• 药材与资源 •

铁皮石斛 WRKY5 基因的克隆与表达分析

蒋 园，朱玉球*，高燕会，斯金平

浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地 浙江省铁皮石斛产业技术创新战略联盟，浙江 临安 311300

摘 要：目的 克隆铁皮石斛 DoWRKY5 基因，并对生物信息学和表达模式进行分析。**方法** 通过转录组测序和 RT-PCR 方法相结合首次从铁皮石斛中克隆到一个 WRKY 基因，利用生物信息学工具对其进行分析，并利用荧光定量 PCR 分析其在铁皮石斛中的组织表达模式及在低温胁迫、脱落酸（ABA）胁迫和蔗糖渗透胁迫下的表达模式。**结果** 获得长 1 336 bp 的 DoWRKY5 基因转录因子 cDNA 全长序列，开放阅读框为 834 bp，编码 277 个氨基酸残基，含有一个 WRKY 基因保守结构域和一个 C_2H_2 锌指结构域，属于 WRKY 基因家族的第 II 类成员。qRT-PCR 分析表明，DoWRKY5 基因在铁皮石斛根、茎、叶中均有表达，但在叶中的表达量最高。在不同低温和 4 ℃不同时间诱导处理后，该基因表达量均显著升高，并且该基因在 ABA 胁迫和蔗糖渗透胁迫下均可被诱导表达。**结论** DoWRKY5 基因在铁皮石斛应答低温胁迫等多种非生物胁迫中可能起重要的调控作用，为进一步研究铁皮石斛的抗寒机制和抗寒性品种的选育提供基础。

关键词：铁皮石斛；WRKY 转录因子；实时荧光定量 PCR；低温胁迫；脱落酸胁迫

中图分类号：R282.12 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2016)02 - 0301 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.02.020

Cloning and expression analysis of WRKY5 gene in *Dendrobium officinale*

JIANG Yuan, ZHU Yu-qiu, GAO Yan-hui, SI Jin-ping

Nurturing Station for State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Zhejiang Provincial Strategic Alliance for Technical Innovation in Industry of *Dendrobium officinale*, Lin'an 311300, China

Abstract: Objective In order to isolate and analysize the bioinformatics and expression pattern of DoWRKY5 gene from *Dendrobium officinale*. **Methods** A WRKY gene was first obtained by transcriptome sequencing and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from *D. officinale* and analyzed by bioinformatics tools. The tissue expression pattern and the low temperature stress, abscisic acid (ABA) stress, and sucrose stress responses were analyzed by qRT-PCR. **Results** The cDNA sequence of DoWRKY5 gene was isolated, which was 1 336 bp in length, with an open reading frame (ORF) of 834 bp and an encoded polypeptide of 277 amino acid. The amino acid sequence contained a conserved WRKY domains and a zinc finger structures (C_2H_2), belonging to Group Ⅱ of WRKY family. Expression analysis by qRT-PCR showed that DoWRKY5 was expressed in the roots, stems, and leaves of *D. officinale*, and the most abundant in leaves. The amount of DoWRKY5 expression were significantly increased under low temperature of 4 ℃ and different time. Moreover, the expression of DoWRKY5 could be induced by ABA and source. **Conclusion** DoWRKY5 may be an important transcription factor to response cold stress and other abiotic stresses in *D. officinale*, which provides a foundation for further study of cold tolerance mechanism and cold-resistant breeding of *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; WRKY transcription factor; RT-PCR; low temperature stress; abscisic acid stress

植物在长期的进化过程中形成了一系列用于调节自身生长发育、抵御生物和非生物胁迫逆境的机制。植物接受胁迫信号后，通过一系列的信号传递途径，最终诱导相关基因的表达来抵御各种胁迫。在调节基因表达的过程中，转录因子起着重要的作用[1]。WRKY 转录因子是近年来在植物中发现的一类广泛参与植物逆境胁迫的转录因子，因其 *N*-末端含有高度保守的 WRKYGQK 氨基酸序列而得名[2-3]。WRKY 转录因子可以通过结合启动子序列中的 W-box（TTTGACC/T）和 SURE（sugar-responsive *cis*-

收稿日期：2015-09-19

基金项目：浙江省重大科技专项（2012C12912-9）；浙江省林学重中之重一级学科研究生创新项目（201530）

作者简介：蒋 园（1989—），女，硕士在读，研究方向为药用植物遗传育种。Tel: 18358106027 E-mail: 1250194527@qq.com

*通信作者 朱玉球，高级实验师，主要从事植物生物技术和铁皮石斛新品种选育的研究。Tel: 18267136776 E-mail: gaoyanhui408@126.com

