

• 药材与资源 •

铁皮石斛转录因子基因 DoWRKY3 的克隆与分子特性分析

张 岗^{1,2}, 刘思思^{2,3#}, 彭 亮¹, 周丽思², 刘亮亮¹, 李 欢¹, 黑小斌¹, 沈 霞^{1*}, 郭顺星^{2*}

1. 陕西中医药大学药学院 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 西安 712046

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

3. 湖南省林业科学院, 湖南 长沙 410004

摘 要: 目的 克隆珍稀濒危药用植物铁皮石斛转录因子基因 DoWRKY3, 并进行生物信息学和表达模式分析。方法 采用 RT-PCR 和 RACE 技术获取基因全长; 利用生物信息学软件预测蛋白的理化性质、结构域和亚细胞定位等分子特性; 用软件 DNASTAR 6.0 和 MEGA 6.0 分别进行氨基酸多序列比对和进化关系分析; 借助定量 PCR 检测基因表达模式。结果 分离到 DoWRKY3 基因 (GenBank 注册号 KT957549), cDNA 全长 2 065 bp, 编码 1 条由 509 个氨基酸组成的多肽, 相对分子质量 55 580, 等电点 6.58; 推定的 DoWRKY3 氨基酸序列具有植物 WRKY 蛋白家族保守的 2 个 WRKY 结构域 (217~279、381~449)、2 个 WRKYGQK 位点和 2 个 C₂H₂ 型锌指结构元件 (C-X₄-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H); 该蛋白预测无信号肽或跨膜域, 定位在细胞核; DoWRKY3 蛋白与多种植物 WRKY 蛋白一致性较高 (46.3%~57.4%), 与拟南芥 AtWRKY3、AtWRKY4 和丹参 SmWRKY54 蛋白等亲缘关系近, 聚在 WRKY 分子进化树的 Group 1 分支; DoWRKY3 基因具有组织表达特异性, 其转录本在石斛根和叶中表达量较高, 分别为茎中的 2.32 倍和 1.69 倍。结论 DoWRKY3 基因全长的分子克隆与特征分析, 为深入研究该基因在铁皮石斛生长发育、逆境生理以及次级代谢调控中的生物学功能奠定基础。

关键词: 铁皮石斛; WRKY; 转录因子; 克隆; 定量 PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)14-2930-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.14.021

Molecular cloning and characterization of a transcription factor gene DoWRKY3 in *Dendrobium officinale*ZHANG Gang^{1,2}, LIU Si-si^{2,3}, PENG Liang¹, ZHOU Li-si², LIU Liang-liang¹, LI Huan¹, HEI Xiao-bin¹, SHEN Xia¹, GUO Shun-xing²

1. College of Pharmacy and Shaanxi Provincial Key Laboratory for Chinese Medicine Basis & New Drugs Research, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, China

Abstract: Objective To isolate and characterize a WRKY transcription factor encoding gene DoWRKY3 in a rare endangered medicinal orchid species *Dendrobium officinale*, followed by bioinformatics analysis and expression pattern detection. **Methods** RT-PCR and RACE technologies were used to isolate the full length cDNA of DoWRKY3. Characteristics of physiochemical properties, conserved domains, and subcellular localization of the deduced DoWRKY3 protein were determined by a series of bioinformatics tools. The analyses of multiple alignment and phylogenetic tree were performed using DNASTAR 6.0 and MEGA 6.0 softwares, respectively. Quantitative PCR was used for gene expression analysis. **Results** The full length cDNA of DoWRKY3 (GenBank accession KT957549) was 2 065 bp in length, and encoded a 509-aa protein with a molecular weight of 55 580 and an isoelectric point of 6.58; The deduced DoWRKY3 protein sequence had two WRKYGQK motifs, two WRKY domains (217—279, 381—449), and two C₂H₂-type zinc-finger signatures (C-X₄-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H), which are all conserved among the WRKY proteins.

