

真核藻类 *WRKY* 基因家族的鉴定及表达分析

宋亚楠^{1,2}, 罗涛¹, 赵春超¹, 季春丽¹, 张春辉¹, 马瑞燕², 崔红利¹, 李润植¹

1 山西农业大学 农学院 分子农业与生物能源研究所, 山西 太谷 030801

2 山西农业大学 植物保护学院, 山西 太谷 030801

宋亚楠, 罗涛, 赵春超, 季春丽, 张春辉, 马瑞燕, 崔红利, 李润植. 真核藻类 *WRKY* 基因家族的鉴定及表达分析. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1965-1980.

SONG YN, LUO T, ZHAO CC, JI CL, ZHANG CH, MA RY, CUI HL, LI RZ. Identification and expression analysis of *WRKY* gene family in eukaryotic algae. Chin J Biotech, 2022, 38(5): 1965-1980.

摘要: *WRKY* 是植物特有的一个转录因子超家族, 参与植物生长发育、物质代谢以及生物和非生物胁迫响应等多种生物学过程的调控。尽管 *WRKY* 转录因子基因已在高等植物广泛表征, 然而有关真核藻类 *WRKY* 却知之甚少。采用多序列比对、系统进化和保守域分析等技术对 30 种真核藻类 *WRKY* 进行全基因组鉴定, 共获得 24 个 *WRKY* 成员, 均来自绿藻门 (Chlorophyta) 藻类。红藻门 (Rhodophyta)、灰藻门 (Glaucophyta) 和硅藻门 (Bacillariophyta) 等藻类未检测到 *WRKY*。24 个 *WRKY* 成员均具有保守结构域七肽序列 *WRKYGQ* (E/A/H/N) K 和锌指基序 C-X4-5-C-X22-23-H-X-H, 分别归类于 I、II a、II b 和 R 组。高含虾青素的雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 含有 2 个 I 类 *WRKY* 成员 (*HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2*)。进一步克隆 *HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 基因编码序列, 构建原核表达载体在大肠杆菌 BL21(DE3) 中诱导表达, 并通过 Ni-NTA 亲和层析获得纯化的 *HaeWRKY* 融合蛋白。雨生红球藻在正常培养条件下, *HaeWRKY-1* 表达量显著高于 *HaeWRKY-2*。高光逆境胁迫显著上调 *HaeWRKY-1* 表达和下调 *HaeWRKY-2* 表达。*HaeWRKY* 基因启动子含有多个光、乙烯、脱落酸 (abscisic acid, ABA) 以及逆境响应顺式元件。特别在 *HaeWRKY-2* 启动子区未检测到 W-box 顺式元件, 但 *HaeWRKY-1* 和控制虾青素生物合成关键酶基因 *HaeBKT*、*HaePSY* 基因启动子含有 W-box 元件。基于本研究及前人的

Received: November 1, 2021; **Accepted:** January 12, 2022; **Published online:** January 14, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31902394, 31902344); Outstanding Doctor to Work in Shanxi Province Research Project, China (SXYBKY2019036, SXYBKY2019037); Science and Technology Innovation Planning Project of Shanxi Agricultural University (2018YJ16, 2016YJ01, 2020BQ17); Scientific and Technological Innovation Programs of Higher Education Institutions in Shanxi Province, China (2021L119, 2019L0376, 2020L0135)

Corresponding authors: LI Runzhi. E-mail: rli2001@126.com

CUI Hongli. E-mail: cuihongli2005@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31902394, 31902344); 山西省优秀博士来晋工作奖励资金科研项目 (SXYBKY2019036, SXYBKY2019037); 山西农业大学科技创新基金 (博士启动) 项目 (2018YJ16, 2016YJ01, 2020BQ17); 山西省高等学校科技创新计划项目 (2021L119, 2019L0376, 2020L0135)

发现, 我们推测高光胁迫下 *HaeWRKY-2* 低表达可能导致 *HaeWRKY-1* 的上调表达, *HaeWRKY-1* 进而上调虾青素合成关键基因 (*HaeBKT*、*HaePSY* 等) 表达, 促进虾青素合成积累。这为深入解析雨生红球藻高光胁迫响应及虾青素合成的调控机制提供了新思路。

关键词: WRKY 转录因子; 真核微藻; 雨生红球藻; 原核表达; 高光胁迫; 虾青素

Identification and expression analysis of *WRKY* gene family in eukaryotic algae

SONG Yanan^{1,2}, LUO Tao¹, ZHAO Chunchao¹, JI Chunli¹, ZHANG Chunhui¹, MA Ruiyan², CUI Hongli¹, LI Runzhi¹

1 Institute of Molecular Agriculture and Bioenergy, College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

2 College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

Abstract: WRKY is a superfamily of plant-specific transcription factors, playing a critical regulatory role in multiple biological processes such as plant growth and development, metabolism, and responses to biotic and abiotic stresses. Although *WRKY* genes have been characterized in a variety of higher plants, little is known about them in eukaryotic algae, which are close to higher plants in evolution. To fully characterize algal *WRKY* family members, we carried out multiple sequence alignment, phylogenetic analysis, and conserved domain prediction to identify the *WRKY* genes in the genomes of 30 algal species. A total of 24 *WRKY* members were identified in Chlorophyta, whereas no *WRKY* member was detected in Rhodophyta, Glaucophyta, or Bacillariophyta. The 24 *WRKY* members were classified into I, II a, II b and R groups, with a conserved heptapeptide domain WRKYGQ(E/A/H/N)K and a zinc finger motif C-X4-5-C-X22-23-H-X-H. *Haematococcus pluvialis*, a high producer of natural astaxanthin, contained two *WRKY* members (*HaeWRKY-1* and *HaeWRKY-2*). Furthermore, the coding sequences of *HaeWRKY-1* and *HaeWRKY-2* genes were cloned and then inserted into prokaryotic expression vector. The recombinant vectors were induced to express in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells and the fusion proteins were purified by Ni-NTA affinity chromatography. *HaeWRKY-1* had significantly higher expression level than *HaeWRKY-2* in *H. pluvialis* cultured under normal conditions. High light stress significantly up-regulated the expression of *HaeWRKY-1* while down-regulated that of *HaeWRKY-2*. The promoters of *HaeWRKY* genes contained multiple *cis*-elements responsive to light, ethylene, ABA, and stresses. Particularly, the promoter of *HaeWRKY-2* contained no W-box specific for WRKY binding. However, the W-box was detected in the promoters of *HaeWRKY-1* and the key enzyme genes *HaeBKT* (β -carotene ketolase) and *HaePSY* (phytoene synthase) responsible for astaxanthin biosynthesis. Considering these findings and the research progress in the related fields, we hypothesized that the low expression of *HaeWRKY-2* under high light stress may lead to the up-regulation of *HaeWRKY-1* expression. *HaeWRKY-1* may then up-regulate the expression of the key genes (*HaeBKT*, *HaePSY*, etc.) for astaxanthin biosynthesis, consequently promoting astaxanthin

enrichment in algal cells. The findings provide new insights into further analysis of the regulatory mechanism of astaxanthin biosynthesis and high light stress response of *H. pluvialis*.

