



铁皮石斛WOX转录因子的鉴定和分析

曾丹琦, 张明泽, 何春梅, 王浩斌, 俞振明, 司灿, 赵聪慧, 李冬妹, 段俊

引用本文:

曾丹琦, 张明泽, 何春梅, 等. 铁皮石斛WOX转录因子的鉴定和分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2021, 29(3): 301–310.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4294>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

印度梨形孢对铁皮石斛种子萌发和原球茎生长的影响

Effects of *Piriformospora indica* on Seed Germination and Protocorm Growth of *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(1): 59–66 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4231>

毛竹APX家族基因鉴定和表达分析

Identification and Expression Analysis of the APX Gene Family in *Phyllostachys edulis*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 255–264 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4155>

铁皮石斛DoSMT2基因的克隆与表达分析

Cloning and Expression Analysis of *DoSMT2* Gene in *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(6): 591–598 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4234>

铁皮石斛体细胞胚胎发生类受体激酶基因DoSERK的克隆和表达分析

Cloning and Expression Analysis of Somatic Embryogenesis Receptor Kinase Gene (DoSERK) from *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

热带亚热带植物学报. 2015(5): 518–526 <https://doi.org/10.11926/j.issn.1005-3395.2015.05.006>

瘤菌根菌对铁皮石斛根系形态的影响及其共生关系的研究

Effect of *Epulorhiza* sp. on Root Morphology of *Dendrobium officinale* and Their Symbiotic Relationship

热带亚热带植物学报. 2020, 28(2): 124–130 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4093>

铁皮石斛 WOX 转录因子的鉴定和分析

曾丹琦^{1,2}, 张明泽^{1,2}, 何春梅¹, 王浩斌^{1,2}, 俞振明¹, 司灿^{1,2}, 赵聪慧^{1,2},
李冬妹³, 段俊^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广东省应用植物学重点实验室, 中国科学院华南农业植物分子分析与遗传改良重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 顺德职业技术学院, 广东 佛山 528300)

摘要: 为了解铁皮石斛(*Dendrobium officinale*) WOX 转录因子的功能, 采用全基因组分析技术对铁皮石斛 WOX 家族成员进行鉴定, 并进行生物信息学和表达模式分析。结果表明, 铁皮石斛基因组中有 9 个 WOX 转录因子(DoWOX 1~DoWOX 9), 大部分的 DoWOXs 含有 2~3 个外显子, 启动子含有与激素诱导、逆境胁迫和生长发育有关的顺式作用元件。qPCR 分析表明, DoWOX1、DoWOX2、DoWOX3、DoWOX4 和 DoWOX9 在类原球茎中的表达量最高, DoWOX4 在小花蕾中表达最高, 随着花的发育, 表达呈现下降趋势。此外, DoWOX3、DoWOX7 和 DoWOX9 在合蕊柱上的表达量最高, 而 DoWOX4 在唇瓣的表达量最高。因此, DoWOXs 可能参与调控铁皮石斛的生长发育, 且可能在维持类原球茎状态和花的发育中起重要作用。

关键词: 铁皮石斛; WOX 转录因子; 生物信息学; 基因表达; qPCR

doi: 10.11926/jtsb.4294

Identification and Analysis of WOX Transcription Factor in *Dendrobium officinale*

ZENG Dan-qi^{1,2}, ZHANG Ming-ze¹, HE Chun-mei¹, WANG Hao-bin^{1,2}, YU Zhen-ming¹, SI Can^{1,2},
ZHAO Cong-hui^{1,2}, LI Dong-mei³, DUAN Jun^{1*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, Key Laboratory of South China Agricultural Plant Molecular Analysis and Gene Improvement, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Shunde Polytechnic, Foshan 528300, Guangdong, China)