element）来调控相应基因的表达[4-5]。

温度是自然界影响植物生长与分布的主要限制因素，已有研究表明，一些 WRKY 蛋白参与植物低温胁迫反应[6-9]。李立芹[10]从烟草中获得与低温胁迫相关的 WRKY12 基因，并通过 Northern Blot 试验证明，该基因表达受 4 ℃低温胁迫诱导表达。在低温条件下，大麦的 HvWRKY38 基因会通过非脱落酸（ABA）依赖的途径早期暂时上调表达，但在冰冻条件下，该转录因子会持续的上调表达，表明它在低温胁迫中的调节作用[11]。Zhou 等[12]把大豆的 3 个转录因子过量表达到拟南芥中，发现过量表达 GmWRKY21 的转基因植株的抗寒性明显提高。Hwang 等[13]在分析辣椒中的基因在冷胁迫条件下的表达特性时发现 CaWRKY1 基因受冷胁迫诱导表达。目前尚没有关于铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo WRKY 转录因子的研究报道，尤其是在低温胁迫下 WRKY 转录因子的调控机制。铁皮石斛为兰科石斛属多年生草本植物，是传统名贵珍稀中药材，国家中药材保护品种[14]。20 世纪 90 年代以来，随着铁皮石斛组织培养、设施栽培等一系列关键技术的突破，铁皮石斛产业取得了跨越式发展[15]。但由于铁皮石斛抗寒性较差，导致其生长区域局限，因此选育抗寒性品种是实现原生态栽培的关键[16]。本研究在铁皮石斛冷胁迫后基因的差异表达分析结果中筛选到 23 个 WRKY 基因（CoWRKY），按顺序从 1 到 23 编号，其中 DoWRKY5 基因被冷胁迫诱导后的表达量变化较大，因此，本实验重点对铁皮石斛 DoWRKY5 序列进行生物信息学分析，并研究 DoWRKY5 基因在不同低温、低温（4 ℃）诱导不同时间、ABA 处理不同时间和不同质量浓度蔗糖处理下的表达模式，为进一步研究 WRKY 基因的功能和抗寒机制提供基础数据，并为铁皮石斛分子标记辅助育种提供支撑。

1　材料与方法

1.1　材料

供试材料经浙江农林大学天然药物研发中心斯金平教授鉴定为铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo，为浙江省临安市清凉峰国家自然保护野生居群 F_1（C15，铁皮石斛分布的北缘，30°17′N，118°52′E），铁皮石斛幼苗于（25±2）℃，16 h/d 组织培养 240 d 后，用于相关处理及 RNA 提取。

1.2　铁皮石斛总 RNA 提取与 DoWRKY5 基因的克隆

参照李东宾[17]改良的 CTAB 法提取铁皮石斛的总 RNA。根据 PrimeScript^{TM} II 1 st Strand cDNA Synthesis Kit（TaKaRa）试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA 的第 1 条链。根据转录组测序结果设计 DoWRKY5 基因序列的特异引物（表 1），以上述 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，反应体系（20 μL）包括 10×Buffer、1.5 mmol/L Mg^{2+}、0.1 mmol/L dNTPs、0.4 μmol/L 引物、0.5 U rTaq DNA 聚合酶、cDNA 模板 200 ng。PCR 扩增反应程序为 95 ℃、5 min；95 ℃、10 s，55 ℃、30 s，72 ℃、1 min，32 个循环；72 ℃、7 min。PCR 扩增产物于 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测，并用 DNA 凝胶回收试剂盒（AxyGen）回收目的片段，回收产物连接到 pMD18-T 载体（TaKaRa）上，转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，于 37 ℃培养过夜，进行蓝白斑筛选和菌液 PCR 鉴定，将阳性克隆于生工生物工程（上海）股份有限公司测序。

表 1　铁皮石斛 DoWRKY5 基因的克隆及表达分析所用引物

Table 1　Primers used to isolate and analyze expression of DoWRKY5 in *D. officinale*

引物名称	引物序列 (5’-3’)
WRKY5-F	CAAGGATACTTCTACGCTCTCCCCT
WRKY5-R	TATTCACAACATTAGCATTGGGCAG
qRT-WRKY5-F	ATATCCTTAACCCATCTCCTTCCCT
qRT-WRKY5-R	TTCATGTTCTCCTCTGTAACACGCT
Actin-F	TTGTGTTGGATTCTGGTGATGGTGT
Actin-R	TTTCCCGTTCTGCTGTTGTTGTGAA

1.3　铁皮石斛 DoWRKY5 基因的生物信息学分析

通过 NCBI 中 Vecscree 工具（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/）去除载体序列；用 ORF Finder（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html）查找基因的开放阅读框（ORF）；利用 NCBI 中 BLAST（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/）进行核苷酸和氨基酸序列的同源搜索；通过在线软件 ProtParam（http://web.expasy.org/protparam/）预测蛋白结构，分析目的基因编码蛋白质的氨基酸组成、蛋白质相对分子质量、理论等电点及稳定性等参数；运用 TMMHMM（http://www.cbs.dtu. dk/services/ TMHMM/）在线工具进行蛋白质跨膜分析；通过 ExPASY 中的 SOPMA 工具分析蛋白质序列的二级结构；采用 ClustalX 进行多序列比对，并通过 MEGA5.0 软件构建进化树。