Keywords: WRKY transcription factor; eukaryotic algae; *Haematococcus pluvialis*; prokaryotic expression; high light stress; astaxanthin

转录因子 (transcription factor, TF) 是生物体内广泛存在的一类调节蛋白, 通过与靶基因启动子区顺式元件相互作用, 调控 RNA 转录和表达^[1]。WRKY 蛋白是最大、最重要的一类植物特异性 TF 家族, 具有多种生物学功能。自从在甘薯 (*Ipomoea batatas*) 中研究发现第一个 WRKY 基因 (*SPF1*) 后^[2], 已从多种植物中检测到 WRKY 基因家族的成员。例如, 菠萝 (*Ananas comosus*)^[3]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[4]、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*)^[5]、奇异果 (*Actinidia*)^[6]、香蕉 (*Pratylenchus coffeae*)^[7]、亚麻荠 (*Camelina sativa*)^[8] 和油菜 (*Brassica napus*)^[9] 分别有 54、74、88、97、153、224 和 287 个 WRKY TFs 成员。与高等植物相比, 在真核藻类中仅在莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 中鉴定到一个 WRKY 基因^[10], 而其他藻类 WRKY 还未见报道。

WRKY 蛋白在调控植物某些程序性代谢过程和途径方面发挥着重要而独特的作用, 特别是参与调控植物对生物和非生物胁迫的应答^[11-13]。例如, 陆地棉 *GhWRKY15* 基因在烟草中的过表达可影响植物的生长发育, 尤其是茎伸长, 且转基因植株比野生型烟草对病毒和真菌感染表现出更高的抗性^[14]。番茄 *SlWRKY23* 基因表达可改变根对乙烯、生长素和茉莉酸的敏感性, 并影响转基因拟南芥植株地上部分的生长, 转基因植株叶片增多, 花期缩短^[15]。大豆 *GmWRKY45* 在拟南芥中过表达可使植株对磷和盐胁迫的响应更积极, 也会导致生育能力的变化^[16]。大豆 *GmWRKY12* 参与干旱、盐碱、脱落酸 (abscisic

acid, ABA) 和水杨酸胁迫响应, 该基因过表达增强了转基因大豆幼苗对干旱和盐胁迫的耐受性^[17]。上述研究表明, 来自不同植物的 WRKY 成员数量不同且功能多样。目前, 关于 WRKY 基因在藻类中的生物学功能还未解析。

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 是一种单细胞淡水绿藻, 它能在不利条件下迅速形成囊状 (被厚膜包围) 适应极端生存条件^[18]。雨生红球藻也是自然界中已知天然虾青素含量最高的生物^[19]。虾青素是一种介导藻细胞非生物胁迫应答的次生类胡萝卜素 (酮式类胡萝卜素), 其抗氧化活性超强, 是维生素 E 的 500 倍。虾青素已广泛应用于食品、医药和美容等领域^[20]。逆境胁迫条件 (高光、高盐度和营养胁迫等) 能有效促进雨生红球藻高水平合成积累虾青素^[21]。哪些转录因子参与调控雨生红球藻细胞胁迫应答? 特别是哪些转录因子参与调控虾青素合成与积累? 雨生红球藻是否有 WRKY 基因? 回答这些问题有助于深入解析雨生红球藻胁迫应答和虾青素合成机制, 以及建立优化的雨生红球藻培养体系高效生产虾青素。

为此, 本文利用现已公布的 30 种真核藻类基因组数据库, 对藻类 WRKY TF 家族成员进行全基因组鉴定和分类, 系统解析 WRKY 成员在真核藻类中的分布、结构和进化特征等。为进一步探究 WRKY 转录因子是否参与雨生红球藻的生长代谢调控, 我们分析了雨生红球藻 *HaeWRKY* 基因及其编码蛋白特征, 克隆 *HaeWRKY* 基因并构建 *HaeWRKY* 基因的原核表达载体, 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*)

BL21(DE3) 中诱导表达并获取纯化蛋白。检测 *HaeWRKY* 基因启动子顺式作用元件, 分析其可能参与的调控路径。着重研究 *HaeWRKY* 基因在高光胁迫下的转录表达谱。本研究为解析光合真核生物 WRKY 的起源和进化提供了重要的见解, 有助于全面理解藻类 WRKY 家族成员的生物学功能, 特别是参与调控藻细胞非生物胁迫应答的分子机制。

1 材料与方法

1.1 WRKY 序列鉴定和分析

30 种真核藻类 (表 1) 全基因组蛋白序列从 DOE Joint Genome Institute (Walnut Creek, CA, USA; <http://genome.jgi.doe.gov/>) 获得。红藻 (*Cyanidioschyzon merolae*) 全基因组蛋白序列从 *Cyanidioschyzon merolae* Genome Project (<http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp>) 获得。所有获得的序列使用 makeblastdb 程序创建数据库^[22]。本研究应用了 3 种方法来鉴定 WRKY 同源序列。首先, 我们使用 JGI 或 *C. merolae* 基因组注释来确定藻类 WRKY 蛋白序列。其次, 使用已鉴定拟南芥 WRKY 蛋白为检索序列, 应用 BLASTP 检索工具获得本地所有藻类 WRKY 蛋白序列^[22], 阈值设为 $1e^{-10}$, 获得蛋白集。第三, 基于 HMMER 程序, 应用源自 WRKY 保守蛋白序列 (WRKYGQK) 的 HMM 模型检索藻类 WRKY 蛋白序列^[23]。最后, 通过 SMART 和 Pfam 分析检查提取到的 WRKY 蛋白序列, 将结果出现的假阳性序列删除^[24-25]。

使用 ClustalW 对所有 WRKY 序列进行多序列比对。通过 MEGA 7.0 构建同源进化树 (邻接法), Bootstrap 设定为 1 000。使用 ExPASy (<https://www.expasy.org/>) 在线网址预测蛋白质的分子量、等电点、信号肽和跨膜区等蛋白理化特性^[26]。使用在线软件 SOPMA ([https://npsa-](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)

[prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 预测蛋白的二级结构。利用在线软件 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 预测蛋白的三级结构。从 NCBI 基因组数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Haematococcus+Pluvialis>) 中分别截取 *HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 翻译起始密码 ATG 上游 2 000 bp 启动子序列, 用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 数据库预测启动子顺式作用元件。

1.2 *HaeWRKY* 基因在胁迫条件下的表达分析

试验所用雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis* Flotow 1844) 购自英国 CCAP 藻种库 (<https://www.ccap.ac.uk/>)。雨生红球藻使用 BBM 培养基 (Bold's Basal medium), 在光强 $25 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (LED 白光)、温度 $(22 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 、12 h/12 h 的光/暗周期条件下静置培养, 每 8 h 摇 1 次。

选取培养至对数期的雨生红球藻细胞于黑暗下处理 24 h, 离心 ($7\ 000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min) 收集后用新鲜培养基重悬藻细胞, 分别于正常培养 (LED 白光, $25 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)、高白光 ($390\text{--}770 \text{ nm}$, $500 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$) 和高蓝光 ($420\text{--}500 \text{ nm}$, $500 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$) 条件下处理 72 h。最后, 离心 ($4 \text{ }^\circ\text{C}$ $7\ 000 \times g$, 10 min) 收集藻细胞, 用 PBS 缓冲液冲洗 2 次, 将样品于液氮速冻后存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 。每组实验设置 3 个生物学重复, 并进行转录组测序^[27]。以 Reads Per Kilobase per Million mapped reads (RPKM) 分析 2 个雨生红球藻 *HaeWRKY-1* (MN078149) 和 *HaeWRKY-2* (MN078150) 基因表达水平, 使用 Origin 8 作图。数据在 PTNR0.01 时被认为有显著差异 (单因素方差分析)。

1.3 原核表达载体构建

根据转录组数据序列信息, 设计特异性引物 *HaeWRKY-1F* 和 *HaeWRKY-1R*、*HaeWRKY-2F*

和 *HaeWRKY-2R* (表 2) 扩增编码蛋白质的基因序列。将目标片段纯化后, 插入到克隆载体 pMD18-T 中保存。所有引物 (表 2) 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。使用引物 *HaeWRKY-1-28a-F/R* 和 *HaeWRKY-2-28a-F/R* (表 2) 从克隆载体

pMD18-*HaeWRKY-1* 和 pMD18-*HaeWRKY-2* 扩增 *HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 基因。用内切酶 (*EcoR* I 和 *Xho* I) 酶切扩增产物和 pET-28a(+) 质粒, 构建重组表达载体 pET28a(+)-*HaeWRKY-1* 和 pET28a(+)-*HaeWRKY-2*。