Abstract: In order to understand the function of transcription factor WOX in *Dendrobium officinale*, the WOX family members in *D. officinale* were identified by whole genome analysis techniques, the bioinformatics of WOXs and expression patterns of WOXs were analyzed. The results showed that there were nine WOX transcription factors in *D. officinale* genome, named DoWOX 1 to DoWOX 9, respectively. The most of DoWOXs contained 2–3 exons, while DoWOX9 had only one exon. The promoters of DoWOXs contained *cis*-regulatory elements related to hormone induction, stress responsive, plant growth and development. The expression of DoWOX1, DoWOX2, DoWOX3, DoWOX4 and DoWOX9 were the highest at protocorm-like body (PLB) stage by qPCR, which of DoWOX4 was the highest at small flower bud stage, and then decreased. In addition, the expressions of DoWOX3, DoWOX7 and DoWOX9 were the highest in columns, and that of DoWOX4 was the highest in lips. Therefore, DoWOXs might be involved in regulating the growth and development of *D. officinale*, and play an important role in maintenance of PLBs state and flower development.

收稿日期: 2020-08-18 接受日期: 2020-09-23

基金项目: 中国科学院华南农业植物分子分析与遗传改良重点实验室开放课题(KF202008); 广州市科技计划项目(201707010345)资助

This work was supported by the Open Project of Key Laboratory of South China Agricultural Plant Molecular Analysis and Genetic Improvement, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences (Grant No. KF202008); and the Project for Science and Technology Planning in Guangzhou (Grant No. 201707010345).

作者简介: 曾丹琦(1997~), 女, 硕士研究生, 从事铁皮石斛生物技术育种研究。E-mail: ZengDanqi20@scbg.ac.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: duanj@scib.ac.cn

Key words: *Dendrobium officinale*; WOX transcription factor; Bioinformatics analysis; Gene expression; qPCR

植物展示出非凡的再生能力, 保证发育的可塑性。植物干细胞是未分化的细胞, 位于分生组织, 未分化的状态为稳定的遗传性、较高的线粒体活性以及很强的分化和自我更新能力等奠定了基础^[1-2], 进而对环境变化信号快速响应和对植物发育进程参与调控^[3]。植物细胞全能性在生物技术具有广泛的应用市场。目前对于植物的干细胞研究主要在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 等的茎尖干细胞^[4-5]、水稻 (*Oryza sativa*) 等的根尖干细胞^[6]上, 植物干细胞发生机理在种苗生产、生物技术等领域扮演举足轻重的角色。

WOX 家族(WUSCHEL-related homeobox)是真核细胞 homeobox (HB)超家族中的一员^[7-8]。WOX 转录因子具有“螺旋-环-螺旋-转角-螺旋”的典型结构^[8-9], 在植物发育过程中扮演重要的调控角色^[10-11], 包括在植物干细胞维持、胚胎形成及茎干、根和花的发育等。有研究表明, WOX5 在根和茎分生组织中干细胞生态位的发育上具有重要作用^[11-12]; 植物的胚胎发育是个复杂的过程, 不仅受到运输调控, 而且受到局部生长素反应的影响^[13], WOX 可以决定植物胚胎发育的细胞命运^[12]; 在根发育中, WOX11 在根基源细胞中表达^[12, 14]以激活 LBD16, 进而保证根的正常发育; 在形成层干细胞中, WOX4 和其余 WUS 成员在干细胞维持中起重要作用^[15-16]; WOX 转录因子在花的结构和发育上具有重要的调控作用^[17], WUS 被认为是花干细胞维持必需的基因^[17-18], 在矮牵牛 (*Petunia hybrid*) 和烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中 WOX1 是保证花器官结构正常的必需基因^[19-20]。WUS 家族蛋白成员可以分为 3 个进化支: 分别为 WUS、Ancient 和 Intermediate^[8], 但对其功能还不清楚。

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属草本植物, 具有较高的药用价值, 具有抗肿瘤、增加免疫力和益胃生津等功效^[21-22]。由于对过度采挖导致野生资源大量减少, 因此从分子水平研究铁皮石斛的生长发育对保护其资源具有重大意义。目前关于 WOX 转录因子的功能研究主要在模式植物拟南芥和水稻上, 对中药材如铁皮石斛^[23-24]的相关研究鲜见报道。此外, 兰科植物的花在结构上高度特化, 如具有形态特异的萼片、唇瓣和合蕊柱^[25]。本研究根据已报道的铁皮石斛基因组数据^[26], 对其 WOX 家族进行鉴定和生物信息学