收稿日期: 2016-12-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31101608); 陕西省自然科学基金项目 (2017JM8030); 陕西省青年科技新星项目 (2012KJXX-44)

作者简介: 张 岗, 男, 博士, 教授, 研究方向为药用植物生物技术与分子生物学。E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com

*通信作者 沈 霞, 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药系统药理学。E-mail: jxrain@163.com;

郭顺星, 男, 博士, 研究员, 研究方向为药用植物菌根生物学研究。Tel/Fax: (010)62829619 E-mail: sxguo1986@163.com

#并列第一作者 刘思思, 女, 博士研究生, 研究方向为药用植物分子生物学。E-mail: 329038560@qq.com

DoWRKY3 protein did not contain a signal peptide or a transmembrane region, and was predicted to locate in nucleus; DoWRKY3 had high identities (46.3%—57.4%) with various WRKY proteins from several plants; DoWRKY3 was closely related to *Arabidopsis* AtWRKY3, AtWRKY4, and *Salvia miltiorrhiza* SmWRKY54 proteins, and belonged to the Group 1 of the WRKY evolutionary tree; DoWRKY3 gene was differentially expressed in the three included organs. The transcripts were more abundant in the roots and leaves, with 2.32 and 1.69 fold, respectively, over that in the stems. **Conclusion** Molecular cloning and characterization of the full length DoWRKY3 gene will be useful for further functional determination of the gene involving in the growth and development, physiological stress adaptations, and secondary metabolic regulations of *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; WRKY; transcription factor; clone; quantitative PCR

在长期的进化过程中,植物通过启动蛋白激酶、转录因子等调节基因的表达,在细胞、植株水平产生一系列复杂的生理生化机制,维系自身在各种环境条件下的生理适应性^[1]。WRKY 转录因子是植物特有的一大类新型锌指蛋白转录因子,得名系因蛋白序列中都有 1 或 2 个大约由 60 个氨基酸组成的保守 WRKY 结构域,其中又包含 WRKYGQK (该基序在一些 WRKY 蛋白中存在变异)和锌指结构元件^[2]。根据 WRKY 结构域和锌指结构元件的数量将 WRKY 转录因子分为 3 类^[3],I 类含有 2 个 WRKY 结构域,II 和 III 类仅 1 个 WRKY 结构域,I 和 II 类具有 C₂H₂ 型锌指元件 (C-X₄-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H),III 类锌指元件为 C₂HC 型 (C-X₄-C-X₂₃-H-X₁-C)。WRKY 结构域与锌指元件通过与目标基因启动子的 W-box ([T][T]TGAC[C/T])、WK-box (TTTTCAC) 等元件结合以实现靶基因的表达调控,进而发挥 WRKY 转录因子的分子功能^[2-3]。

目前已从拟南芥^[4]、水稻^[5]、葡萄^[6]、杨树^[7]和丹参^[8]等许多植物中分离到 WRKY 家族成员,这些基因在染色体、转录、翻译及翻译后修饰等水平进行不同层次精细调控,参与植物细胞各种生理生化过程。如 OsWRKY78 调节水稻茎秆伸长和种子发育^[9]。AtWRKY46 通过 ABA 信号通路和生长素稳态,调节高渗或高盐条件下拟南芥侧根的发育^[10]。OsWRKY6 正调控病程相关蛋白 PR (pathogenesis-related) 10a 基因表达,从而降低宿主细胞对病原菌的感病性^[11]。过表达小麦 TaWRKY44 基因的烟草植株,表现出对干旱、高盐及高渗等环境胁迫的生理适应性^[12]。另外,WRKY 在黄花蒿 *Artemisia annua* Linn.^[13]、长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don^[14]中参与关键活性次生代谢产物的合成调控。可见,WRKY 转录因子在植物生长发育、生理代谢、生物或非生物胁迫、次级代谢等多种生命活动中起重要作用。

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* Sw. 药用植物中最为珍稀名贵的种,其药用部位为新鲜或干燥茎,具有益胃生津、滋阴清热、润肺止咳、明目强身等作用^[15]。石斛属植物主要含有多糖、生物碱、芪类、酚类以及木脂素等多种活性成分,具有重要的药理活性,如石斛多糖能增强机体体液、细胞免疫,具有抗肿瘤、抗氧化等作用,因而是石斛类药材质量控制的主要标准之一^[16]。WRKY 转录因子可能在铁皮石斛生长发育、逆境生理或次级代谢调控中起重要作用。目前仅有 2 个铁皮石斛 WRKY 基因克隆与表达的研究报道,即 DoWRKY1^[17]和 DoWRKY2^[18],鉴定更多的石斛 WRKY 基因并最终阐明其生物学功能更为迫切。前期,本课题组利用 SSH 技术富集真菌侵染铁皮石斛种子共生萌发的差异表达基因^[19],分离得到一条 572 bp 的表达序列标签 (EST),BLASTx 分析显示其与葡萄 *Vitis vinifera* L. VvWRKY2 基因 (GenBank 注册号 NM_001281181) 一致性较高 (55%)。本研究利用定量 PCR (qPCR) 和 RACE 技术从铁皮石斛分离到 1 个 WRKY 基因 cDNA 全长 DoWRKY3,并进行生物信息学及表达模式分析,为进一步揭示其生物学功能奠定基础。