表 1 本研究所用藻类物种及其分类

Table 1 Algal species used in this study

Species	Taxon
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlorophyta; Chlorophyceae
<i>Volvox carteri</i>	Chlorophyta; Chlorophyceae
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Chlorophyta; Chlorophyceae
<i>Dunaliella salina</i>	Chlorophyta; Chlorophyceae
<i>Coccomyxa</i> sp. C-169	Chlorophyta; Trebouxiophyceae
<i>Chlorella vulgaris</i>	Chlorophyta; Trebouxiophyceae
<i>Chlorella</i> NC64A	Chlorophyta; Trebouxiophyceae
<i>Chlorella protothecoides</i>	Chlorophyta; Trebouxiophyceae
<i>Micromonas pusilla</i>	Chlorophyta; Mamiellophyceae
<i>Micromonas</i> sp. RCC299	Chlorophyta; Mamiellophyceae
<i>Ostreococcus tauri</i>	Chlorophyta; Mamiellophyceae
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	Chlorophyta; Mamiellophyceae
<i>Ostreococcus</i> sp. RCC809	Chlorophyta; Mamiellophyceae
<i>Cyanophora paradoxa</i>	Glaucophyta; Glaucophyceae
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Rhodophyta; Bangiophyceae
<i>Galdieria sulphuraria</i>	Rhodophyta; Bangiophyceae
<i>Guillardia theta</i>	Cryptophyta; Cryptophyceae
<i>Emiliana huxleyi</i> CCMP1516	Haptophyta; Haptophyceae
<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP 1335	Bacillariophyta; Coscinodiscophyceae
<i>Thalassiosira oceanica</i>	Bacillariophyta; Coscinodiscophyceae
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CAPP1055	Bacillariophyta; Bacillariophyceae
<i>Fragilariopsis cylindrus</i>	Bacillariophyta; Bacillariophyceae
<i>Pseudo-nitzschia multiseriata</i> CLN-47	Bacillariophyta; Pennatae
<i>Nannochloropsis gaditana</i> CCMP526	Stramenopiles; Eustigmatophyceae
<i>Nannochloropsis oculata</i> CCMP525	Stramenopiles; Eustigmatophyceae
<i>Nannochloropsis granulata</i> CCMP529	Stramenopiles; Eustigmatophyceae
<i>Nannochloropsis oceanica</i> CCMPP531	Stramenopiles; Eustigmatophyceae
<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP537	Stramenopiles; Eustigmatophyceae
<i>Nannochloropsis oceanica strain</i> IMET1	Stramenopiles; Eustigmatophyceae
<i>Aureococcus anophagefferens</i>	Stramenopiles; Pelagophyceae

表 2 文中所用引物信息

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')
<i>HaeWRKY-1F</i>	ATGGAACTTGGGCAACGC
<i>HaeWRKY-1R</i>	CATGTGTGTGCCACTGAGGA
<i>HaeWRKY-2F</i>	ATGACGCCAATCAGCAGCC
<i>HaeWRKY-2R</i>	CATCTGTGTTCCACCCAAGACC
<i>HaeWRKY-1-28a-F</i>	GGAATTCATGGAACCTGGGCAACGC
<i>HaeWRKY-1-28a-R</i>	CCTCGAGCATGTGTGTGCCACTGAGGA
<i>HaeWRKY-2-28a-F</i>	GGAATTCATGACGCCAATCAGCAGCC
<i>HaeWRKY-2-28a-R</i>	CCTCGAGCATCTGTGTTCCACCCAAGACC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7t	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

1.4 融合蛋白的原核表达和纯化

将重组原核表达载体 pET28a(+)-*HaeWRKY-1* 和 pET28a(+)-*HaeWRKY-2* 分别转入大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞。挑取阳性菌落接入含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 °C 培养到 OD_{600} 达 0.6–0.8。分别在 18 °C、120×g、0.1 mmol/L 异丙基 β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导条件下培养 6、12、24 和 48 h, 离心 (6 000×g、4 °C、10 min) 收集诱导后菌液, 用 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (含 5 mmol/L 咪唑, 0.2 g/L 溶菌酶, 20 g/L DNase 和 1 mmol/L $MgCl_2$) 重悬后进行超声波法破碎, 离心 (13 100×g、4 °C、15 min) 得到上清液 (含融合蛋白)。将融合蛋白移入 Ni Sepharose 6FF 柱 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 进行纯化。用 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液溶液 (含 50–300 mmol/L 咪唑) 洗脱 His 标记的靶蛋白。使用 7% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定 *HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 融合蛋白的纯度和分子量。考马斯亮蓝 R-250 染色后用脱色液 (5% 乙醇 (V/V), 7% 冰醋酸 (V/V)) 脱色至可见蛋白条带。pET-28a(+) 质粒载体用相同的处理方法作为对照。

2 结果与分析

2.1 WRKY 转录因子在真核微藻中的分布

在 Rinerson 等和 Fernández 等绘制的生命之树及 WRKY 分布示意图基础上^[28-29], 本研究重点对在绿藻门中鉴定到的 WRKY 成员进行分类 (图 1)。由图可知, WRKY 分布广泛, 真菌 (Fungi)、变形虫 (Amoebozoa)、Fornicata、高等植物和低等植物藻类均检测到 WRKY 成员。在 30 种真核藻类中, 红藻门 (Rhodophyta)、灰藻门 (Glaucophyta) 和硅藻门 (Bacillariophyta) 等藻类未检测到 WRKY。在绿藻门 (Chlorophyta) 3 个纲 (Trebouxiophyceae、Chlorophyceae 和 Mamiellophyceae) 的 13 种绿藻中鉴定到 24 个 WRKY 成员, 且不同绿藻物种的 WRKY 成员数量不同。系统进化分析将鉴定到的藻类 24 个 WRKY 成员分为 I、II 和 R 3 个大组, II 组又分为 2 个亚组 (II a 和 II b)。4 种淡水绿藻 (Trebouxiophyceae) 各含有 1 个 I 类 WRKY 成员。5 种海洋绿藻 (Mamiellophyceae) 均含有 2 个 II 类 WRKY 成员。值得注意的是, 在淡水绿藻 (Chlorophyceae) 中, 盐藻 (*Dunaliella salina*) WRKY 成员数量最多 (5 个), 包括 4 个 II 类和 1 个 I 类 WRKY 成员;

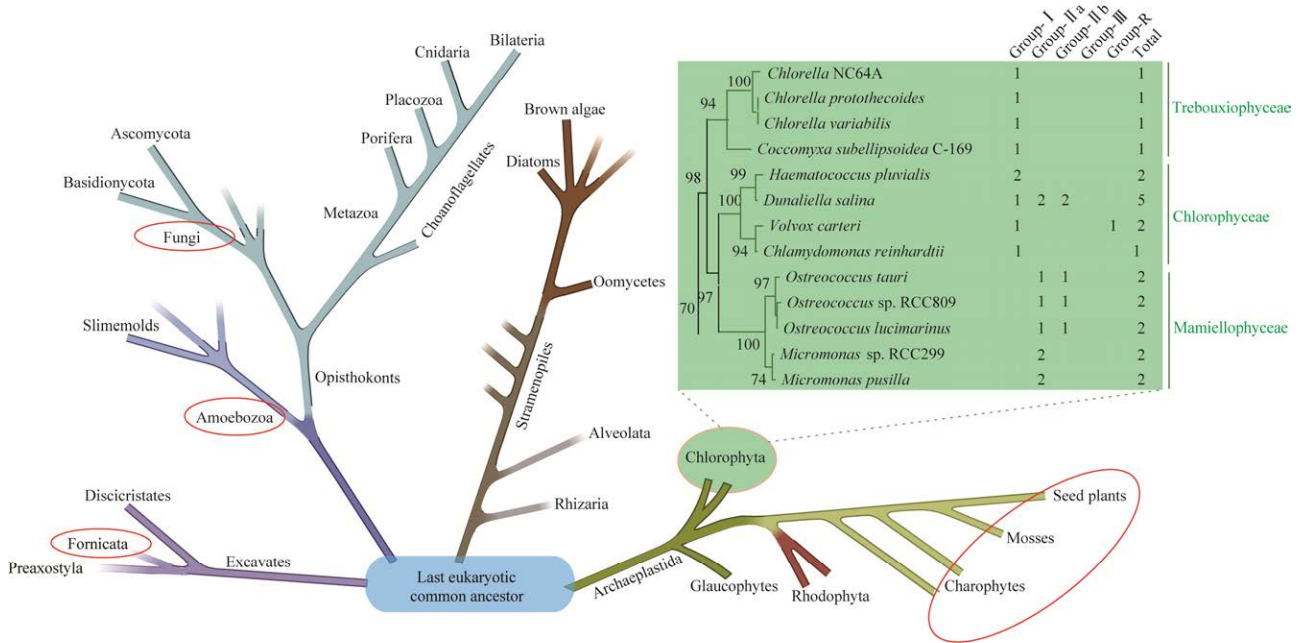


图 1 生命之树及 WRKY 转录因子的分布

Figure 1 Tree of life and distribution of WRKY transcription factors. The red circle indicates taxon containing WRKY members. The block diagram in the upper right shows the distribution of WRKY members in different species of Chlorophyta. The image has been taken and adapted from Fernandez et al. and Rinerson et al.^[28-29], with addition of a phylogenetic tree of algal WRKYs characterized in this study.

