

# 漆树 WRKY 转录因子基因家族生物信息学分析

肖纪元,白航宇,宋金禄,张智雯,赵爱国,刘朝斌\*

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

**摘要:**漆树作为中国古老的经济树种,具有巨大的经济价值。WRKY 转录因子是植物抗逆过程中最为常见的蛋白家族。为探索 WRKY 转录因子在漆树生长发育及抗逆境胁迫中的作用,以漆树转录组测序结果为试验材料,通过对保守结构域分析和多序列比对,共筛选出 20 个具有 WRKY 保守域的基因,根据 WRKY 结构特征,将筛选出的基因分为 3 组,其中 II 组根据保守基序分析又可分为 5 个亚组。通过构建漆树和拟南芥 WRKY 基因家族系统进化树,分析漆树 WRKY 基因同源性,并根据其与拟南芥同源漆树基因进行功能预测。同时,对漆树 WRKY 转录因子在漆树不同部位的差异表达做分析, *TvWRKY2*、*TvWRKY11*、*TvWRKY14*、*TvWRKY16*、*TvWRKY17*、*TvWRKY19*、*TvWRKY8*、*TvWRKY15* 在根中表达水平上调。通过对漆树 WRKY 转录因子基因家族进行系统的生物信息学分析,为进一步分析特定 WRKY 基因功能提供了参考,同时为后续深入研究漆树 WRKY 蛋白的结构与功能奠定了理论基础。

**关键词:**漆树(*Toxicodendron vernicifluum*); WRKY; 转录因子; 生物信息学

中图分类号: S718.46

文献标志码: A

文章编号: 1001-7461(2023)04-0111-08

## Bioinformatics Analysis of WRKY Transcription Factor Family in *Toxicodendron vernicifluum*

XIAO Ji-yuan, BAI Hang-yu, SONG Jin-lu, ZHANG Zhi-wen, ZHAO Ai-guo, LIU Chao-bin\*

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

**Abstract:** As an ancient non-timber tree species in China, *Toxicodendron vernicifluum* trees have great economic value. In order to explore the role of WRKY transcription factors in the growth and development of *T. vernicifluum* tree and the resistance to stress, taking the sequencing results of the tree transcriptome as experimental materials, through the analysis of conserved domain and multi sequence alignment, a total of 20 genes with WRKY conserved domain were screened. According to the structural characteristics of WRKY, the screened genes were divided into three groups, of which group II could be divided into five subgroups according to the analysis of conserved motif. By constructing the phylogenetic tree of *T. vernicifluum* and *Arabidopsis* WRKY gene family, the homology of WRKY gene was analyzed, and its function was predicted according to the homologous with *Arabidopsis*. At the same time, differential expression of *T. vernicifluum* WRKY transcription factors in different tissues was analyzed. The expression levels of *TvWRKY2*, *11*, *14*, *16*, *17*, *19*, *8* and *15* were up-regulated in the root. The study conducts a systematic bioinformatics analysis of *T. vernicifluum* WRKY transcription factor family, which provides a reference for further analysis of specific WRKY functions, and laid a theoretical foundation for the follow-up in-depth study of the structure and function of WRKY protein.

**Key words:** *Toxicodendron vernicifluum*; WRKY; transcription factor; bioinformatics

收稿日期: 2022-05-24 修回日期: 2022-07-04

基金项目: “十三五”国家重点研发计划(2017YFD0600705)。

第一作者: 肖纪元。研究方向: 植物分子生物学。E-mail: xjy@nwfufu.edu.cn

\* 通信作者: 刘朝斌, 博士, 副教授。研究方向: 林木育种及栽培技术。E-mail: liuchaobin@126.com

漆树 (*Toxicodendron vernicifluum*) 是漆树科 (Anacardiaceae) 漆属 (*Toxicodendron*) 植物, 分布在亚热带地区, 落叶乔木或小乔木。漆树分泌的生漆是天然树脂涂料, 生漆中近 80% 成分是漆酚, 具备极佳的耐腐蚀性、耐磨性、耐热性、隔水性、电绝缘性等物理化学特性, 在军工领域也十分重要<sup>[1]</sup>。利用生漆制成的漆器, 具有很高的文化艺术价值, 中国漆艺传承七千多年, 是世界文化宝库的珍贵资源<sup>[2]</sup>。国内外学者在对漆树的研究中, 多集中于漆树的栽培、生漆提取加工, 以及漆树中其余化学成分的研究, 对于漆树 WRKY 转录因子家族基因的研究较少, 且经过研究发现, WRKY 转录因子在多种生物和非生物胁迫过程中调节各种信号转导通路发挥了关键作用。这些转录因子通过调节不同的信号转导途径, 参与植物的各种过程, 包括营养剥夺、胚胎发生、种子和毛发发育、衰老以及其他发育和激素调控过程<sup>[3]</sup> 以及应对病菌虫害等生物胁迫反应和冷害、干旱、高盐等非生物胁迫<sup>[4]</sup>, 是植物生命活动中重要的调控枢纽, 参与了生长发育过程以及非生物逆境胁迫响应<sup>[5]</sup>。