1 材料

野生植物材料采自云南西双版纳,由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所郭顺星研究员鉴定为兰科石斛属铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Migo。取石斛根、茎、叶组织样品,液氮速冻后置 -80 °C 保存备用。

2 方法

2.1 RNA 提取和 cDNA 合成

按照 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒 (Aidlab 公司,中国) 操作说明制备各样品总 RNA, NanoDrop™ 2000 分光光度计 (Thermo Fisher 公司,美国) 分析 RNA 质量、纯度,琼脂糖凝胶电泳检

测完整性。按照 M-MLV Reverse Transcriptase kit (Promega 公司, 美国) 操作说明, 逆转录合成 cDNA 第 1 链, -20°C 保存备用。

2.2 RACE 和 qPCR 验证

序列分析表明, 原始 EST 仅编码一段由 206 个氨基酸残基组成的 WRKY 肽链, 氨基和羧基端不完整, 因此需要进行 5'/3'-RACE 反应。设计 2 对基因特异引物, 5'-RACE 引物为 DoWRKY3-R 5'-GATTCTCCCGCAATGTTCTCTCTAAT-3'; 3'-RACE 引物为 DoWRKY3-F 5'-GGTTTGGCAAGAACAACATCAGAA-3', 按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司, 日本) 说明书, 分别与 UPM 引物组合进行 2 次 RACE。

2 次 RACE-PCR 反应体系均为 25 μL , 包括 10 $\times$ Advantage[®] 2 PCR buffer 2.5 μL , dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL , DoWRKY3-R 或 DoWRKY3-F (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , 10 $\times$ UPM 0.5 μL , 5'-RACE ready cDNA 或 3'-RACE ready cDNA 模板各 1.0 μL , 50 $\times$ Advantage[®] 2 Polymerase Mix (5 U/L) 0.5 μL , ddH₂O 19.5 μL 。PCR 程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, TianGen 胶回收试剂盒 (TianGen 公司, 中国) 纯化目的条带, 连接至 pMD18-T vector (Takara, 中国), 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 感受态细胞, 随机挑选 3 个克隆并送上海生工生物工程有限公司测序。所获 cDNA 序列与原 EST 拼接, 设计跨开放阅读框 (ORF) 引物 DoWRKY3-S: 5'-ATGTCAGAGAATGCGGC-3', DoWRKY3-AS: 5'-CTATGTCATCTCATGTTCTCTCTTT-3', 进行全长基因 RT-PCR 验证。

2.3 序列分析

使用一系列网络在线工具进行 DoWRKY3 基因核酸及编码蛋白的生物信息学序列分析。利用 NCBI 的 BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 和 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析 cDNA 序列; 用 ExPASy Proteomics Server 的 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/iprscan/>) 和 PROSITE SCAN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_proscan.html) 分析 DoWRKY3 蛋白结构域和基元; ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 和 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 分析蛋白质理化性质和二级结构; 采用

SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质三维建模分析; SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测蛋白质信号肽和跨膜区域; Plant-mPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 进行蛋白质亚细胞定位分析。采用 DNASTAR 6.0 进行氨基酸序列比对分析; 借助 MEGA 6.0 构建系统进化树。