分析, 并分析 WOX 基因在不同生长发育阶段和花的不同组织中的表达模式, 为探讨 WOX 转录因子在调控铁皮石斛生长发育中的作用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 种植于中国科学院华南植物园苗圃。取约 1 cm 长的花蕾, 分别收集萼片、花瓣、唇瓣和合蕊柱, 液氮速冻 15 min, 保存于 -80℃ 冰箱备用。

铁皮石斛组培苗在 1/2MS+0.1% 活性炭 + 2% 蔗糖 + 0.6% 琼脂培养基 (pH 5.4) 上培养, 培养条件为 (26±1)℃、32.57 μmol/(m²·s)、12 h 光照/12 h 黑暗, 相对湿度约为 60%。采集的类原球茎、丛生芽 (无根) 和小苗 (约 3 cm 高) 经液氮速冻后保存于 -80℃ 冰箱备用。

1.2 WOX 转录因子家族成员的鉴定和序列分析

从 NCBI (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov>) 基因组数据库下载铁皮石斛基因组文件, 利用 Pfam、Swiss_Prot、eggNOG_class、NR 注释结果检索 WOX 转录因子。然后对检索到的 WOX 蛋白序列与拟南芥 WOX 蛋白序列进行比对, 并构建进化树, 删除同源性低且遗传距离较远, 剩余基因即为铁皮石斛 DoWOXs。

1.3 多重序列比对和进化树分析

采用 DNAMAN8 软件对铁皮石斛 WOX 家族成员的氨基酸序列进行比对。采用 Clustal X version 2.0 软件对铁皮石斛的 WOX 蛋白进行比对, 输出 Fasta 格式文件, 导入 MEGA, 利用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树 (NJ 树), 进行 1 000 次重复 bootstrap 统计学检测。

1.4 WOX 的生物信息学分析

从铁皮石斛全基因组测序 GFF 文件中获得 DoWOXs 的 GFF 注释, 利用 GSDBS 在线软件 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 绘制铁皮石斛 WOX 家族成员的基因结构。利用在线工具 MEME (<http://alternate.meme-suite.org/tools/meme>) 搜索铁皮石斛 WOX 基因家族成员的 motif, 用 PlantCare 在线软件 (

matics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/) 预测 *DoWOXs* 启动子中的顺式作用元件, 并用 TBtools 制图。

1.5 RNA 的提取和反转录

参照柱式植物 RNAOut 2.0 试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司)说明书, 分别提取铁皮石斛不同发育时期(类原球茎、丛生芽和小苗)和花的不同组织(萼片、花瓣、唇瓣和合蕊柱)的总 RNA。提取的 RNA 经 DNA 酶消化后, 取 2 μ L 进行电泳检测, 再采用 Promega 公司的 GoScript™ Reverse Transcription System 试剂盒, 取 4 μ g 已纯化的总 RNA 进行反转录, 反应体系为 20 μ L。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物

Table 1 Primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'~3')	基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'~3')
<i>DoWOX1</i>	F: TTAACATGAGAGCCATGTTTGG R: AGAGAGAGTTCAACCGGTCAAG	<i>DoWOX5</i>	R: AGTGCTAGTTGTTGGGAAGAGC
<i>DoWOX2</i>	F: TTGGTTCAGTTTGGTGTGAAAG R: AGCTTTGCAATAGAACCCATA	<i>DoWOX6</i>	F: AAGATGGAACCCAACCTCAAGAA R: TCTCTTCAGCTCCCTTTGTTC
<i>DoWOX3</i>	F: GGCTCAAAGAAATCGCTAGAA R: AAAGAAGTTGAAGAACGGCAAG	<i>DoWOX7</i>	F: TGTTC AAGTCCAAACCTTCTCT R: GCGGTTTTGAAACCAATAGAAG
<i>DoWOX4</i>	F: CCAAGACAAGGCTTGGATTTAC R: TAGAAGTGCTGCTCTCCTCCTT	<i>DoWOX8</i>	F: GAATGACGGAGAAGAGAGGAGA R: CAATACATGCTCCCAATCTCA
<i>DoWOX5</i>	F: TGTCTATGGACACCAGATGC	<i>DoWOX9</i>	F: AAGGTGCTGACGGATCTCTTTA R: AGATCTGTATGCACTGGTGACG