WRKY 转录因子不是局限于单个基因的分析, 从 1994 年第 1 个 WRKY 转录因子基因被克隆得到, 到目前为止, 研究人员对 WRKY 转录因子生物学功能进行了广泛的研究, 筛选并鉴定出几十种高等植物的 WRKY 转录因子, 其中拟南芥 74 个、木瓜 66 个、小立碗藓 38 个<sup>[6]</sup>、高粱 68 个、卷柏 35 个、松树 80 个、大麦 45 个、杨树 104 个、大豆 197 个 WRKY 基因<sup>[7]</sup>, 并对 WRKY 对植物生理生化影响做了系统的研究。国外科学家针对拟南芥 WRKY 转录因子单基因在植物生长发育过程中以及生物和非生物胁迫应答过程中的作用进行了较多的分析<sup>[8]</sup>, 但仍有部分基因作用机制以及功能不完全清楚, 关于 WRKY 转录因子在高等植物中的功能挖掘及作用机制的研究仍有挑战。随着部分高等植物测序的完成, 越来越多的生物信息学方法用于鉴定和分析 WRKY 转录因子<sup>[9]</sup>, 为研究 WRKY 基因的作用机制提供了初步研究, 为 WRKY 成员用于转基因植物改良植物遗传提供了新的基因资源。

本研究以漆树为研究对象, 对漆树 WRKY 转录因子家族进行系统的生物信息学分析, 包括漆树 WRKY 转录因子筛选、WRKY 家族保守结构域分析、多序列比对, 保守基序分析, 系统进化树构建以及 WRKY 在漆树不同部位的表达模式分析, 对漆树 WRKY 基因家族做一个初步筛选以及功能预测, 为漆树以及相近漆树科植物中 WRKY 转录因子的深入研究提供一定的参考和理论依据。为传统

育种结合转基因操作等方法用以提高植物的胁迫耐受性, 培育选育抗逆植物新种质, 改良漆树的抗逆性提供相关理论依据及前期准备。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

采自西北农林科技大学漆树园 (34°15'54"N, 108°5'41"E) 的 2 年生漆树‘大红袍’, 随机采取生长较为均匀的漆树 (*Toxicodendron vernicifluum*), 并采集其幼嫩的根、茎、叶。漆酶基因源于实验室已构建的漆树转录组数据库 (登录号: PRJNA587830)。

漆树的转录组数据为大红袍漆树根、茎、叶转录组测序数据, NCBI 数据库获取号为 PRJ-NA587830。

### 1.2 漆树 WRKY 转录因子筛选

将 BLAST 和 HMMER 两种方法相结合的, 从拟南芥转录因子数据库下载 WRKY 转录因子序列, 获得拟南芥中 WRKY 基因家族成员的 ID 及所有基因的 cDNA 序列、基因组序列和氨基酸序列<sup>[10]</sup>。用每一个基因的氨基酸序列作为 Query, 对漆树转录组数据进行本地 BLASTP 搜索, 将结果中 E 值 (expectvalue)  $\leq 1e-20$  的基因作为初步的候选基因, 筛选出 WRKY 基因并剔除不完整的基因以及长度小于 300 个碱基的 WRKY 基因<sup>[11]</sup>。为确保无基因遗漏, 从 Pfam 数据库中下载保守结构域的 HMM (Hidden Markov Model) 文件: WRKY (PF03106)。利用 HMMER3.0 中 hmmbuild 建立模型, 进而通过 hmmsearch 检索漆树中具有 WRKY DNA-binding domain 保守结构域的候选蛋白序列, 设置 E 值为  $1e-20$ <sup>[12]</sup>。综合 2 种方法得到的结果, 手动去除冗余后获得目的序列。

### 1.3 漆树 WRKY 家族保守结构域分析

利用 ORFfinder 将筛选出的 WRKY 转录因子翻译成蛋白质, 借助 ExPASy 提供的一系列的蛋白质理化性质的工具, 使用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线工具线上分析漆树家族基因编码蛋白的理化性质。预测家族成员的等电点 (PI)、相对分子量、氨基酸长度、蛋白质亲水性等性质。

### 1.4 漆树 WRKY 家族保守结构域分析

通过美国国家生物技术信息中心 NCBI 的 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 与 Bitch (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bitch>)<sup>[13]</sup> 对筛选出的漆树 WRKY 基因进行保守结构域分析, 筛选出其中含有 WRKY 保守结构域的基因序列。其中, CDD 只可以进行单条序

列分析,Bitch 可以选择文件来上传,也可以直接输入批量递交多条序列,所以研究过程中先把所有的漆树 WRKY 基因序列放入一个文件上传到 Bitch,批量进行保守结构域分析后,再用 CDD 对通过 Bitch 筛选出的不具有 WRKY 保守结构域的 WRKY 序列单个进行确认,以保证保守结构域分析的准确性。将蛋白序列导入 Uniprot (<https://www.uniprot.org/align/>)进行序列对齐处理,将得到的序列保存为 fasta 格式,导入 GeneDoc 中获得保守结构域对比图。

### 1.5 漆树 WRKY 转录因子的多序列比对

利用 ORFfinder 将得到的 WRKY 蛋白序列通过线上工具 Uniport(<https://www.uniprot.org/align/>)对齐并转换为 Fasta 格式,并导入到 GeneDoc 中,进行多序列比对。参照 Eulgem 等对 WRKY 基因家族的分类标准,将鉴定得到的候选漆树 WRKY 转录因子基因家族成员进行分类。通过多序列对比导出的 Fasta 文件,根据多序列对比较的结果,利用 GeneDoc 进行漆树 WRKY 家族保守结构域类别比对分析<sup>[14]</sup>。