团藻 (*Volvox carteri*) 含 1 个 I 类 WRKY 成员和 1 个 R 类 WRKY 成员；雨生红球藻 (*H. pluvialis*) 含 2 个 I 类 WRKY 成员；莱茵衣藻 (*C. reinhardtii*) 含有 1 个 I 类 WRKY 成员。

2.2 藻类 WRKY 蛋白结构分析

为进一步解析这 24 个来自藻类的 WRKY 蛋白结构域，使用 SMART 在线工具对其进行结构域分析。由图 2 可知，24 个 WRKY 蛋白分别归类于 I、IIa、IIb 和 R 组。其中，9 个 WRKY 蛋白均含有 2 个 WRKY 结构域，属于 I 组。14 个 WRKY 蛋白均含有 1 个 WRKY 结构域，属于 II 组。VcaWRKY-2 蛋白划分到 R 组。所有已知的 WRKY 蛋白都包含至少一个高度保守的 WRKY 结构域(大约 60 个氨基酸残基)。WRKY 结构域包含 1 个高度保守的氨基酸序列 (WRKYGQK) 和 1 个锌指结构 (C-X4-5C-X22-23-H-X1-H 或 C-X7C-X23-H-X1-C)^[30]。

根据鉴定到的 WRKY 蛋白序列，使用 Bioedit 软件对 24 个藻类 WRKY 蛋白的结构域序列进行比对 (图 3)。结果显示，归类于 I 组的 9 个 WRKY 蛋白 N 端 WRKY 结构域含有 WRKYGEK 七肽片段以及序列为 C-X4-C-X22-23-H-X1-H 的锌指结构，而 C 端 WRKY 结构域含有保守的 WRKYGQK 片段和序列为 C-X4-C-X23-H-X1-H 的锌指结构。其他 14 个 WRKY 蛋白均含有 1 个 WRKY 结构域。其中，属于 IIa 组的 9 个 WRKY 蛋白中，有 5 个蛋白的七肽序列为保守的 WRKYGQK，有 4 个 WRKY 蛋白的七肽序列发生 1 个氨基酸的突变。DsaWRKY-4 和 DsaWRKY-5 的七肽序列均为 WRKYGEK、MrcWRKY-2 和 MpuWRKY-2 蛋白的七肽序列分别为 WRKYGAK 和 WRKYGHK。属于 IIb 组的 5 个 WRKY 蛋白中，DsaWRKY-2 和 DsaWRKY-3 的七肽序列为

WRKYGEK, OluWRKY-2 的七肽序列为 WRKYGQK, DsaWRKY-2 和 DsaWRKY-3 的七肽序列都为 WRKYGEK。三级结构预测发现藻类 WRKY 蛋白结构域均主要由 β 折叠结构组成, β 折叠的存在有助于蛋白折叠成正确结构(图 4)。

2.3 真核藻类和拟南芥 WRKY 蛋白系统进化分析

为深入分析藻类和拟南芥 WRKY 蛋白成员的系统进化关系, 使用 MEGA 7.0 构建藻类

24 个 WRKY 蛋白和拟南芥 72 个 WRKY 蛋白 (AtWRKYs) 序列的同源进化树。与拟南芥相比, WRKY 成员在低等植物绿藻中的数量均很少。在进化树(图 5)中, 一些真核藻类 WRKY 与拟南芥 WRKY 成员以不同类型 WRKY 亚家族聚类, 例如, 归类于 I 组的 CreWRKY、CvuWRKY、CocWRKY、CncWRKY、CprWRKY 和 VcaWRKY-1 与拟南芥 I 组 WRKY 聚在一起。另外 18 个归类于 I、II a、II b 和 R 组的藻类 WRKY 成员均以物种特异性聚类出现在

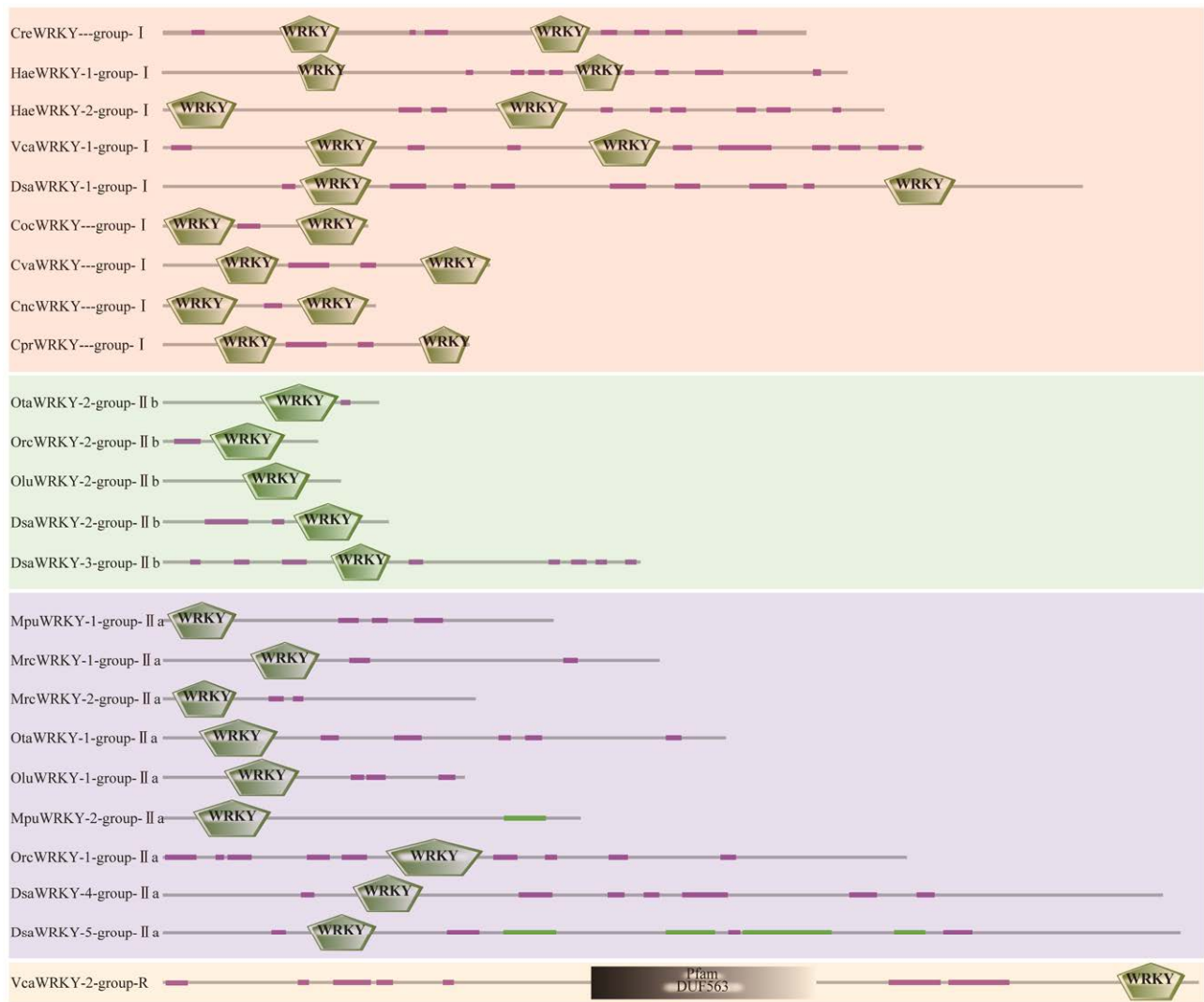


图 2 WRKY 蛋白的结构域

Figure 2 The domains of WRKY proteins.