2.4 定量 PCR 分析

分别用 2 μg 根、茎、叶样品总 RNA 反转录合成 cDNA, EF1 α 作为内参基因^[20], qPCR 分析 DoWRKY3 基因的组织表达模式。qPCR 引物 DoWRKY3-qRT-S: 5'-GTGGAGGAGGTGGAAGAGAGC-3' 和 DoWRKY3-qRT-AS: 5'-TCCAATCAGTGTCAAAGAGGGT-3' 的扩增产物长 320 bp。用 ABI PRISM 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国) 进行 qPCR。反应体系 25 μL 包括 2 $\times$ SYBR[®] Premix Ex TaqTM Master Mix (Takara, 中国) 12.5 μL , 正反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , ROX 0.5 μL , cDNA 2 μL , ddH₂O 9 μL 。每个反应重复 3 次, 包括不加模板的对照, 实验重复 3 次。PCR 程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 40 个循环, 反应结束绘制熔解曲线。根据 ABI PRISM 7500 SDS 软件 (Applied Biosystems, 美国) 生成的循环阈值 (cycle threshold, Ct), 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法^[21] 计算基因的相对表达量。

3 结果与分析

3.1 DoWRKY3 基因全长克隆

5'/3'-RACE 反应均产生单一条带, 经克隆、测序、去载体获得扩增产物长度为 478、1 297 bp 的目标序列 (图略), 与原始 EST 拼接成一条 2 065 bp 的 cDNA; BLASTx 分析表明其与 GenBank 中已注册的多种植物 WRKY 转录因子基因有较高的相似性 (49%~57%), 将其命名为 DoWRKY3, 提交 GenBank 获得注册号 KT957549。该 cDNA 序列包含完整 ORF 长 1 530 bp, 5'-UTR 长 91 bp, 3'-UTR 长 444 bp, 具有 2 个真核生物 mRNA 加尾信号 AATAA 以及 polyA 尾巴, 起始密码子附近碱基序列 CCGATGT 并不符合 KOZAK 规则 (即 A/GNNATGG)^[22]。使用 DoWRKY3-S/DoWRKY3-AS 引物进行 RT-PCR 验证扩增产生单一条带 (图 1), 克隆、测序分析其为完整 ORF, 进而证明已成功获得 DoWRKY3 基因全长 cDNA。

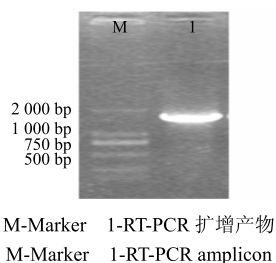


图 1 DoWRKY3 基因全长 cDNA 克隆

Fig. 1 Cloning of full length DoWRKY3 gene in *D. officinale*

3.2 DoWRKY3 基因编码的蛋白理化特性分析

ProtParam 预测 DoWRKY3 基因编码的蛋白质的分子式为 $C_{2373}H_{3742}N_{722}O_{789}S_{18}$ ，包含 509 个氨基酸残基，相对分子质量 55 580，等电点 6.58；DoWRKY3 蛋白带正电残基 (Arg+Lys) 为 55，负电残基 (Asp+Glu) 为 59。该蛋白的不稳定系数为 60.77，脂肪系数为 57.70，亲水性系数为 -0.824。SOPMA 分析表明，DoWRKY3 蛋白二级结构主要由 α 螺旋 (23.58%)、随机卷曲 (52.26%)、延伸链 (16.31%) 和少量的 β 转角 (7.86%) 组成。

3.3 DoWRKY3 蛋白结构域、定位和跨膜区分析

InterProScan 分析结果 (图 2) 显示，DoWRKY3 蛋白具备高等植物 WRKY 蛋白的保守 WRKY 结构域 (217~279、381~449)。PROSITE SCAN 分析 DoWRKY3 蛋白含有 5 种功能基元，包括 5 个 N 糖基化位点 (178~181、313~316、453~456、457~460、470~473)、3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (190~192、323~325、369~371)，15 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (10~13、25~28、48~51、75~78、157~160、203~206、296~299、323~326、337~340、338~341、372~375、382~385、384~387、438~441、472~475)、1 个酪氨酸激酶磷酸化位点 (218~224) 和 4 个 *N*-豆蔻酰化位点 (5~10、6~11、113~118、483~488)。SignalP 4.0 分析蛋白不含信号肽，TMHMM 分析其亦不具有跨膜结构域，Plant-mPLOC 预测该蛋白定位在细胞核。