### 1.6 漆树 WRKY 蛋白保守位点分析

利用在线软件 MEME(Multi ple Expectation Maximization for Motif Elicitation)(<http://meme-suite.org/tools/meme>)进行预测<sup>[11]</sup>,对漆树 WRKY 蛋白家族的保守基序进行分析,参数设置为 10 个 motif,基序位点设置为序列出现次或 0 次,最大基序 50,最小基序 6 得到相关性最高的保守元件。分析图片利用 TBools 进行处理美化<sup>[15]</sup>。

### 1.7 漆树 WRKY 转录因子系统进化树的构建

下载拟南芥 WRKY 基因序列(<http://plant-tfdb.cbi.pku.edu.cn>),进行系统进化树的构建,由于转录因子 I 类亚家族有 2 个 WRKY 保守结构域,将 N 端 C 端分别命名为 I-N 和 I-C 亚组,独立参与构建。将拟南芥 WRKY 数据与筛选出的具有 WRKY 保守结构域的漆树序列以 fasta 格式保存,通过 MEGA(Molecular Evolutionary Genetics Analysis)中的 ClustalW 进行多序列比对,采用最大似然,载入 meg 文件,参数使用默认值,对 WRKY 的全长氨基酸序列作多序列联配,再利用 MEGA 中 PHYLOGENY 功能的邻位相接法(neighbor joining,NJ)构建漆树 WRKY 家族之间的进化关系,在 NO. of Bootstrap Replications 置信值为 1000 的条件下构建同源关系树,其他参数值设为默认值,由此得出漆树 WRKY 转录因子系统进化树。将通过 ClustalW 的结果导入到 GeneDoc (<https://github.com/KarlNicholas/GeneDoc>)中,适当修改

系统进化树的颜色及背景<sup>[12]</sup>。

### 1.8 漆树 WRKY 表达模式分析

从实验室已有的转录组数据中调取漆树的根、茎、叶 3 种组织的 FPKM 数据,从漆树基因的表达数据中筛选到这些数据,数据首先经 log<sub>2</sub> 标准化(以 2 为底差异表达倍数的对数),保留值 >1 以及 <-1 的数据,转换后提取 WRKY 基因的表达数据,利用软件 TBtools 中的 Heat Map Illustrator 功能对数据进行可视化分析,最后制作热图(heatmap)。

## 2 结果与分析

### 2.1 漆树 WRKY 转录因子筛选及理化性质分析

本研究共筛选出 WRKY 转录因子基因 20 个,分别命名为 *TvWRKY1* ~ *TvWRKY20*,20 个 WRKY 基因编码的蛋白大小不等,最大的编码蛋白分子量为 66.63Da,由 618 个氨基酸构成(表 1)。20 个 *TvWRKY* 理论等电点范围从 4.74(*TvWRKY19*)到 10.54(*TvWRKY9*),说明不同的 WRKY 蛋白在不同的微环境下发挥了不同的功能。20 个漆树 WRKY 蛋白均不属于稳定性蛋白。所有蛋白均为亲水性蛋白,其中酸性蛋白 11 个,碱性蛋白 9 个。

### 2.2 漆树 WRKY 转录因子的多序列比对及保守结构域分析

通过对 20 个漆树 WRKY 家族的保守结构域序列比对,发现共含 25 个 WRKY 结构域,对于同一条蛋白序列中存在的两个 WRKY 保守域,根据其序列中的位置,分别命名为 N 端和 C 端保守域,基于比对结果及拟南芥 WRKY 转录因子分类,将漆树 WRKY 家族成员划分为 3 个大类:I 类共 5 个基因,II 类共 12 个基因,III 类共 3 个基因(图 1)。

I 类含有 2 个 WRKY 结构域,且锌指结构类型为 C2H2,共 5 个基因,占比 25%。I 组可进一步分为 I-C 和 I-N 亚组,I-N 亚组 N 端 WRKY 七肽域和锌指结构均分别为 WRKYGQK 和 C-X4-C-X22-H-X1-H 形式。I-C 亚组 C 端 WRKY 七肽域和锌指结构均分别为 WRKYGQK 和 C-X4-C-X23-H-X1-H 形式。

II 类含有 1 个 WRKYRQK 结构域,且锌指结构为 C2H2,共筛选出 12 个基因,占比 60%。根据 II 组成员 WRKY 结构域蛋白序列的相似性,进一步将 II 组成员划分为 5 个亚组,其中 II-a 有 1 个,II-b 有 1 个,II-c 有 3 个,II-d 有 5 个,II-e 有 2 个。II-a、II-b、II-d、II-e 4 个亚组中,WRKY 七肽域和锌指结构均分别为 WRKYGQK 和 C-X5-C-

X23-H-X1-H 形式,而 II-c 的 3 个基因 WRKY 七肽域和锌指结构均为 WRKYGQK 和 C-X4-C-X23-H-X1-H 形式,与 I 类 C 端而非 N 端的 WRKY 结构