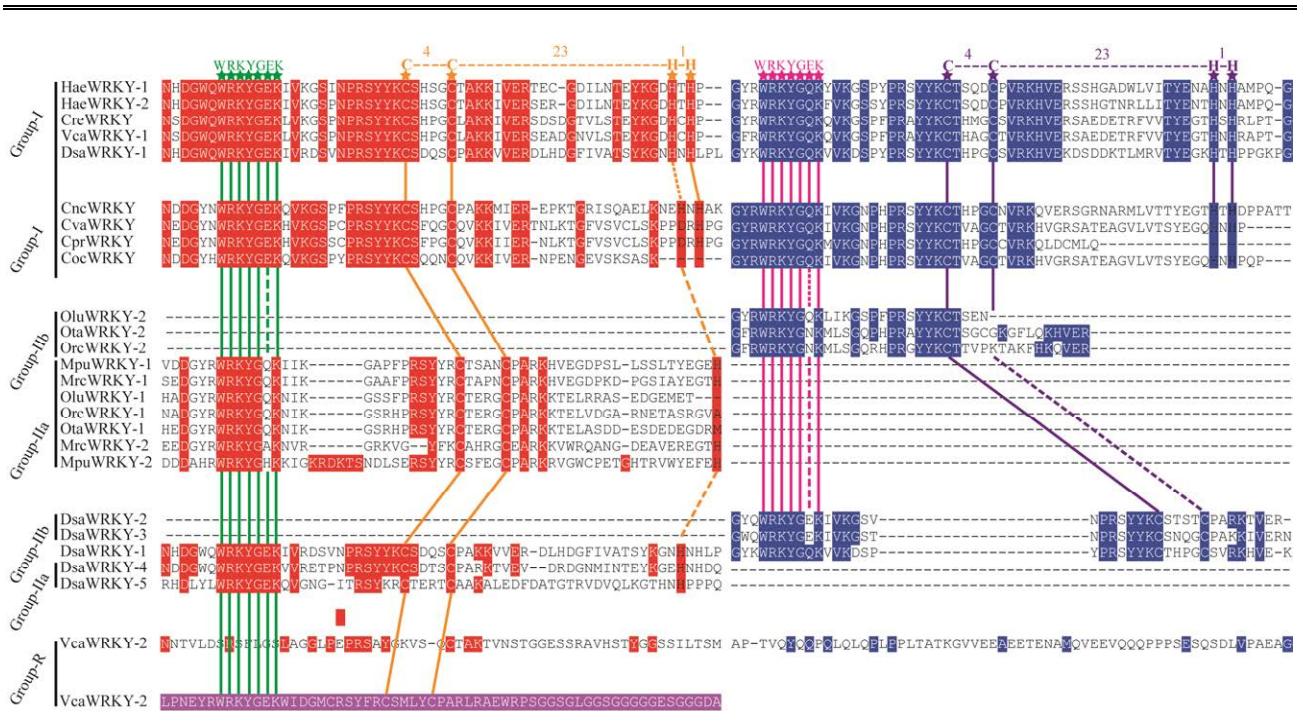


图 3 WRKY 蛋白多序列比对

Figure 3 The multiple sequence alignment of WRKY proteins.

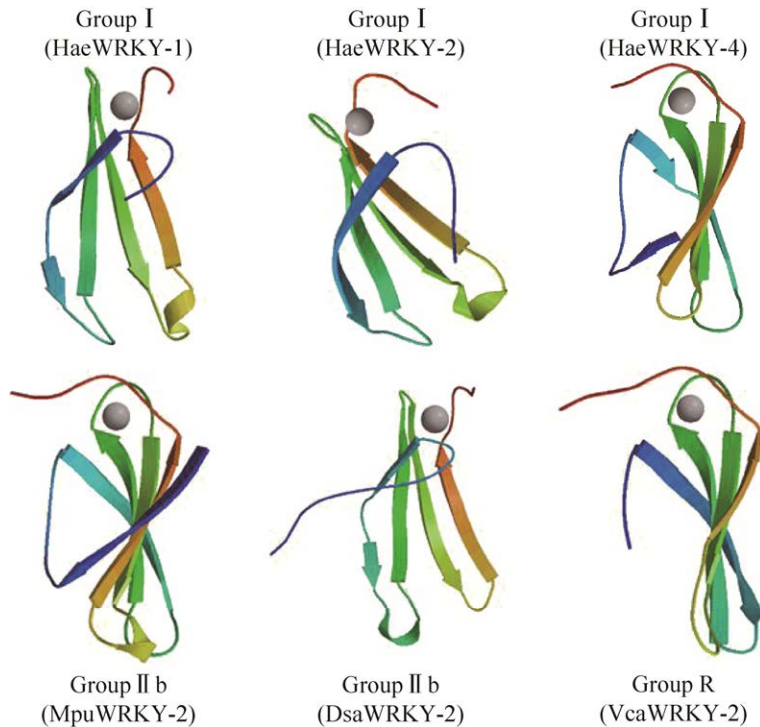


图 4 WRKY 蛋白三级结构预测

Figure 4 The 3D structure prediction of WRKY protein. Red end: C terminal; blue end: N terminal; arrowhead structure: β -sheet.

生红球藻转录组数据分析显示, *HaeWRKY-1* 编码 721 个氨基酸, *HaeWRKY-2* 编码 646 个氨基酸。HaeWRKY-1 和 HaeWRKY-2 蛋白分子式分别为 $C_3\ 254H_5\ 169N_{989}O_1\ 064S_{36}$ 和 $C_2\ 943H_4\ 717N_{885}O_{927}S_{27}$ 。HaeWRKY-1 和 HaeWRKY-2 蛋白分子量预测分别为 76.32 kDa 和 68.19 kDa, 等电点 (pI) 分别为 6.58 和 8.71。构成 HaeWRKY-1 和 HaeWRKY-2 蛋白的氨基酸均有 20 种, 丙氨酸 (Ala) 含量最高分别达 13.5% 和 12.2%, 丝氨酸 (Ser) 含量次之, 分别为 11.0% 和 10.4%, 色氨酸 (Trp) 含量最低分别为 0.7% 和 0.6%。HaeWRKY-1 和 HaeWRKY-2 蛋白质不稳定系数分别为 62.86 和 53.39, 均为不稳定蛋白。另外, 预测表明 HaeWRKY-1 和 HaeWRKY-2 蛋白为胞内蛋白, 且没有信号肽序列和跨膜结构域, 是可溶性蛋白。二级结构预测显示, HaeWRKY-1 和 HaeWRKY-2 蛋白主要由无规卷曲 (45.21% 和 47.83%) 和 α 螺旋 (36.20% 和 29.41%) 组成, 为混合型蛋白。三级结构预测结果表明, HaeWRKY-1 和 HaeWRKY-2 蛋白结构域主要由 β 折叠组成 (图 4)。

2.5 HaeWRKY 融合蛋白的原核表达及纯化

提取构建的目的基因原核表达载体 pET28a (+)-*HaeWRKY-1* 和 pET28a(+)-*HaeWRKY-2* 质粒 (图 6A2 和 6A3), 并用相应引物进行 PCR 扩增, 获得 *HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 完整的 CDS 片段 (图 6A5 和 6A6), 说明 *HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 的原核表达载体均构建成功。将重组质粒分别转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中并诱导原核表达。提取蛋白和 SDS-PAGE 分离结果表明 (图 6B 和 6C), 与空载体 pET-28a(+) 诱导蛋白的表达量相比, 诱导时间分别为 6、12、24、48 h 时含 pET28a(+)-*HaeWRKY-1* 的大肠杆菌均被诱导表达融合蛋白, 诱导时间为 48 h 时效果最佳。同样, 含

