- [29] Mangelsen E, Kilian J, Berendzen KW, et al. Phylogenetic and comparative gene expression analysis of barley (*Hordeum vulgare*) WRKY transcription factor family reveals putatively retained functions between monocots and dicots [J]. BMC Genomics, 2008, 9: 194.
- [30] Ross CA, Liu Y, Shen QXJ. The WRKY gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. J Integr Plant Biol, 2007, 49: 827-842.
- [31] Abouzeid S, Beutling U, Surup F, et al. Treatment of *Vinca minor* leaves with methyl jasmonate extensively alters the pattern and composition of indole alkaloids [J]. J Nat Prod, 2017, 80: 2905-2909.
- [32] Ho TT, Murthy HN, Park SY. Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21: 716.
- [33] Hashemi SM, Naghavi MR, Ghorbani M, et al. Effects of abiotic elicitors on expression and accumulation of three candidate benzophenanthridine alkaloids in cultured greater celandine cells [J]. Molecules, 2021, 26: 1395.
- [34] Harif B, Khelifi L, Khelifi-Slaoui M, et al. Tropane alkaloids GC/MS analysis and low dose elicitors' effects on hyoscyamine biosynthetic pathway in hairy roots of Algerian *Datura* species [J]. Sci Rep, 2018, 8: 17951.
- [35] Ciolkowski I, Wanke, D, Birkenbihl RP, et al. Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function [J]. Plant Mol Biol, 2008, 68: 81-92.