1.4 非生物胁迫下铁皮石斛 DoWRKY5 基因的表达分析

选取生长良好、发育状态一致的 6 个月的铁皮石斛 C15 幼苗分别进行以下处理：不同低温处理：将铁皮石斛幼苗于低温培养箱（MC 1000HE-EV-MC17E，SNIJDERS）中，分别于 4、0、−4、−8 ℃（其他条件与组培室培养条件相同）处理 2 h。4 ℃处理：将铁皮石斛幼苗置于低温培养箱中，4 ℃（其他条件与组培室培养条件相同）分别培养 2、4、8、12、24 h。ABA 处理：用蒸馏水将根部培养基洗净，然后将组培苗置于浓度为 100 μmol/L 的 ABA 溶液中处理 2、4、8、12、24、48、72 h。蔗糖处理：将其分别移入添加了 20 g/L（即原培养基作为空白对照）、30、40、50 g/L 蔗糖的培养基中培养 1 个月，分别用未经处理的幼苗作为空白对照，取嫩叶于液氮速冻后−80 ℃冰箱保存备用。

提取不同处理的铁皮石斛 RNA，根据 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser（TaKaRa）试剂盒进行反转录 cDNA 第一链的合成，利用铁皮石斛转录组序列中 WRKY 基因的保守区特点，设计 qRT-PCR 引物，内参基因为铁皮石斛 Actin 基因（表 1）；引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

参照 SYBR® Premix Ex Taq™ II（Tli RNaseH Plus）（TaKaRa）试剂盒的说明书，反应在 BIO-RAD 的 CFX96™ Real-Time System 实时定量 PCR 仪上完成。PCR 反应体系为 10 μL，包括 SYBR Prenix Ex Taq 5 μL，上、下游引物各 0.4 μL，cDNA 模板 0.5 μL，扩增程序为 95 ℃预变性 3 min，95 ℃变性 5 s，53 ℃复性 30 s，共 40 个循环；每个循环第 3 步进行荧光采集；最后 95 ℃变性 1 min，退火至 60 ℃，保温 1 min 后以 0.2 ℃/s 的速度升至 95 ℃，在此过程中连续检测其荧光值并绘制熔解曲线。每个样品设 3 次重复。利用软件 GraphPad Prism 5.0 对实验数据进行制图分析。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛 DoWRKY5 基因的克隆及序列分析

从冷胁迫下铁皮石斛转录组测序文库中获得 DoWRKY5 基因的 cDNA 序列，经 NCBI 的 BLASTx 比对及 ORF 分析显示其具有完整的 ORF，因此推测为全长基因。设计其特异性引物，以铁皮石斛叶片 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增，经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测（图 1），回收目的片段，连接到 pMD18-T 载体上，转化大肠杆菌 DH5α。测序的序列结果与转录组序列基本一致，该序列长 1 336 bp，利用 ORF Finder 对其进行 ORF 预测，得到 834 bp 的最大 ORF，编码 277 个氨基酸，含有一个 WRKY 保守结构域，锌指结构为 C_2H_2 型（图 2），属于 WRKY 家族的第 II 类成员。

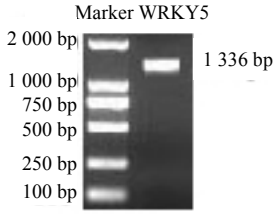


图 1 铁皮石斛 DoWRKY5 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of DoWRKY5 gene fragments in *D. offiecinal*

2.2 铁皮石斛 DoWRKY5 基因编码蛋白质的特征分析

通过 Protparam 软件预测其编码的蛋白相对分子质量为 29 900，理论等电点为 6.84，不稳定系数 II 为 52.11，属于不稳定蛋白，总平均亲水性 GRAVY 为−0.584，为亲水性蛋白；TMHMM 工具对该蛋白的跨膜结构进行预测发现其无跨膜区。

运用 ExPASY 中的 SOPMA 工具预测铁皮石斛 DoWRKY5 基因的二级结构，结果显示该蛋白的二级结构由 37.55%的随机卷曲（random coil）、38.27%的 α-螺旋（α-helices）、16.97%的延伸链（extended strand）和 7.22%的 β-折叠（β-turn）组成（图 3），推测 α-螺旋是其最大量的二级结构元件，而随机卷曲、延伸链和 β-折叠散布于整个蛋白中。