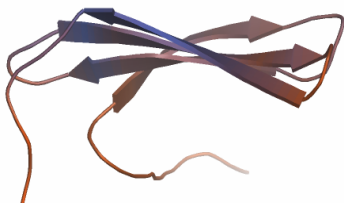


图 2 基于 SWISS-MODEL 的 DoWRKY3 蛋白三维建模
Fig. 2 Three-dimensional structure of DoWRKY3 protein based on SWISS-MODEL

3.4 DoWRKY3 蛋白的三维建模

将 DoWRKY3 蛋白序列提交 SWISS-MODEL 数据库，以蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB) 中已提交的拟南芥 AtWRKY4 (PDB No.1WJ2.1) A 链晶体分子^[23]为模板，进行同源建模结构预测。图 3 结果显示，DoWRKY3 与 AtWRKY4 蛋白结构域序列有 88.73% 相似性，空间结构类似，且在其序列 380~450 处形成具有 4 个 β 折叠反向平行的 β 片层结构。

3.5 DoWRKY3 与植物 WRKY 蛋白序列比对分析

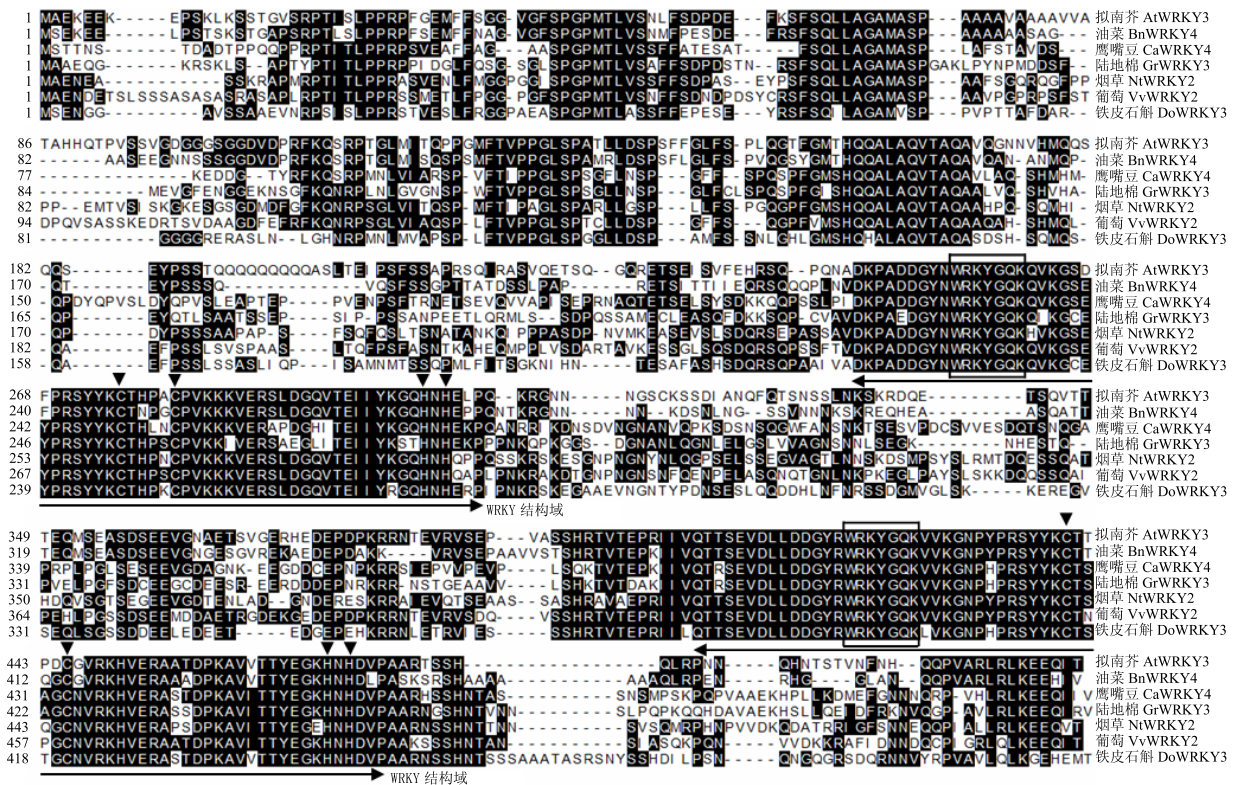
运用 DNASTAR 6.0 中的 MegAlign 程序，对 DoWRKY3 与代表性植物的 6 个 WRKY 转录因子蛋白进行多序列比对 (图 3)。结果显示，铁皮石斛 DoWRKY3 蛋白与葡萄 VvWRKY2 (NP_001268110) 的一致性最高，为 57.4%；与烟草 *Nicotiana tabacum* L. NtWRKY2 (AAD16139) 的一致性次之，为 53.4%；与鹰嘴豆 *Cicer arietinum* L. CaWRKY4 (XP_004491858)、油菜 *Brassica napus* L. BnWRKY4 (XP_013707826) 的一致性近似，分别为 50.5%、50.3%；与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. AtWRKY3 (NP_178433) 和陆地棉 *Gossypium raimondii* Ulbr. GrWRKY3 (XP_012483543) 的一致性略小于 50%，分别为 49.7%、46.3%。DoWRKY3 具备植物 WRKY 蛋白家族保守的 2 个 WRKY 结构域，2 个 WRKYGQK 位点以及 2 个 C_2H_2 型锌指结构元件 (C-X₄-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H)，推测该基因属于 I 类 WRKY 转录因子^[3]。