域更相似,暗示第 I 类 WRKY 结构域的 C 端与第 II-c 的 WRKY 结构域起相同的作用,构成 DNA 结合域<sup>[16]</sup>。

表 1 漆树 WRKY 蛋白理化性质分析

Table 1 Physicochemical properties of WRKY protein in lacquer trees

基因名称	基因 ID	分子量	氨基酸数	理论等电点	不稳定指数	脂肪系数	亲疏水性
<i>Tv</i> WRKY1	PB_c0_g16819	49.61	453	7.17	59.16	50.99	-0.873
<i>Tv</i> WRKY2	PB_c0_g16400	66.63	618	5.85	46.04	59.69	-0.701
<i>Tv</i> WRKY3	PB_c0_g16922	62.20	572	6.39	48.97	60.02	-0.721
<i>Tv</i> WRKY4	PB_c0_g17068	55.03	503	5.81	47.29	60.93	-0.978
<i>Tv</i> WRKY5	PB_c0_g17290	57.18	525	8.54	58.95	49.79	-0.895
<i>Tv</i> WRKY6	PB_c0_g200	37.28	331	9.81	62.01	60.94	-0.756
<i>Tv</i> WRKY7	PB_c0_g234	52.93	485	5.51	64.93	61.51	-0.877
<i>Tv</i> WRKY8	PB_c0_g2827	41.65	369	5.29	51.78	63.39	-0.706
<i>Tv</i> WRKY9	PB_c0_g2845	23.40	203	10.54	65.86	69.21	-0.667
<i>Tv</i> WRKY10	PB_c0_g2868	36.89	328	8.58	62.77	48.17	-1.037
<i>Tv</i> WRKY11	PB_c0_g4275	38.23	348	5.80	49.46	50.69	-0.72
<i>Tv</i> WRKY12	PB_c0_g4742	39.81	363	9.53	46.92	65.81	-0.662
<i>Tv</i> WRKY13	PB_c0_g4752	37.16	340	9.42	47.15	58.79	-0.592
<i>Tv</i> WRKY14	PB_c0_g4803	39.28	358	9.35	50.97	65.61	-0.512
<i>Tv</i> WRKY15	PB_c0_g6207	35.46	311	5.80	56.25	68.36	-0.782
<i>Tv</i> WRKY16	PB_c0_g6251	36.74	324	6.24	57.40	68.27	-0.798
<i>Tv</i> WRKY17	PB_c0_g6257	34.82	312	6.92	59.62	64.04	-0.745
<i>Tv</i> WRKY18	PB_c0_g6453	32.98	297	6.26	59.59	60.07	-0.698
<i>Tv</i> WRKY19	PB_c0_g6910	30.20	264	4.74	54.05	56.06	-0.980
<i>Tv</i> WRKY20	PB_c0_g937	38.97	348	9.72	55.23	67.21	-0.771

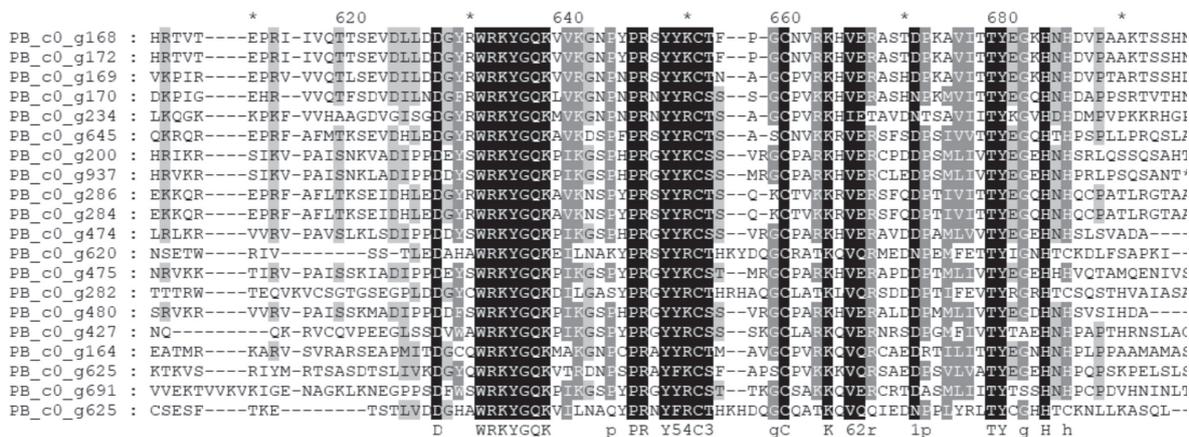


图 1 WRKY 蛋白 C 端保守结构域分析

Fig. 1 Conserved domain analysis of WRKY protein c-terminal

III 类含有 1 个 WRKY 结构域,锌指结构为 C-X7-C-X23-H-X1-C,共 3 个基因,占比 15%,只具有 C2HC 类型的锌指结构。III 类 3 个基因除 WRKYGQK 保守结构域外,靠近 N 端序列匹配度较高。在漆树 WRKY 转录因子中,未发现存在变异 WRKY 结构域,包括变异 WRKYGQK 以及锌指结构(图 2)。

2.3 漆树 WRKY 蛋白保守位点分析

对漆树基因分析可知,不同类型的 WRKY 蛋

白具有不同的保守基序数量和种类(图 3)。20 个漆树 WRKY 蛋白包含 77 个保守基序,共 8 种。基序 1 和基序 2 存在于所有基因中,位于 WRKY 蛋白 C 端,说明基序 1 和基序 2 是漆树 WRKY 基因家族的核心保守结构域。

在 I 类的 5 个基因中,基因 *Tv*WRKY1 和 *Tv*WRKY5 两个基因具有完全相同的 8 个保守基序,与基因 *Tv*WRKY4 及 *Tv*WRKY7 相比,基因 *Tv*WRKY3 具有 5 个保守基序,多出 Motif8,说明