2.3 铁皮石斛 DoWRKY5 基因编码蛋白质的同源性及进化分析

利用 NCBI 的 BLASTp 对铁皮石斛 DoWRKY5 基因编码的氨基酸序列进行检索并下载同源序列，结果表明，该序列与其他植物 WRKY 氨基酸序列具有较高的同源性，与中国水仙 *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem （AIZ00534.1）、大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr.（NP 001237392.1）、啤酒花 *Humulus lupulus* L.（CDP90453.1）和油菜 *Brassica napus* L. （ACQ76806.1）的同源性分别为 98%、97%、96%、94%。用 DNAMAN 软件对下载的序列及 DoWRKY5 基因进行多重比对（图 4），除湖北海棠 *Malus hupehensis* L.（AGG23550.1）的氨基酸

```
   1  CAAGGATACTTCTACGCTCTCCCCTCCAACCTCTTTTTTTTCCTCTCCGTACCTTCTCGT
  61  CTCCTCCGTTAGAACACAGCCCTTGACCGAGAATTCAAAGCGCCTCCTTTAAAAGACCAA
 121  TAACCTTCGCGTCTTCTTCCATTCCCTCAATCTCTGTCCTTTCTTCCTTCCTCCTTTCTC
 181  TTCCACCTCCCCATATCCCCCCAAAAAAGCCAAAAGAAACAGAAACATACCCCTGAAAAC
 241  AAAATCTTAATTTTTCTTGCCAGTCTTCTCAACTCTATATATCCTTAACCCATCTCCTTC
 301  CCTTGATCCCACTAACAAAAAGCTCGAGCCTTGATCATGGAATCCCATTCCCTCAGCCTC
                                          *  E  S  H  S  L  S  L
 361  GACCTCACCATCGGCATCGCAAAGCAGAGCATTCTGCAAGAGCCGAGCCCTCCTCCGTGC
       D  L  T  I  G  I  A  K  Q  S  I  L  Q  E  P  S  P  P  P  C
 421  TTGCAGGAGGAGCTCAAGCGTGTTACAGAGGAGAACATGAAGCTTACATCGATGCTCGCC
       L  Q  E  E  L  K  R  V  T  E  E  N  M  K  L  T  S  M  L  A
 481  ACCATGTGCGAGAGCTACGACGCACTTCGAGCTCAGCTGATAGACATGATCGGCCCCACC
       T  M  C  E  S  Y  D  A  L  R  A  Q  L  I  D  M  I  G  P  T
 541  GCTGCGGTAGCATCGTCAGAGGGAGCGCGATCCAGTTCGCCGCCGTCGGCGAAGCGTAAG
       A  A  V  A  S  S  E  G  A  R  S  S  S  P  P  S  A  K  R  K
 601  AGTACTGAGAGCGCCGGCGATGCCGCGAACAGCGTTTCGAGCGCGAACTCGTGCAAGAAG
       S  T  E  S  A  G  D  A  A  N  S  V  S  S  A  N  S  C  K  K
 661  GCGAAGGAGGAAGGATCTAAGCCGAAGATCTGGAAGCTGTACGCTCGCACTGATCCATCT
       A  K  E  E  G  S  K  P  K  I  W  K  L  Y  A  R  T  D  P  S
 721  GATTCAAGCCTGGTGGTGAGAGATGGATATCAATGGAGGAAGTATGGGCAGAAGGTTACG
       D  S  S  L  V  V  R  D  G  Y  Q  W  R  K  Y  G  Q  K  V  T
 781  AGGGATAATCCATGTCCGAGAGCTTATTTCAGATGCTCGTTTGCTCCTACTTGCCCTGTT
       R  D  N  P  C  P  R  A  Y  F  R  C  S  F  A  P  T  C  P  V
 841  AAGAAAAAGGTGCAGGGAAGTGCCGATGATCAGTGCTTACTCGTGGCCACTTACGAAGGC
       K  K  K  V  Q  G  S  A  D  D  Q  C  L  L  V  A  T  Y  E  G
 901  GAGCACAACCACTACCAGTCGTCTGCGGCTGAAGTCGAAAACGCTGTAAGCCGGAAAACC
       E  H  N  H  Y  Q  S  S  A  A  E  V  E  N  A  V  S  R  K  T
 961  GCCGGCACGGCGGATGGCGTTGGAGCTTCCGGAGCTCCGGAGACGAAGGATAGTTGGGGG
       A  G  T  A  D  G  V  G  A  S  G  A  P  E  T  K  D  S  W  G
1 021 GAAAGAGAAGAAGCCCGGCAACCAGAGCTGAGGGAAAGGCTTGTGAAGGACATGGCCTCA
       E  R  E  E  A  R  Q  P  E  L  R  E  R  L  V  K  D  M  A  S
1 081 TCGCTGACAAAGGATCCAAACTTCACGGCGGTGATTGCCGCCGCGATCTCCGGAAGGTTT
       S  L  T  K  D  P  N  F  T  A  V  I  A  A  A  I  S  G  R  F
1 141 TTAGGCATTTCGACGGCGCAGGAGATGTGAGGTGGATCGTTGTGCTATTTTTCGTGCTAT
       L  G  I  S  T  A  Q  E  M  *
1 201 TTATTTGTAGTCATATATTTGTATATTTTAGGTTGAATTCTTTTGTTTTACTCCTCTTTT
1 261 GTTTTGATTATTTAGAAGTTGTATTAAAGAGTTCAATTGTTATGAATGCAGCTGCCCAAT
1 321 GCTAATGTTGTGAATA
```

起始密码子（ATG）和终止密码子（TGA）用*表示；灰色区域为 WRKY 转录因子的保守结构域；下划线部分是锌指结构域 C_2H_2；其中 C 和 H 残基用方框表示

*stands for start codon and stop codon; Gray area indicated conserved structural domain of WRKY transcription factor; Conserved C_2H_2 domain was highlighted by an underline in which motif C_2H_2 was labeled by box