3.6 DoWRKY3 基因编码蛋白的系统进化树分析

利用 MEGA 6.0 软件，采用临近法 (neighbour-joining, NJ) 构建 DoWRKY3、DoWRKY1 和 DoWRKY2 蛋白与拟南芥、水稻和丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 3 种植物 WRKY 家族部分蛋白的系统进化树 (图 4)。结果表明，25 个蛋白聚成植物 WRKY 蛋白家族分子进化树的 Group 1、Group 2 2 大分支；DoWRKY1 和 DoWRKY2 分别被聚在 Group 2、Group 1 分支，与已报道的研究结果^[5-8]一致；DoWRKY3 被聚在 Group 1 分支，AtWRKY3 AtWRKY4、SmWRKY54 的进化关系最近。

3.7 基因表达模式分析

分别提取石斛根、茎、叶等样品总 RNA，利用 qPCR 技术检测 DoWRKY3 基因的组织表达模式。图 5 结果表明，DoWRKY3 在 3 种器官中均有表达，但相对表达量存在差异。以茎为校正样本，该基因



方框为 2 个 WRKYGQK 位点；双箭头为 2 个 WRKY 结构域；三角形为 2 个锌指元件

The boxes show the two conserved WRKYGQK motifs; The arrows represent the two WRKY domains; The triangles indicate the two zinc-finger motifs

图 3 DoWRKY3 与其他植物 WRKY 蛋白多序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of DoWRKY3 and WRKY proteins from other plants

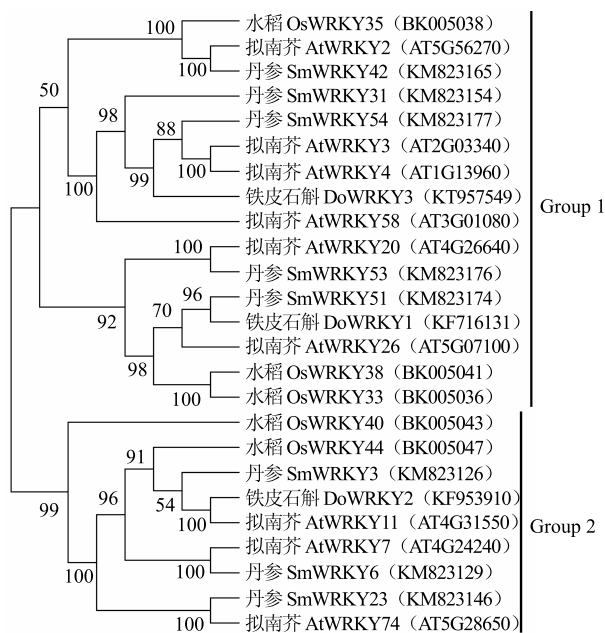


图 4 DoWRKY3 与 3 种植物 WRKY 家族部分蛋白的进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of DoWRKY3 with some WRKY proteins from three plants