在 I 类基因中,3 个基因所共有的基序 1、2、3、5 高度保守。在 II 类基因中,II-a 基因 *TvWRKY17* 具有 2 个保守基序。II-b 基因 *TvWRKY2* 具有 4 个保守基序。II-c 基因 *TvWRKY9*、*TvWRKY10*、*TvWRKY18* 都具有 3 个保守基序,且保守基序完全相同。II-d 基因 *TvWRKY12*、*TvWRKY13*、*TvWRKY14* 都具有 4 个保守基序,且保守基序完全相同,*TvWRKY20* 基因具有 5 个保守基序,但基

序类型与其他 3 个基因完全相同,而 *TvWRKY6* 具有 6 个保守基序,基序 Motif5 不存在于另外 4 个基因,说明在 II 类基因中,4 个基因相对保守,其中基序 10 为 II-d 中特有。II-e 中 *TvWRKY11* 和 *TvWRKY19* 分别具有 2 和 3 个保守基序。

在 III 类基因中,*TvWRKY8*、*TvWRKY15* 和 *TvWRKY16* 分别具有 2、2 和 3 个保守基序,其中基序 3 为基因 *TvWRKY16* 特有(图 4)。

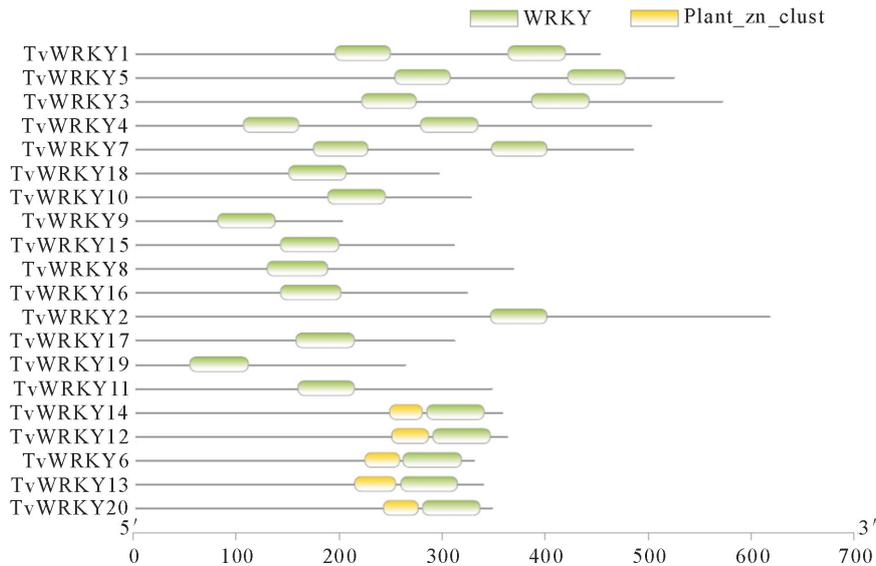


图 2 WRKY 蛋白保守结构域

Fig. 2 Conserved domain of WRKY protein



图 3 漆树 WRKY 保守基序结构

Fig. 3 WRKY conserved motif structure of Sumac

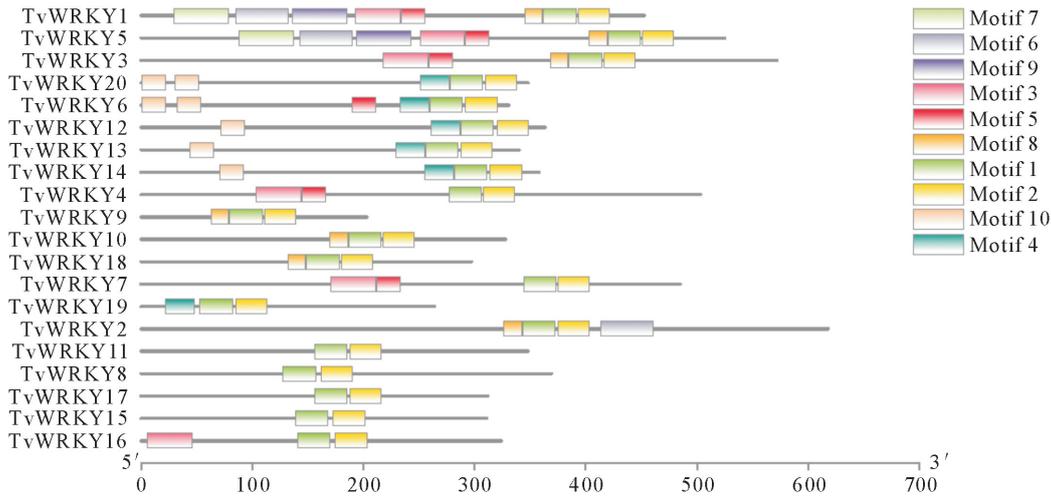


图 4 WRKY 保守基序

Fig. 4 WRKY conserved Motif (Motif)

### 2.4 漆树 WRKY 转录因子同源性分析

在漆树 WRKY 系统发育树中(图 5), I-N 中的基因 *TvWRKY1* 和 *TvWRKY5* 具有同源性, *TvWRKY3* 和 *TvWRKY4* 具有同源性, I-C 中, 基因 *TvWRKY1* 和 *TvWRKY5* 的进化源与 *TvWRKY3* 具有同源性, 结果均与保守基序的分析相一致, 也验证了 N 端和 C 端两种不同锌指结构。II 类基因中, II-a 和 II-b 进化关系较近, 而 II-d 和 II-e 进化关系较近。II-a、II-b、II-d、II-e 和 III 类由共同祖先进化而成, 均具有高度保守基序 1 和 2。II-c 3 个基因与 I-N 具有高度同源性, 与保守结构域分析一致。III 类中, 基因 *TvWRKY15* 和 *TvWRKY16* 由同源分化而来, 增加了保守基序 Motif 3。