图 2　铁皮石斛 DoWRKY5 基因的 cDNA 序列及编码的氨基酸序列

Fig. 2　cDNA and amino acid sequences of DoWRKY5 in *D. offiecinal*

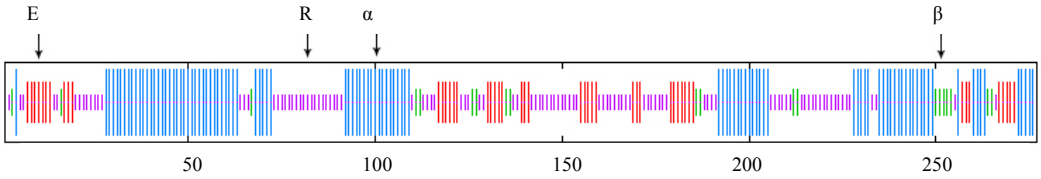
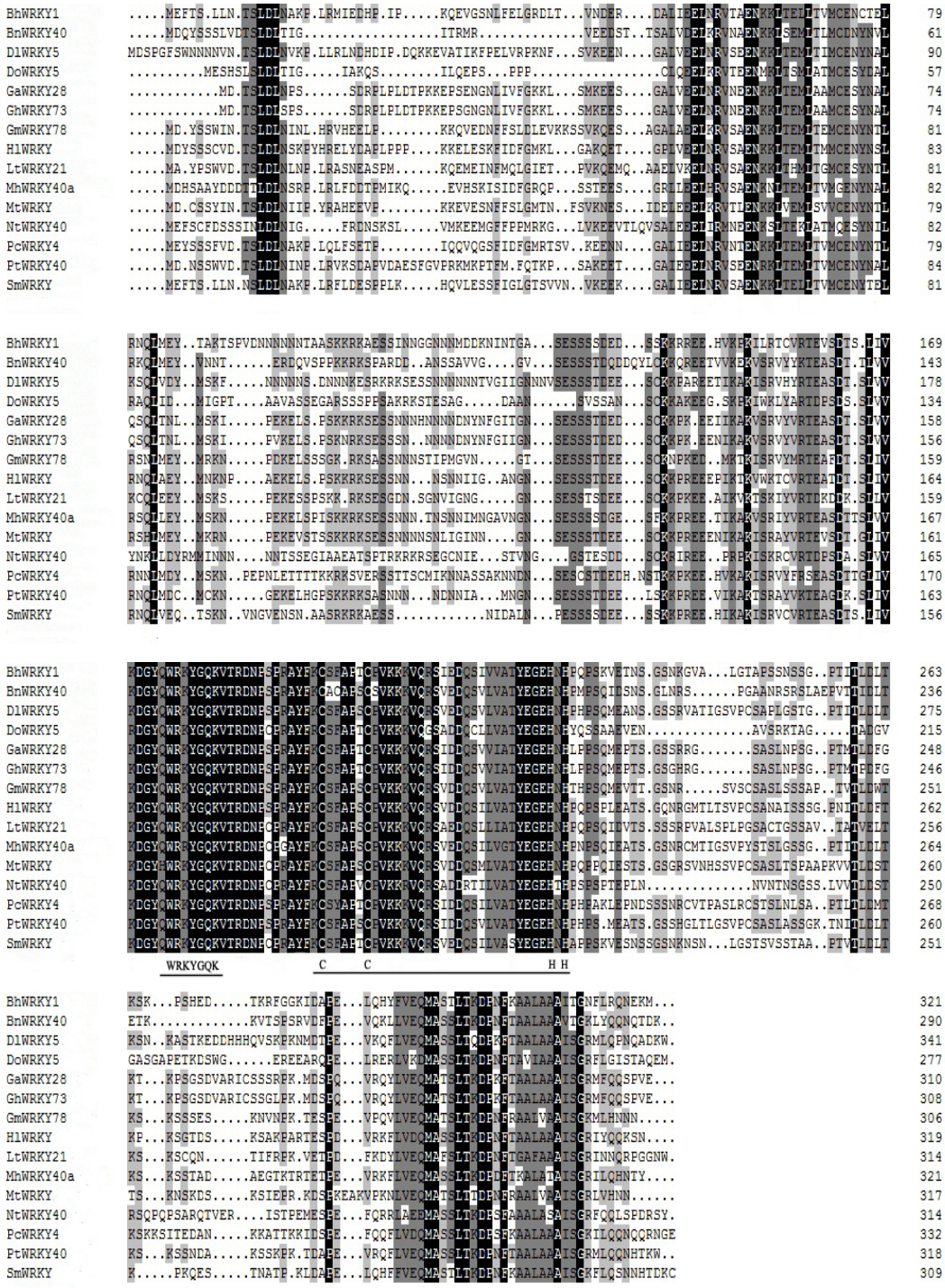


图 3　铁皮石斛 DoWRKY5 编码蛋白的二级结构

Fig. 3　Predicted secondary structure of DoWRKY5 protein in *D. offiecinal*

序列的保守结构域为 WRKY，其他氨基酸序列均含一个典型的 WRKY 保守结构域和 C_2H_2 锌指结构域，说明 DoWRKY5 基因为典型的 WRKY 家族成员。为进一步分析 DoWRKY5 与其他植物 WRKY 之间的关系，在多重比对的基础上，利用 MEGA5.0 对 15 种植物的 WRKY 蛋白构建系统进化树进行系统进化分析（图 5），结果表明，植物 WRKY 序列的进化明显分为双子叶植物和单子叶植物两类，铁皮石斛 DoWRKY5 与来自单子叶植物石蒜科的中国水仙（AIZ00534.1）聚在一起，符合植物分类学地位。