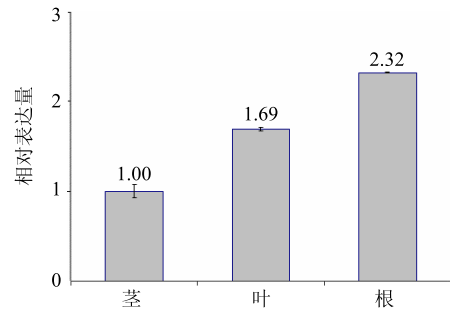


图 5 利用 qPCR 分析 DoWRKY3 基因的组织表达模式

Fig. 5 Tissue-specific expression pattern of DoWRKY3 gene using qPCR analysis

转录本在石斛根中的表达量较高，叶中次之，分别为茎中的 2.32 倍和 1.69 倍。

4 讨论

WRKY 作为植物特有的一大类转录因子，通过调节细胞靶基因表达水平，在植物抗病反应、非生物胁迫、衰老、种子和腺毛发育、胚胎发生以及激素响应等众多方面，抗逆生理、植物-病原物互作等方面发挥着极其重要的作用^[2-3, 9-14]。WRKY 转录因子呈多基因家族，系统性分析多来自模式植物和作

物,仅有少数药用植物的相关报道。现已从拟南芥、水稻、葡萄和杨树等植物中报道分别有 72、102、59 和 100 个 WRKY 基因^[4-9],最近在大宗药材丹参中也鉴定到 61 个 WRKY 成员。本研究利用 RACE 克隆获 DoWRKY3 基因全长,其编码蛋白具有 2 个 WRKY 结构域,与多种植物 WRKY 蛋白基因一致性较高,进化上属于 WRKY 分子进化树的 Group 1^[5-8]。这些结果说明 DoWRKY3 是编码铁皮石斛 WRKY 蛋白的新基因。

蛋白的结构域特征是决定功能的重要基础。系统性研究发现,WRKY 蛋白家族属于锌指转录调控因子超家族,其典型结构具有保守的 WRKY 结构域^[2]。DoWRKY3 蛋白包含 2 个 WRKY 结构域、2 个 WRKYGQK 基序和 2 个 C₂H₂ 型锌指结构元件,这些特征均与 I 类 WRKY 蛋白典型结构^[2-3]相一致,如 DoWRKY1 蛋白^[17]。Plant-mPLOC 预测 DoWRKY3 蛋白定位在细胞核,这符合其作为转录因子的核定位属性。DoWRKY3 的三维结构含有 4 个 β 折叠,与 AtWRKY4 A 链晶体结构类似^[23],在 AtWRKY1 的研究中, β 2 和 β 3 之间的 β 折叠区域对蛋白与 DNA 的结合能力至关重要^[24]。这些结构特征为 DoWRKY3 生化功能研究提供依据。

WRKY 家族基因的分子表达特性差异与其所调控的植物生理代谢过程关系密切。OsWRKY78 在水稻根和叶鞘中表达量较低,在叶片中表达量随其成熟而增强,在伸长的茎中表达量最高^[9]。丹参 WRKY 基因在根、茎、叶和花中高度表达的基因数量分别为 22、13、4 和 1 个^[11],说明这些基因功能有明显差异。WRKY 基因除了具有组织表达特异性,还能响应各种生物与非生物胁迫,通过脱落酸(ABA)、茉莉酸(MeJA)、水杨酸(SA)或生长素(Auxin)等多种激素信号转导途径,诱导或抑制目标基因表达,参与各种植物生理过程^[6-8]。AtWRKY46 通过 ABA 信号通路调节拟南芥侧根发育^[10]。OsWRKY6 响应 SA 诱导 PR 10a 基因表达,增强宿主抗病性^[11]。本研究 qPCR 分析表明,DoWRKY3 相对表达量有显著性差异,依次为根>叶>茎,说明该基因通过特异的分子表达机制参与植物组织的生长发育。DoWRKY1 基因在石斛根、茎、叶和类原球茎中表达量无显著差异^[17],而 DoWRKY2 基因在石斛叶中表达量最高^[18],DoWRKY3 在根中的高表达特征暗示其很可能在石斛根中执行重要的功能。