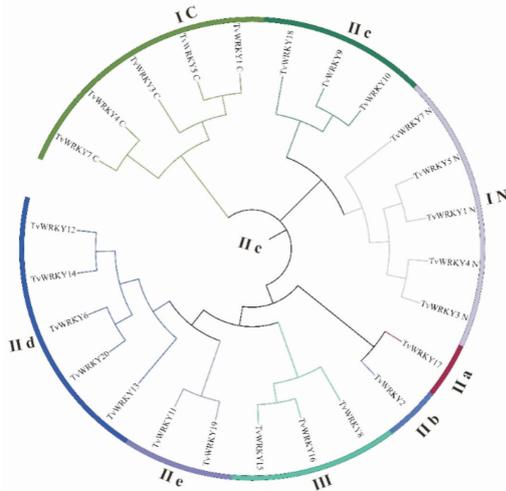


图 5 漆树 WRKY 系统发育树

Fig. 5 WRKY phylogenetic tree of Sumac

在漆树与拟南芥 WRKY 系统发育树中(图 6), 通过引入拟南芥 WRKY 蛋白参与构建进化树, 对漆树 WRKY 结构域和 7 种类型 14 个不同拟南芥

WRKY 结构域进行对比, 分析漆树 WRKY 蛋白的进化关系, 发现同一物种的 WRKY 蛋白序列相似性较高, 聚集在同一分支上。进化树中相距较近的 WRKY 因子往往具有相似功能, 基于此, 对漆树 WRKY 转录因子功能进行预测分析。

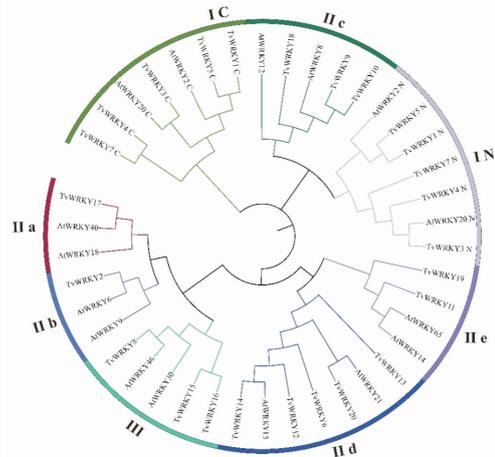


图 6 漆树与拟南芥 WRKY 系统发育树

Fig. 6 WRKY phylogenetic trees of Sulacquer and Arabidopsis

### 2.5 漆树 WRKY 表达模式分析

对漆树的根、茎、叶 3 种组织的 FPKM 数据分析, 得到漆树 WRKY 基因在漆树不同部位的差异表达热图(图 7)。在漆树的叶中, 基因 *TvWRKY2*、*TvWRKY11*、*TvWRKY14*、*TvWRKY16*、*TvWRKY17*、*TvWRKY19*、*TvWRKY8*、*TvWRKY15* 表达水平较高, 其中基因 *TvWRKY16*、*TvWRKY17*、*TvWRKY19* 表达水平最高。相较于漆树的叶, 根中基因 *TvWRKY13*、*TvWRKY18*、*TvWRKY6*、*TvWRKY9*、*TvWRKY10* 表达水平上调, 其中 *TvWRKY13*、*TvWRKY6*、*TvWRKY9*、*TvWRKY10* 表达水平最高。在漆树茎中, 基因 *TvWRKY3* 表达水平较高, 其他基因表达水平均较低。

在所有漆树 WRKY 基因中, *TvWRKY20* 在上述所有组织中均未检测到,可能是由于存在假基因,或者 *TvWRKY20* 只在漆树特定的环境或特定生长发育阶段才会表达。在与拟南芥 WRKY 蛋白同源对比分析中,推测基因 *TvWRKY20* 可能参与到了干旱胁迫的响应中,因此 *TvWRKY20* 可能是干旱胁迫环境下选择表达的基因。

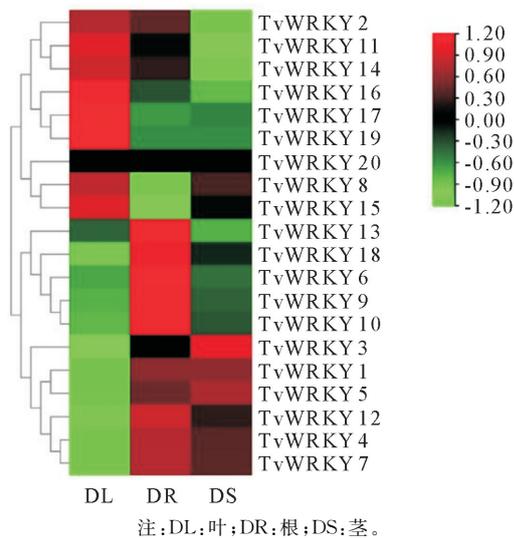


图 7 漆树 WRKY 基因差异表达情况

Fig. 7 Differential expression of WRKY gene in Sumac

### 3 结论与讨论

#### 3.1 结论

本研究通过生物信息学方法,分析漆树 WRKY 转录因子家族,发现在生长发育阶段中, *TvWRKY3* 和 *TvWRKY5* 可能在漆树种子萌发阶段发挥了重要作用, *TvWRKY8* 和 *TvWRKY14* 可能在漆树叶片和根的生长中发挥了重要作用,可通过转基因方法提高漆树成活率,促进漆树的生长。WRKY 基因在植物生长发育及抗逆境胁迫中有重要意义<sup>[17]</sup>,一直是研究的热点问题,但在漆树中它的研究较少,本研究在基因水平上对其展开研究,为后续深入研究 WRKY 蛋白的结构与功能奠定了基础。本研究对于蛋白质结构以及染色体定位等相关研究没有深入,对漆树 WRKY 转录因子家族以及其他转录因子家族的分析有待进一步探索。