Bh-牛耳草（ACI62177.1） Bn-欧洲油菜（ACQ76806.1） Dl-龙眼（AEO31523.2） Ga-旱地锦（AIY62465.1） Gh-陆地锦（AIE43892.1） Gm-大豆（NP_001237392.1） Hl-啤酒花（CDP90453.1） Lt-三齿拉瑞阿（AAW30662.1） Mh-湖北海棠（AGG23550.1） Mt-蒺藜苜蓿（XP_003604245.1） Nt-中国水仙（AIZ00534.1） Pc-香芹（AAG35658.1） Pt-欧洲大叶杨（XP_006368511.1） Sm-丹参（AKA27900.1）
Bh-*Boea hygrometrica* (ACI62177.1) Bn-*Brassica napus* (ACQ76806.1) Dl-*Dimocarpus longan* (AEO31523.2) Ga-*Gossypium aridum* (AIY62465.1) Gh-*Gossypium hirsutum* (AIE43892.1) Gm-*Glycine max* (NP_001237392.1) Hl-*Humulus lupulus* (CDP90453.1) Lt-*Larrea tridentata* (AAW30662.1) Mh-*Malus hupehensis* (AGG23550.1) Mt-*Medicago truncatula* (XP_003604245.1) Nt-*Narcissus tazetta* var. *chinensis* (AIZ00534.1) Pc-*Petroselinum crispum* (AAG35658.1) Pt-*Populus trichocarpa* (XP_006368511.1) Sm-*Salvia miltiorrhiza* (AKA27900.1)

图 4 铁皮石斛 DoWRKY5 与其他植物 WRKY 氨基酸多序列比对

Fig. 4 Alignment of predicted amino acid sequences of DoWRKY5 in *D. offiecinal* and those of several other plants

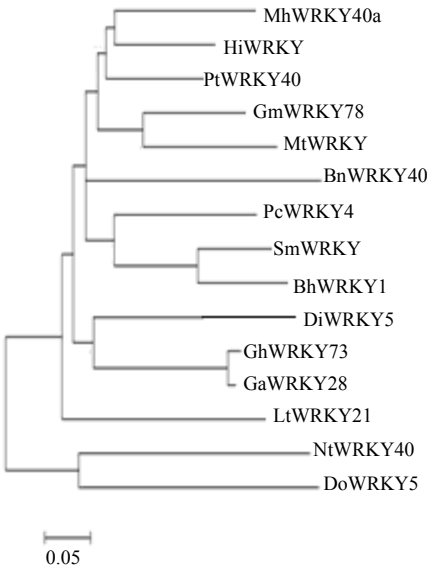


图 5　铁皮石斛 DoWRKY5 与其他植物的系统进化树分析

Fig. 5　Phylogenetic tree analysis of DoWRKY5 in *D. officinale* and other plants

2.4　铁皮石斛 DoWRKY5 基因的表达模式分析

2.4.1　铁皮石斛 DoWRKY5 基因组织特异性表达分析　利用实时荧光定量 qPCR 对 DoWRKY5 基因在根、茎、叶中的表达模式进行分析的结果表明（图 6），DoWRKY5 基因在叶中的表达量最高，其次是根，在茎中的表达量最低。虽然在铁皮石斛根、茎、叶中都有 DoWRKY5 基因的表达，但不同组织器官中的表达量存在明显差异，说明 DoWRKY5 基因在铁皮石斛中具有组织表达特异性，主要在叶片中进行表达。

2.4.2　铁皮石斛 DoWRKY5 基因在非生物胁迫下的表达模式　利用荧光定量 PCR 对 DoWRKY5 基因在不同低温、4 ℃不同时间、ABA 处理不同时间及不同质量浓度蔗糖处理下的表达模式进行分析，发现其表达量均有明显的变化。在不同低温处理下（图 7-A），DoWRKY5 基因的表达量均极显著高于对照，且在 0 ℃时表达量最高，说明低温处理 DoWRKY5 基因可被诱导表达；而在 4 ℃诱导处理下，DoWRKY5 基因在 4 ℃处理时其表达量均极显著高于对照，且在处理 24 h 时表达量达到最高（图 7-B），说明 DoWRKY5 基因在 4 ℃处理时可被迅速诱导，且持续增长；ABA 处理 2 h 时（图 7-C），叶片中 DoWRKY5 基因的表达量达到最高，在 8 h 时迅速降低，48 h 时达到最低，而后在 72 h 时又迅速升高，说明 DoWRKY5 基因能在 ABA 胁迫的早期响应这一生理过程；30 g/L 蔗糖渗透处理时（图 7-D），DoWRKY5 基因的表达量极显著高于对照且达到最高，而后随蔗糖质量浓度的升高，其表达量逐渐降低，说明高质量浓度的蔗糖可抑制 DoWRKY5 基因的表达。