铁皮石斛具有重要的经济价值和临床疗效,是当前我国中医药界的研究热点,但其生长条件苛刻,对环境依赖性较强,存在与真菌共生现象,分子生物学基础研究又相对薄弱,限制了石斛资源的可持续控制。WRKY 转录因子在植物各项生命活动中发挥重要作用,基因家族成员数目众多,生物学功能多样而复杂。挖掘铁皮石斛 WRKY 家族基因成员并进行功能分析,将为石斛品质形成的分子机制提供基础资料。本研究后续将进一步研究 DoWRKY3 蛋白生化与生物学功能,鉴定 WRKY 家族其他成员及其功能,为通过遗传工程手段改良铁皮石斛种质提供理论支撑。

参考文献

- [1] Xia N, Zhang G, Liu X Y, *et al.* Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(8): 3703-3712.
- [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] Schluttenhofer C, Yuan L. Regulation of specialized metabolism by WRKY transcription factors [J]. *Plant Physiol*, 2015, 167(2): 295-306.
- [4] Dong J, Chen C, Chen Z. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 51(1): 21-37.
- [5] Wu K L, Guo Z J, Wang H H, *et al.* The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins [J]. *DNA Res*, 2005, 12(1): 9-26.
- [6] Wang M, Vannozzi A, Wang G, *et al.* Genome and transcriptome analysis of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family [J]. *Hortic Res*, 2014, 1: 14016-14020.
- [7] 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]. *J Exp Bot*, 2014, 65(22): 6629-6644.
- [8] Li C, Li D, Shao F, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of WRKY transcription factor genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 200-206.
- [9] Zhang C Q, Xu Y, Lu Y, *et al.* The WRKY transcription factor OsWRKY78 regulates stem elongation and seed development in rice [J]. *Planta*, 2011, 234(3): 541-554.

- [10] Ding Z J, Yan J Y, Li C X, *et al.* Transcription factor WRKY46 modulates the development of *Arabidopsis* lateral roots in osmotic/salt stress conditions via regulation of ABA signaling and auxin homeostasis [J]. *Plant J*, 2015, 84(1): 56-69.
- [11] Choi C, Hwang S H, Fang I R, *et al.* Molecular characterization of *Oryza sativa* WRKY6, which binds to W-box-like element 1 of the *Oryza sativa* pathogenesis-related (PR) 10a promoter and confers reduced susceptibility to pathogens [J]. *New Phytol*, 2015, 208(3): 846-859.
- [12] Wang X, Zeng J, Li Y, *et al.* Expression of *TaWRKY44*, a wheat WRKY gene, in transgenic tobacco confers multiple abiotic stress tolerances [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 615.
- [13] Ma D M, Pu G B, Lei C Y, *et al.* Isolation and characterization of *AaWRKY1*, an *Artemisia annua* transcription factor that regulates the amorpha-4,11-diene synthase gene, a key gene of artemisinin biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2019, 50(12): 2146-2161.
- [14] 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(4): 2081-2093.
- [15] 张 岗, 胡本祥, 张大为, 等. 铁皮石斛咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶基因的分离与表达分析 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1143-1149.
- [16] 周 佳, 周先丽, 梁成钦, 等. 铁皮石斛化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1292-1295.
- [17] 赵 俊, 孙时伟, 孟灿灿, 等. 铁皮石斛转录因子基因 *DoWRKY1* 的克隆与表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(14): 2807-2813.
- [18] 赵 俊, 孟灿灿, 赵亦帆, 等. 铁皮石斛转录因子基因 (*DoWRKY2*) 的克隆与表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(8): 1049-1057.
- [19] Zhao M M, Zhang G, Zhang D W, *et al.* ESTs analysis reveals putative genes involved in symbiotic seed germination in *Dendrobium officinale* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72705.
- [20] Zhang G, Song C, Zhao M M, *et al.* Characterization of an A-type cyclin-dependent kinase gene from *Dendrobium candidum* [J]. *Biologia*, 2012c, 67(2): 360-368.
- [21] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [22] Kozak M. An analysis of 50-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(20): 8125-8132.
- [23] Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, *et al.* Solution structure of an *Arabidopsis* WRKY DNA binding domain [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(3): 944-956.
- [24] Duan M R, Nan J, Liang Y H, *et al.* DNA binding mechanism revealed by high resolution crystal structure of *Arabidopsis thaliana* WRKY1 protein [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(4): 1145-1154.