#### 3.2 讨论

本研究通过实验室获得的漆树转录组数据,对漆树 WRKY 家族开展生物学分析,与拟南芥 WRKY 转录因子对比可以发现,WRKY 基因在进化过程中不断扩张丰富,同时引入新的功能<sup>[18]</sup>。漆树 WRKY 共筛选鉴定出共 20 条 WRKY 基因序列。对漆树 WRKY 编码蛋白理化性质分析,20 个 WRKY 基因编码的蛋白大小不等,最大的编码蛋白

分子量为 66.63Da,由 618 个氨基酸构成。20 个 *TvWRKY* 理论等电点范围为 4.74 到 10.54,说明不同的 WRKY 蛋白在不同的微环境下发挥了不同的功能。20 个漆树 WRKY 蛋白均不属于稳定性蛋白。所有蛋白均为亲水性蛋白。蛋白质脂肪系数大部分在 60,热稳定性较高。漆树 WRKY 家族成员符合 WRKY 家族的一贯分类,II 组基因和 III 组基因相继从 I 组分化而来。通过对漆树与拟南芥 WRKY 蛋白同源分析,推测在生物胁迫中,基因 *TvWRKY9* 和 *TvWRKY8* 与生物胁迫作用有关, *TvWRKY9* 可能参与了对烟草花叶病毒(TMV)的防御响应<sup>[19]</sup>, III 类中的 *TvWRKY8* 可能增强了植株对细菌斑点病的抗性<sup>[20]</sup>。在非生物胁迫作用中, I 中的基因 *TvWRKY5* 作用可能与种子萌发抑制的激素调节有关<sup>[21]</sup>。II-a 中的基因 *TvWRKY17* 参与到脱落酸在种子萌发中的负调控<sup>[19]</sup>。II-b 中的基因 *TvWRKY2* 在低磷环境下参与负调控<sup>[21]</sup>。II-d 中的基因 *TvWRKY14* 可能会参与渗透相关胁迫中<sup>[23]</sup>。II-e 中的基因 *TvWRKY11* 在碳元素不足时发生反应,调节碳元素的吸收<sup>[24]</sup>。III 中的基因 *TvWRKY8* 与 *AtWRKY46* 具有同源性, *AtWRKY46* 在植物干旱胁迫中充当负调控因子<sup>[18]</sup>。在植物生长发育中表, *TvWRKY3* 和 *TvWRKY5* 可能参与到调节种子萌发中, *TvWRKY2* 与 *AtWRKY6* 具有同源性,可能与植物叶片衰老有关<sup>[21]</sup>, *TvWRKY14* 具有促进植物叶片生长的功能, *AtWRKY12* 参与调控木髓部次级细胞壁的形成,基因 *TvWRKY18* 可能与其有关,而 *TvWRKY8* 与 *AtWRKY46* 具有同源性,可能影响到侧根发育。

在漆树 WRKY 基因表达模式分析中,得到了漆树不同部位基因表达差异,在漆树的叶中,基因 *TvWRKY2*、11、14、16、17、19、8、15 表达水平上调;根中基因 *TvWRKY13*、18、6、9、10 表达水平上调;在漆树茎中,基因 *TvWRKY3* 表达水平较高,其他基因表达水平均较低。在所有基因中, *TvWRKY20* 在上述所有组织中均未检测到,可能是由于存在假基因,根据与拟南芥 WRKY 蛋白同源对比分析,推测基因 *TvWRKY20* 可能参与到了干旱胁迫的响应中<sup>[25-26]</sup>,因此 *TvWRKY20* 可能是干旱胁迫环境下选择表达的基因,受环境影响选择性表达,为之后关于研究漆树干旱胁迫应答提供了候选基因。

#### 参考文献:

- [1] 张鹏,廖声熙,崔凯,等. 中国漆树资源与品种现状及产业发展前景[J]. 世界林业研究, 2013, 26(2): 65-69.  
ZHANG P, LIAO S, CUI K, et al. Resources and species of *Toxi-*