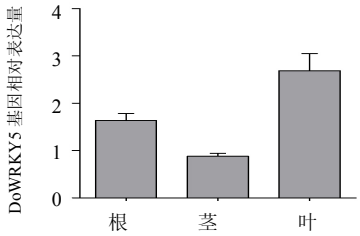


图 6　DoWRKY5 基因在根、茎、叶中的表达

Fig. 6　Expression profiles of DoWRKY5 gene in roots, stems and leaves

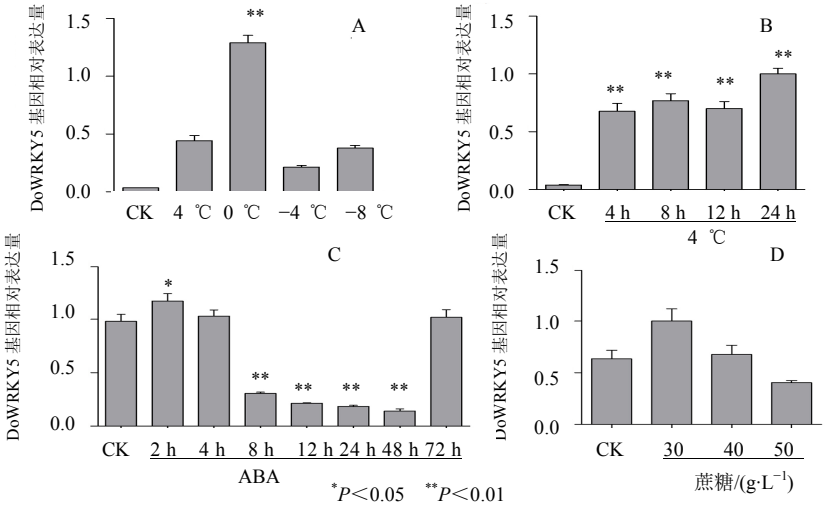


图 7　铁皮石斛 DoWRKY5 基因在不同低温 (A)、4 ℃处理不同时间 (B)、ABA (C) 和蔗糖 (D) 胁迫下的表达

Fig. 7　Expression profiles of DoWRKY5 gene in *D. officinale* induced by different low-temperature (A), 4 ℃ at different times (B), abscisic acid (C), and sucrose stress (D)

3 讨论

自 1994 年 Sumei 等[18]首次在甘薯中分离得到第一个 WRKY 蛋白（SPF1）后，人们陆续在拟南芥[19]、烟草[20]、土豆[21]和水稻[22]等多种植物中克隆到 WRKY 转录因子。目前已确定拟南芥基因组中有 74 个 WRKY 基因[23]，水稻基因组已明确 105 个完整的 WRKY 基因[24]。近年来 WRKY 转录因子的功能受到许多研究者的关注，越来越多的研究表明 WRKY 家族在植物抵御生物和非生物胁迫逆境的防卫反应中起到重要的调节作用[25-27]。仇玉萍等[28]从低温（4 ℃）诱导的水稻叶片 cDNA 文库中克隆获得 13 个 WRKY 基因，其中有 10 个 WRKY 基因的表达受到低温（4 ℃）、高温（42 ℃）、NaCl、PEG 等非生物逆境的影响。Wu 等[6]对小麦中的 8 个 WRKY 基因进行低温（3 ℃）处理，其中 6 个基因在 30 min 时迅速上调表达，说明低温诱导 WRKY 基因的表达。本研究中铁皮石斛 DoWRKY5 基因在不同低温处理 2 h 和 4 ℃不同时间处理下，均可上调表达，说明 DoWRKY5 基因受低温胁迫的诱导表达，且能快速响应低温胁迫，这和前人研究低温胁迫的研究结果相似。许多研究者还发现，一些冷诱导基因的表达不仅受低温的调控，还受 ABA 的影响[29]。Talanova 等[30]研究表明，小麦一个 WRKY 基因在低温处理 15 min 时表达量迅速上升，处理 1 d 后逐渐降低，然而，在加入外源 ABA 后低温处理时，其表达量逐渐升高，但显著低于未加入 ABA 时的表达量。铁皮石斛 DoWRKY5 基因在 ABA 处理下，先被诱导表达，然后又被抑制，在处理 72 h 时又被迅速诱导。WRKY 基因表达还具有组织特异性，在植物不同器官如根、茎、叶、花、果实中发现都有相关 WRKY 基因的表达，且表达量有所不同[31]。本研究 DoWRKY5 基因组织表达分析结果显示在铁皮石斛根、茎、叶中均有表达，但表达量不同，在叶中的表达量最高，其次是根，在茎中的表达量最低，表明 DoWRKY5 基因的表达量具有明显的组织特异性。这一研究结果与小麦 4 个 WRKY 基因（TaWRKY13、TaWRKY46、TaWRKY68-a、TaWRKY68-b）在小麦的组织特异性表达结果是一致的[7]。

铁皮石斛 DoWRKY5 基因在低温胁迫、ABA 胁迫和蔗糖胁迫下均被诱导表达，因此推测 DoWRKY5 基因在铁皮石斛应答低温胁迫等多种非生物胁迫中可能起重要的调控作用，对铁皮石斛抗寒机制的研究及耐低温品系选育有积极的意义。

参考文献

[1] 贾翠玲, 侯和胜. 植物 WRKY 转录因子的结构特点及其在植物防卫反应中的作用 [J]. 天津农业科学, 2010, 16(2): 21-26.