2 结果和分析

2.1 WOX 转录因子的鉴定和进化树构建

在 NCBI 基因组数据库下载铁皮石斛基因组文件, 并利用 Pfam、Swiss_Prot、eggNOG_class、NR 注释结果检索 WOX 转录因子, 共鉴定出 9 个铁皮石斛 WOX 家族基因成员, 分别命名为 *DoWOX1*、*DoWOX2*、*DoWOX3*、*DoWOX4*、*DoWOX5*、*DoWOX6*、*DoWOX7*、*DoWOX8* 和 *DoWOX9*。

以铁皮石斛 WOX 家族蛋白和拟南芥 WOX 家族蛋白构建进化树(图 1), 结果表明, 铁皮石斛的 WOX 家族可分成 3 个进化支, 分别为 WUS、Ancient 和 Intermediate, 其中 WUS 的成员数量最多, 分别是 *DoWOX3*、*DoWOX4*、*DoWOX5*、*DoWOX6* 和 *DoWOX9*; 其次是 Intermediate, 分别是 *DoWOX1*、*DoWOX2* 和 *DoWOX7*; Ancient 的数量最少, 仅有 *DoWOX8*。此外, WUS 支的 *DoWOX4* 和 *DoWOX5* 的分支长度差比其他 *DoWOXs* 间的分支长度差短、

1.6 表达分析

采用美国 BIO-RAD 公司 iTaq Universal SYBR Green supermix 反应试剂对 9 个 *DoWOXs* 进行实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析。使用 Primer Premier 5.0 软件在基因特异性区域设计引物(表 1), 以铁皮石斛 *Actin* 为内参基因(NCBI accession No.: JX294908), 于 ABI 7500 Real-time PCR 仪上进行 qPCR, 并使用其系统软件对数据进行处理, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法^[27] 计算相对表达量。铁皮石斛花的发育分为 3 个时期: 小花蕾期(约 0.5 cm)、中花蕾期(约 1 cm)和全开期。采用 qPCR 对 *DoWOXs* 在花不同发育阶段和不同组织的表达模式进行分析。用百迈客云平台(<http://www.biocloud.net/>)在线软件绘制热图(heatmap)。

置信度最高, 说明 *DoWOX4* 和 *DoWOX5* 亲缘关系最近、同源性最高, 暗示他们具有相似的功能。

2.2 DoWOXs 的生物信息学分析

使用 DNAMAN 的默认参数对 9 个 *DoWOXs* 进行多重序列比对, 结果表明, 铁皮石斛 WOX 家族成员均含有保守的同源异型结构域(homeobox domain, HD), 具有“螺旋-环-螺旋-转角-螺旋”的结构特征(图 2)。此外, 在螺旋 I 和螺旋 III 中存在许多高度保守的位点, 暗示这些氨基酸残基可能在基因功能上发挥重要的作用。

利用 MEME 工具对铁皮石斛 WOX 家族成员的蛋白结构进行分析(图 3), 结果表明, 所有 *DoWOXs* 都含有串联的 Motif1 和 Motif2, 说明其在 WOX 家族成员中较为保守。在 Intermediate 成员中存在 Motif3 的保守基序; WUS 家族成员中除 *DoWOX9* 外, 其余成员在 C 端都有保守的 Motif4; Ancient 成员 *DoWOX8* 含有的保守基序最少, 说明 WOX 可