- codendron* and its industry development prospects in China[J]. World Forestry Research, 2013, 26(2): 65-69. (in Chinese)
- [2] 潘垒. 中国漆艺新风向之我见[J]. 中国生漆, 2018, 37(3): 45-48.
- [3] WANI S H, ANAND S, SINGH B, *et al.* WRKY transcription factors and plant defense responses: latest discoveries and future prospects[J]. Plant Cell Reports, 2021, 40(7): 1071-1085.
- [4] LIANG M, JIANG J. Analysis of carotenogenic genes promoters and WRKY transcription factors in response to salt stress in *Dunaliella bardawil*[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1).
- [5] 李珍, 华秀婷, 张积森. 高等植物 WRKY 转录因子家族的演化及功能研究进展[J]. 热带作物学报, 2018, 39(2): 405-414.
- LI Z, HUA X T, ZHANG J S. Evolution and gene function of WRKY transcription factor families in higher plants[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(2): 405-414. (in Chinese)
- [6] 乔刚, 李莉, 姜山. 小立碗藓 WRKY 基因家族生物信息学分析[J]. 广西植物, 2022, 42(2): 267-276.
- [7] 任永娟, 王东姣, 苏亚春, 等. 植物 WRKY 转录因子: 结构、分类、进化和功能[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(1): 105-124.
- REN Y J, WANG D J, SU Y C, *et al.* Structure, classification, evolution and function of plant WRKY transcription factors[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2021, 29(1): 105-124. (in Chinese)
- [8] WANG N, XU S, SUN Y, *et al.* The cotton WRKY transcription factor (GhWRKY33) reduces transgenic *Arabidopsis* resistance to drought stress[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1).
- [9] XU Y, SUN P, TANG X, *et al.* Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1).
- [10] 陈亮, 崔芬芬, 王勇飞, 等. 基于转录组金银花 WRKY 转录因子的挖掘与分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(6): 1780-1787.
- CHEN L, CUI F F, WANG Y F, *et al.* Mining and analysis of WRKY transcription factors in transcriptome-based *Lonicera japonica* [J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(6): 1780-1787. (in Chinese)
- [11] 乔中全, 王晓明, 曾慧杰, 等. 灰毡毛忍冬 Lm4CL 基因克隆及表达分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2021, 41(5): 122-132.
- QIAO Z Q, WANG X M, CENG H J, *et al.* Clone and expression analysis of Lm4CL in *Lonicera macranthoides* Hand-Mazz[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2021, 41(5): 122-132. (in Chinese)
- [12] 谢冬冬, 王武萍, 何学高, 等. 基于转录组的漆树 MYB 转录因子的筛选及分析[J]. 西北林学院学报, 2021, 36(1): 108-116.
- XIE D D, WANG W P, HE X G, *et al.* Screening and analysis of MYB transcription factors based on transcriptome data in *Toxicodendron vernicifluum* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2021, 36(1): 108-116. (in Chinese)
- [13] 周静, 曾玫艳, 安新民. 杨树 WRKY 基因家族鉴定及其干旱胁迫响应模式分析[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(11): 2160-2173.
- ZHOU J, ZENG M Y, AN X M. Identification of populus trichocarpa WRKY gene family and its' response to drought stress[J]. Chinese Journal of Cell Biology 2019, 41(11): 2160-2173. (in Chinese)
- [14] 冯发玉, 王毅, 王丽娟, 等. 竹叶花椒 MYB 基因家族的鉴定及其表达特性的分析[J]. 经济林研究, 2021, 39(4): 148-157.
- [15] 徐嘉娟, 朱亚艳, 李芳, 等. 基于转录组的油茶 DHHC 型锌指蛋白基因家族的鉴定及分析[J]. 西北林学院学报, 2022, 37(1): 81-88.
- XU J J, ZHU Y Y, LI F, *et al.* Identification and analysis of zinc finger protein family genes with DHHC-type based on the transcriptome data in *Camellia oleifera* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2022, 37(1): 81-88. (in Chinese)
- [16] 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.
- [17] CHEN C, CHEN X, HAN J, *et al.* Genome-wide analysis of the WRKY gene family in the cucumber genome and transcriptome-wide identification of WRKY transcription factors that respond to biotic and abiotic stresses[J]. BMC Plant Biol., 2020, 20(1): 443.
- [18] CHEN F, HU Y, VANNOZZI A, *et al.* The WRKY transcription factor family in model plants and crops[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2017, 36(5/6): 311-335.
- [19] CHEN L, ZHANG L, YU D. Wounding-induced WRKY8 is involved in basal defense in *Arabidopsis* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2010, 23(5): 558-565.
- [20] CHEN J, NOLAN T, YE H, *et al.* Arabidopsis WRKY46, WRKY54 and WRKY70 Transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought response [J]. The Plant Cell, 2017; 364-2017.
- [21] LEI R, LI X, MA Z, *et al.* Arabidopsis WRKY2 and WRKY34 transcription factors interact with VQ20 protein to modulate pollen development and function[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2017, 91(6): 962-976.
- [22] YE Q, WANG H, SU T, *et al.* The Ubiquitin E3 ligase PRU1 regulates WRKY6 degradation to modulate Phosphate homeostasis in response to low-Pi stress in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2018, 30(5): 1062-1076.
- [23] VANDERAUWERA S, VANDENBROUCKE K, INZÉ A, *et al.* AtWRKY15 perturbation abolishes the mitochondrial stress response that steers osmotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(49): 20113-20118.
- [24] 邹养军, 史书婷, 龚大庆. WRKY 转录因子与植物逆境响应[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(7): 674-680.
- ZOU Y J, SHI S T, GONG X Q. The role of WRKY transcription factors in biotic and abiotic stress responses in plants [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 33(7): 674-680. (in Chinese)
- [25] HE G, XU J, WANG Y, *et al.* Drought-responsive WRKY transcription factor genes TaWRKY1 and TaWRKY33 from wheat confer drought and/or heat resistance in *Arabidopsis* [J]. BMC Plant Biology, 2016, 16(1): 1-16.
- [26] 王艺, 张尚昆, 赵翔, 等. 核桃 TT1 类转录因子的筛选及干旱响应分析[J]. 西北林学院学报, 2020, 35(1): 86-93.
- WANG Y, ZHANG S K, ZHAO X, *et al.* Identification and expression of the TT1-like transcription factor from juglans regia under drought stress[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2020, 35(1): 86-93. (in Chinese)