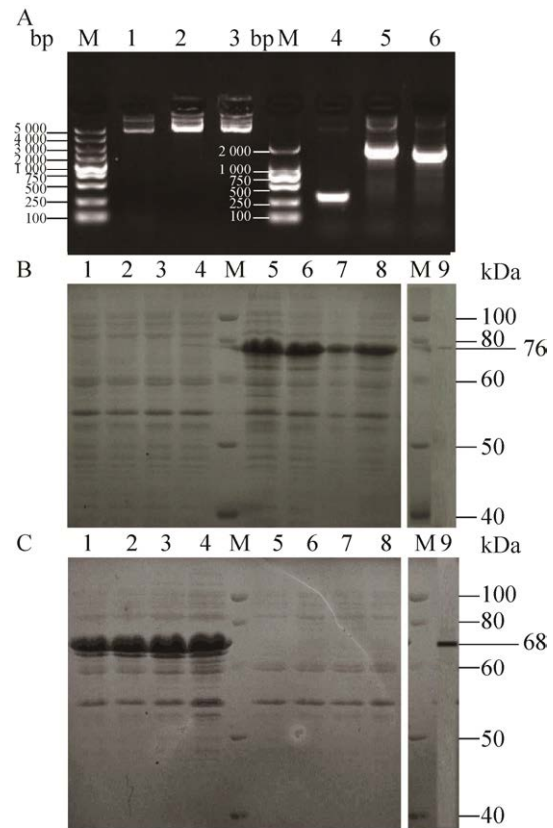


图 6 原核表达载体目的基因检测及 SDS-PAGE 分离表达的靶标融合蛋白

Figure 6 Examination of the target gene cloned in prokaryotic expression vector and isolation of the expressed target fusion protein by SDS-PAGE. M: marker; A1: empty plasmid pET-28a(+); A2: plasmid pET-28a(+)-*HaeWRKY-1*; A3: plasmid pET-28a(+)-*HaeWRKY-2*; A4: PCR product obtained using universal primers and the empty vector DNA as the template; A5: PCR amplification of *HaeWRKY-1* gene using pET-28a(+)-*HaeWRKY-1* plasmid as the template; A6: PCR amplification of *HaeWRKY-2* gene using plasmid pET-28a(+)-*HaeWRKY-2* plasmid as the template; B1 to B4: the expressed proteins in *E. coli* containing empty pET-28a(+) at 48, 24, 12 and 6 h of IPTG induction, respectively; B5 to B8: the expressed proteins in *E. coli* containing HaeWRKY-1 fusion protein expression vector at 48, 24, 12 and 6 h of IPTG induction, respectively; C1 to C4: the expressed proteins in *E. coli* containing HaeWRKY-2 fusion protein expression vector at 48 h of IPTG induction, respectively; C5 to C8: the induced expression proteins in *E. coli* containing pET-28a(+) at 48, 24, 12 and 6 h of IPTG induction, respectively; B-9: the purified WRKY-1 fusion protein; C-9: the purified WRKY-2 fusion protein.

pET28a(+)-*HaeWRKY-2* 的大肠杆菌均被诱导表达融合蛋白,且诱导时间 6 h 时效果最佳。由图 6B9 和 6C9 可知,经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化后的 *HaeWRKY-1* 融合蛋白和 *HaeWRKY-2* 融合蛋白均为一条清晰的条带,大小分别与上述预测相符(约为 76 kDa 和 68 kDa),融合蛋白纯度均达 85% 以上,表明成功获得纯化的融合蛋白。

2.6 *HaeWRKY* 基因启动子顺式作用元件分析

HaeWRKY 基因启动子顺式作用元件分析显示, *HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 基因的表达可能受多种因素调控。*HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 基因启动子区均含有光响应元件 (G-Box、GT1-motif 和 Sp1)、MeJA (茉莉酸甲酯) 响应元件 (CGTCA-motif 和 TGACG-motif)、ABA (脱落酸) 响应元件 (ABRE)、乙烯响应元件 (ARE)、逆境响应元件 (MBS、MYB、MYC、STRE、WRE3 和 as-1) (表 3)。因此, *HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 可能参与藻细胞对光、激素以及逆境胁迫的响应。

2.7 高光胁迫下雨生红球藻 WRKY 基因的表达模式及虾青素积累

为研究 *HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 基因是否雨生红球藻胁迫响应过程中发挥功能,我们检测不同光照 (高白光和高蓝光) 处理下雨生红球藻 *HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 基因的表达模式。由图 7 可知, *HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 在不同高光胁迫 72 h 后的表达模式不同。雨生红球藻在正常培养条件下, *HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 均表达,且 *HaeWRKY-1* 相对表达量显著高于 *HaeWRKY-2*,是 *HaeWRKY-2* 的 2.1 倍。在高白光和高蓝光胁迫处理下, *HaeWRKY-1* 的表达量均显著高于 *HaeWRKY-2*,且分别是 *HaeWRKY-2* 的 18.2 倍和 110.4 倍。与正常培养

相比, *HaeWRKY-1* 在高光胁迫处理下的表达显著增加,而 *HaeWRKY-2* 在高光胁迫处理下的表达显著降低。与对照相比,高白光和高蓝光处理下雨生红球藻藻液均呈红褐色 (图 8),这表明高白光和高蓝光处理可显著促进雨生红球藻合成积累高含量虾青素。这说明 *HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 可能参与调控不同的生理生化通路,赋予雨生红球藻抵御逆境胁迫的能力。

表 3 *HaeWRKY*、*HaeBKT* 和 *HaePSY* 基因启动子的顺式作用元件

Table 3 *Cis-acting elements in the promoters of HaeWRKY, HaeBKT, and HaePSY*

<i>Cis-acting element</i>	<i>Genes</i>			
	<i>HaeWRKY-1</i>	<i>HaeWRKY-2</i>	<i>HaeBKT</i>	<i>HaePSY</i>
ABRE	1	3	1	6
ARE	1	1	–	1
CAT-box	6	1	–	–
CGTCA-motif	1	5	1	2
G-Box	1	2	3	7
GT1-motif	1	1	–	–
MBS	1	5	1	1
MYB	3	7	1	3
MYC	4	5	3	14
STRE	3	6	2	3
Sp1	5	1	–	1
TATA-box	3	2	1	2
TCT-motif	–	1	1	2
I-box	–	–	–	1
as-1	1	5	1	2
TGACG-motif	1	5	1	2
W-box	3	–	2	1
WRE3	5	4	–	–
box S	2	–	–	–
ACE	–	1	–	–
CARE	–	1	–	–
CCAAT-box	–	1	–	–
DRE core	–	3	–	–
LTR	–	2	–	1
P-box	–	1	–	–
RY-element	–	1	–	–
Y-box	–	–	1	–

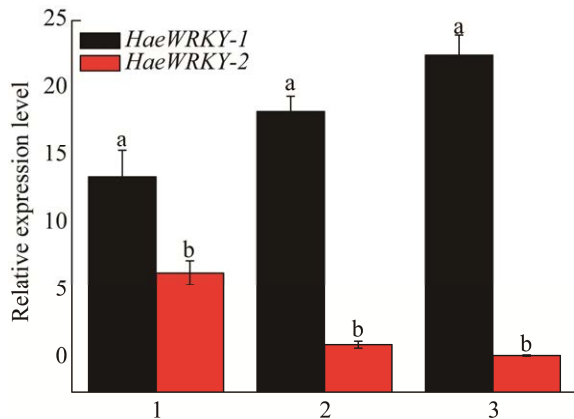


图 7 不同光照处理下培养 72 h 雨生红球藻 *HaeWRKY-1* 和 *HaeWRKY-2* 的表达量

Figure 7 The relative expression levels of *HaeWRKY-1* and *HaeWRKY-2* in *H. pluvialis* cultivated for 72 h under different light treatments. 1: normal culture (LED white light, $25 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$); 2: high white light (390–770 nm, $500 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$); 3: high blue light (420–500 nm, $500 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$). Each value represents the mean \pm SD ($n=3$). Different lowercase letters on the bar graph indicate significant differences between the combinations ($P < 0.01$).



图 8 不同光照处理下培养 72 h 的雨生红球藻藻液颜色

Figure 8 The colors of *H. pluvialis* cultures for 72 h under different light treatments.