[2] 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.

[3] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, *et al*. WRKY transcription factors [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(5): 247-258.

[4] Yang P Z, Chen C H, Wang Z P, *et al*. A pathogen-and salicylic acid-induced WRKY DNA-bindingactivity recognizes the elicitor response element of thetobacco class I chitinase gene promoter [J]. *Plant J*, 1999, 18(2): 141-149.

[5] Yu D Q, Chen C H, Chen Z X. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(9): 1527-1539.

[6] Wu H L, Ni Z, Yao Y Y, *et al*. Cloning and expression profiles of 15 genes encoding WRKY transcription factor in wheat (*Triticum aestivem* L.) [J]. *Prog Nat Sci*, 2008, 18(16): 697-705.

[7] 张 娟. WRKY 转录因子功能研究进展 [J]. 西北植物学报, 2009(10): 2137-2145.

[8] Parinita A C. WRKY: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(15): 3883-3896.

[9] 冉 昆, 王少敏, 魏树伟, 等. 植物非生物胁迫相关的 WRKY 转录因子研究进展 [J]. 青岛农业大学学报, 2014, 31(3): 217-224.

[10] 李立芹. 烟草 WRKY12 基因的分离表达与多克隆抗体的制备 [J]. 核农学报, 2011, 25(3): 461-468.

[11] Caterina M, Elisabetta M, Cristina C, *et al*. Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold-and drought-response in barley [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 55(3): 399-416.

[12] Zhou Q Y, Tian A G, Zou H F. Soybean WRKY-type transcription factor genes, GmWRKY13, GmWRKY21, and GmWRKY54, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Plant Biotechnol J*, 2008, 6(3): 486-503.

[13] Hwang E W, Kim K A, Park S C, *et al*. Expression profiles of hot pepper (*Capsicum annuum*) genes under cold stress conditions [J]. *J Biosci*, 2005, 30(5): 657-667.

[14] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[15] 吴韵琴, 斯金平. 铁皮石斛产业现状及可持续发展的

探讨 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(15): 2033-2036.

[16] 斯金平, 何伯伟, 俞巧仙. 铁皮石斛良种选育进展与对策 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(4): 475-479.

[17] 李东宾, 高燕会, 斯金平, 等. 铁皮石斛 *HSP70* 基因的克隆及冷胁迫表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3446-3449.

[18] Sumie I, Kenzo N. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, *SPF1*, hat recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and β-amylase from sweet potato [J]. *Mol Gen Genet*, 1994, 244(21): 563-569.

[19] Pater S D, Greco V, Pham K, *et al*. Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis* [J]. *Nucl Acids Res*, 1996, 24(23): 4624-4626.

[20] Chen C H, Chen Z X. Isolation and characterization of two pathogen-and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 42(6): 387-396.

[21] Beyer K, Andres B, Boller T, *et al*. Identification of potato genes induced during colonization by phytophthora infestans [J]. *Mol Plant Pathol*, 2001, 2(3): 125-134.

[22] Xiao Q L, Xian Q B, Qian Q, *et al*. OsWRKY03, a rice transcriptional activator that functions in defense signaling pathway upstream of OsNPR1 [J]. *Cell Res*, 2005, 15(8): 593-603.

[23] Dong J X, Chen C H, Chen Z X. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 51(3): 21-37.

[24] Zhang Z L, Zhen X, Zou X L, *et al*. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(6): 1500-1513.

[25] Matton M P. Characterization of a *WRKY* transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense* [J]. *Planta*, 2004, 219(1): 185-189.

[26] Jing Li Gunter Brader, Palva E T. The *WRKY70* transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(2): 319-325.

[27] Xu X P, Chen C H, Fan B F, *et al*. Physical and functional interactions between pathogen-induced arabidopsis *WRKY18*, *WRKY40*, and *WRKY60* transcription factors [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(5): 1310-1316.

[28] 仇玉萍, 荆邵娟, 付 坚, 等. 13 个水稻 *WRKY* 基因的克隆及其表达谱分析 [J]. 科学通报, 2004, 49(18): 1860.

[29] Gustal V, Trischuk R, Weiser C J. Plant cold acclimation: the role of abscisic acid [J]. *J Plant Growth Regul*, 2005, 24(8): 308-318.

[30] Talanova V V, Titov A F, Topchieva L V, *et al*. Expression of WRKY transcription factor and stress protein genes in wheat plants during cold hardening and ABA treatment [J]. *Russian J Plant Physiol*, 2009, 56(5): 702-708.

[31] 李 蕾, 谢丙炎, 戴小枫, 等. WRKY 转录因子及其在植物防御反应中的作用 [J]. 分子植物育种, 2005, 3(3): 401-408.