3 讨论

WRKY TFs 是一类 DNA 结合蛋白, 主要存在于高等植物和低等植物中。根据 WRKY 域的数量和锌指基序的特征, WRKY TFs 通常被分为三大类 (I、II 和 III)^[28]。第 I 组 WRKY 成员在 C-和 N-端均含 WRKY 结构域。第 II 和 III 组 WRKY 成员仅在 C 端或 N 端含 WRKY 结构域^[31]。根据 WRKY 蛋白进化和保守基序的差异, 第 II 组 WRKY 成员进一步分为 5 个亚组 (II a、II b、II c、II d 和 II e)^[28]。本文从真核藻类鉴定到 24 个 WRKY 蛋白, 分别属于 I、II a

和 II b 组, 它们的保守结构域氨基酸序列存在一些差异。除第 I 组 WRKY 蛋白 N 端的 WRKY 结构域外, 其他 WRKY 结构域均含有一个保守的内含子 (PR 或 VQR) 结构。氨基酸 PR 结构存在于七肽序列和锌指结构之间 (I-CT、II c、II d、II e 和 III 组)。VQR 结构位于 II a 和 II b 组中锌指结构内部 (C-X4-5-C-X5-VQR-X18-19-H-X1-H)^[28]。藻类 WRKY 蛋白中 VQR 结构突变为 VER 等不同的变异体。深入分析这两种保守结构有助于更准确地鉴定 WRKY 结构域。30 种真核藻类全基因组 WRKY 鉴定结果显示, 红藻 (Rhodophyta)、灰藻 (Glaucophyta) 和硅藻 (Bacillariophyta) 等藻类未检测到 WRKY 成员。然而, WRKY 成员广泛存在于绿藻门 (Chlorophyta) 藻种, 且不同绿藻物种的 WRKY 成员数量不同。例如, 盐藻 (*D. salina*) WRKY 成员数量最多 (5 个), 莱茵衣藻 (*C. reinhardtii*) WRKY 成员数量最少 (1 个)。已有研究鉴定到高等植物 WRKY 成员数量均较多, 本文所鉴定到的藻类物种 (绿藻) 中 WRKY 基因成员数量均较少。WRKY 基因在植物进化过程中通过多次复制 (包括基因组复制、串联复制和片段复制), 形成一个大型植物 WRKY 蛋白基因家族^[8,10]。其中, 第 I 组 WRKY 成员是古老的成员, 而第 II 组 (II a 和 II b) WRKY 很可能是由具有单一 WRKY 域的藻类 WRKY 成员进化而来, 相继从第 I 组衍生的谱系分离^[28,32]。WRKY 基因在进化过程中发生的扩增现象及其重要进化机制还有待获得更多证据。

雨生红球藻是天然虾青素的理想来源, 对雨生红球藻虾青素的生物合成、积累及其应用等方面已有很多研究^[33]。在营养缺乏或高光照射条件下, 雨生红球藻细胞通常会停止分裂, 细胞体积增大, 类胡萝卜素增加, 主要是虾青素的积累^[34-35]。与白光相比, 蓝光在控制绿藻类胡萝卜素合成方面可能起着更重要的作用^[36]。本文鉴定到雨生红球藻 WRKY

基因仅有 2 个。*HaeWRKY-1* 基因表达在高光胁迫后大量上调, 且高蓝光处理导致其上调表达更显著。然而, *HaeWRKY-2* 基因在高光处理下呈现表达减低 (图 7)。利用已公布的雨生红球藻基因组数据^[37], 获取 *HaeWRKY* 基因启动子序列并对顺式作用元件进行分析, 结果显示 *HaeWRKY-1* 基因启动子区顺式作用元件包含 3 个 W-box, 然而 *HaeWRKY-2* 启动子区不含 W-box 元件 (表 3)。WRKY 蛋白氨基酸序列能特异性地与目标基因启动子中的 W-box (TTGACT/C) 顺式调控元件直接结合^[38-39], 目标基因保守的 TGAC 核心是 WRKY 与之结合起作用的必要的顺式元件^[40]。这说明 *HaeWRKY-2* 蛋白或者 *HaeWRKY-1* 本身可能与 *HaeWRKY-1* 基因启动子结合并抑制 *HaeWRKY-1* 基因表达。我们推测高光胁迫条件下, *HaeWRKY-2* 低表达, 减少了与 *HaeWRKY-1* 启动子结合, 这或

许能导致 *HaeWRKY-1* 高表达并使 *HaeWRKY-1* 蛋白的合成增加。然后, *HaeWRKY-1* 蛋白可能激活下游靶基因表达。在虾青素合成的过程中, β -胡萝卜素酮化酶基因 (β -carotene ketolase, *BKT*) 和八氢番茄红素合成酶基因 (phytoene synthase, *PSY*) 起非常重要的作用^[41]。已有研究表明, *HaeBKT* 和 *HaePSY* 在高光 (高白光和高蓝光) 诱导下高表达^[27], 与 *HaeWRKY-1* 基因上调表达相一致。顺式作用元件分析表明, *HaeBKT* 和 *HaePSY* 基因启动子区分别含 2 和 1 个 W-box 元件 (表 3), 这预示着 *HaeWRKY-1* 基因可能与这两个虾青素合成关键酶基因启动子结合并调控它们的表达。依据雨生红球藻高光下虾青素积累及其相关基因表达的研究进展, 结合我们目前所获研究结果, 绘制了 *HaeWRKY* 转录因子可能介导高光诱导藻细胞生长和虾青素合成的模式图 (图 9)。具体的假说为,

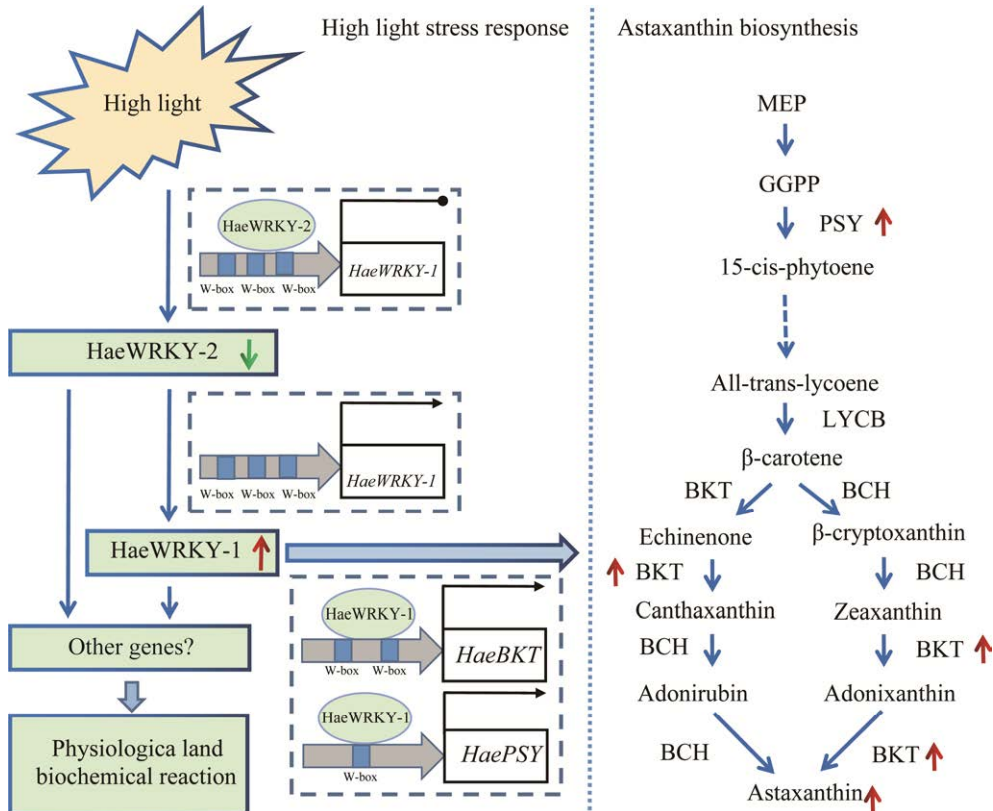


图 9 雨生红球藻 *WRKY* 基因可能介导高光诱导藻细胞生长和虾青素合成的模式图

Figure 9 Schematic diagram showing that *WRKY* genes may mediate the cell growth and astaxanthin biosynthesis of *H. pluvialis* under high light stress.

高光胁迫条件下, *HaeWRKY-2* 低表达也许会导
致 *HaeWRKY-1* 的高表达, *HaeWRKY-1* 有可能
上调虾青素合成关键基因(*HaeBKT*、*HaePSY*等)
的转录表达, 促进虾青素合成积累(图 9)。
HaeWRKY 详尽的作用机制有待进一步阐明。
另外, *HaeBKT* 和 *HaePSY* 基因启动子均含有
ABRE、G-Box 和 MBS 等元件, 同时分别含有
某些不同的顺式作用元件。*HaeBKT* 基因启动
子有 Y-box 元件, *HaePSY* 基因启动子含 ARE、
I-box、Sp1 和 LTR 元件。这表明 *HaeBKT* 和
HaePSY 基因表达或或许还受到其他蛋白调控,
进而影响雨生红球藻虾青素的合成积累。这些
反应过程涉及的具体分子调控机制还需后续深
入研究。

REFERENCES

- [1] Waqas M, Azhar MT, Rana IA, et al. Genome-wide identification and expression analyses of WRKY transcription factor family members from chickpea (*Cicer arietinum* L.) reveal their role in abiotic stress-responses. *Genes Genomics*, 2019, 41(4): 467-481.
- [2] 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. *Mol Gen Genet*, 1994, 244(6): 563-571.
- [3] Xie T, Chen C, Li C, et al. Genome-wide investigation of WRKY gene family in pineapple: evolution and expression profiles during development and stress. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 490.
- [4] Dong J, Chen C, Chen Z. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol*, 2003, 51(1): 21-37.
- [5] Wu J, Chen J, Wang L, et al. Genome-wide investigation of WRKY transcription factors involved in terminal drought stress response in common bean. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 380.
- [6] Wan Y, Mao M, Wan D, et al. Identification of the WRKY gene family and functional analysis of two genes in *Caragana intermedia*. *BMC Plant Biol*, 2018, 18(1): 31.
- [7] Kaliyappan R, Viswanathan S, Suthanthiram B, et al. Evolutionary expansion of WRKY gene family in banana and its expression profile during the infection of root lesion nematode, *Pratylenchus coffeae*. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0162013.
- [8] Song YN, Cui HL, Shi Y, et al. Genome-wide identification and functional characterization of the *Camelina sativa* WRKY gene family in response to abiotic stress. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 786.
- [9] He Y, Mao S, Gao Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis of WRKY transcription factors under multiple stresses in *Brassica napus*. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157558.
- [10] Zhang Y, Wang L. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evol Biol*, 2005, 5: 1.
- [11] Jiang J, Ma S, Ye N, et al. WRKY transcription factors in plant responses to stresses. *J Integr Plant Biol*, 2017, 59(2): 86-101.
- [12] Jiang Y, Duan Y, Yin J, et al. Genome-wide identification and characterization of the *Populus* WRKY transcription factor family and analysis of their expression in response to biotic and abiotic stresses. *J Exp Bot*, 2014, 65(22): 6629-6644.
- [13] Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(5): 199-206.
- [14] Yu F, Huaxia Y, Lu W, et al. GhWRKY15, a member of the WRKY transcription factor family identified from cotton (*Gossypium hirsutum* L.), is involved in disease resistance and plant development. *BMC Plant Biol*, 2012, 12: 144.
- [15] Singh D, Debnath P, Roohi, et al. Expression of the tomato WRKY gene, *SlWRKY23*, alters root sensitivity to ethylene, auxin and JA and affects aerial architecture in transgenic *Arabidopsis*. *Physiol Mol Biol Plants*, 2020, 26(6): 1187-1199.
- [16] Li C, Liu X, Ruan H, et al. GmWRKY45 enhances tolerance to phosphate starvation and salt stress, and changes fertility in transgenic *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1714.
- [17] Shi WY, Du YT, Ma J, et al. The WRKY transcription factor GmWRKY12 confers drought and salt tolerance in soybean. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 4087.
- [18] Vernon W. Some controlling factors in the distribution of *Haematococcus pluvialis*. *Ecology*, 1957, 38(3): 457-462.
- [19] Zhang CH, Zhang LT, Liu JG. Exogenous sodium acetate enhances astaxanthin accumulation and photoprotection in *Haematococcus pluvialis* at the

- non-motile stage. *J Appl Phycol*, 2019, 31(2): 1001-1008.
- [20] Ren Y, Deng J, Huang J, et al. Using green alga *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin and lipid co-production: advances and outlook. *Bioresour Technol*, 2021, 340: 125736.
- [21] Sandesh Kamath B, Vidhyavathi R, Sarada R, et al. Enhancement of carotenoids by mutation and stress induced carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* mutants. *Bioresour Technol*, 2008, 99(18): 8667-8673.
- [22] Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990, 215(3): 403-410.
- [23] Finn RD, Clements J, Arndt W, et al. HMMER web server: 2015 update. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(W1): W30-W38.
- [24] Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(database issue): D302-D305.
- [25] Finn RD, Bateman A, Clements J, et al. Pfam: the protein families database. *Nucl Acids Res*, 2014, 42(D1): D222-D230.
- [26] Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(web server issue): W597-W603.
- [27] 崔红利, 许文鑫, 崔玉琳, 等. 光诱导雨生红球藻虾青素积累的信号通路转录组分析. *生物工程学报*, 2021, 37(4): 1260-1276.
- Cui HL, Xu WX, Cui YL, et al. Transcriptome analysis of signal transduction pathway involved in light inducing astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(4): 1260-1276 (in Chinese).
- [28] Rinerson CI, Rabara RC, Tripathi P, et al. The evolution of WRKY transcription factors. *BMC Plant Biol*, 2015, 15: 66.
- [29] Fernández MB, Tossi V, Lamattina L, et al. A comprehensive phylogeny reveals functional conservation of the UV-B photoreceptor UVR8 from green algae to higher plants. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1698.
- [30] Li C, Li D, Shao F, et al. Molecular cloning and expression analysis of *WRKY* transcription factor genes in *Salvia miltiorrhiza*. *BMC Genomics*, 2015, 16: 200.
- [31] 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. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(21): 9764-9778.
- [32] Wu KL, Guo ZJ, Wang HH, et al. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins. *DNA Res*, 2005, 12(1): 9-26.
- [33] Shah MM, Liang Y, Cheng JJ, et al. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 531.
- [34] Mularczyk M, Michalak I, Marycz K. Astaxanthin and other nutrients from *Haematococcus pluvialis*—multifunctional applications. *Mar Drugs*, 2020, 18(9): 459.
- [35] Butler TO, McDougall GJ, Campbell R, et al. Media screening for obtaining *Haematococcus pluvialis* red motile macrozooids rich in astaxanthin and fatty acids. *Biology (Basel)*, 2017, 7(1): 2.
- [36] Cui H, Yu X, Wang Y, et al. Evolutionary origins, molecular cloning and expression of carotenoid hydroxylases in eukaryotic photosynthetic algae. *BMC Genomics*, 2013, 14: 457.
- [37] Luo Q, Bian C, Tao M, et al. Genome and transcriptome sequencing of the astaxanthin-producing green microalga, *Haematococcus pluvialis*. *Genome Biol Evol*, 2019, 11(1): 166-173.
- [38] Jing Z, Liu Z. Genome-wide identification of WRKY transcription factors in kiwifruit (*Actinidia* spp.) and analysis of WRKY expression in responses to biotic and abiotic stresses. *Genes Genomics*, 2018, 40(4): 429-446.
- [39] Zhang M, Chen Y, Nie L, et al. Transcriptome-wide identification and screening of WRKY factors involved in the regulation of taxol biosynthesis in *Taxus chinensis*. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5197.
- [40] Guo C, Guo R, Xu X, et al. Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) *WRKY* gene family. *J Exp Bot*, 2014, 65(6): 1513-1528.
- [41] Zhu QL, Zeng DC, Yu SZ, et al. From golden rice to aSTARice: bioengineering astaxanthin biosynthesis in rice endosperm. *Mol Plant*, 2018, 11(12): 1440-1448.

(本文责编 陈宏宇)