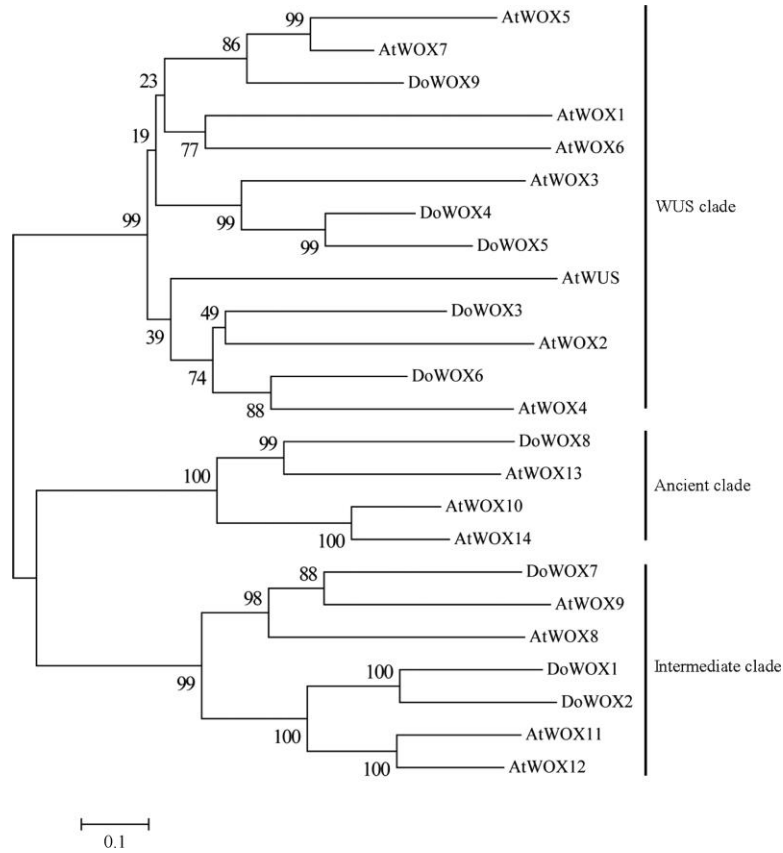


图 1 铁皮石斛(Do)和拟南芥(At)的 WOX 家族成员构建的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of WOX family members in *Dendrobium officinale* (Do) and *Arabidopsis thaliana* (At)

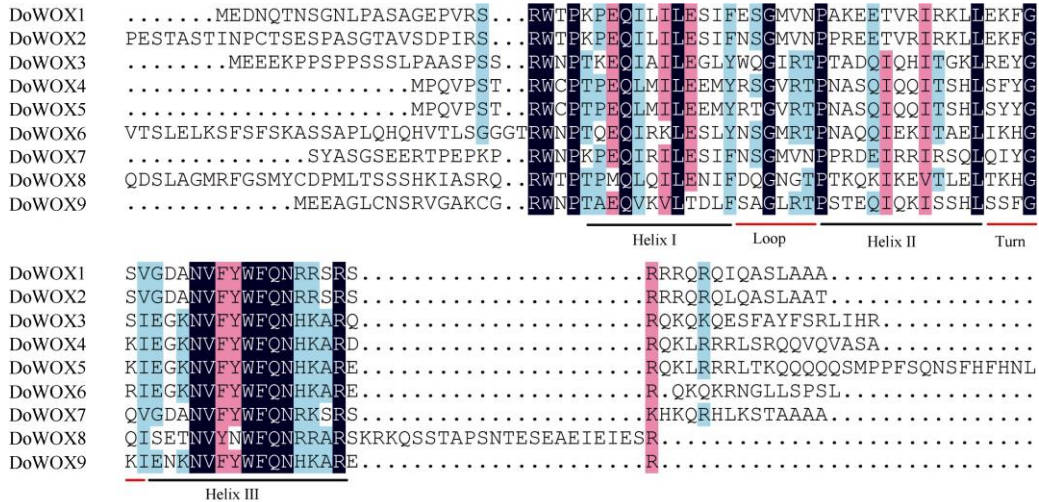


图 2 铁皮石斛 WOX 家族成员氨基酸序列的多重比对

Fig. 2 Multiple alignment of amino acid sequence in WOX family members of *Dendrobium officinale*

能具有复杂的进化过程。此外，同一亚家族中的 DoWOX4 和 DoWOX5 的保守基序都是 5 个，且位置相近，表现了很强的一致性，说明 DoWOX4 和 DoWOX5 具有相似的蛋白质功能和结构，同时从侧面反映了系统进化树分析的可靠性。

2.3 DoWOXs 基因结构

利用在线软件 GSDS 构建铁皮石斛 DoWOXs 基因的内含子-外显子结构图(图 4)，可见，大部分 DoWOXs 有内含子 1~3 个，外显子 1~3 个。结合系统进化树，不同进化分支的基因结构差异明显，即

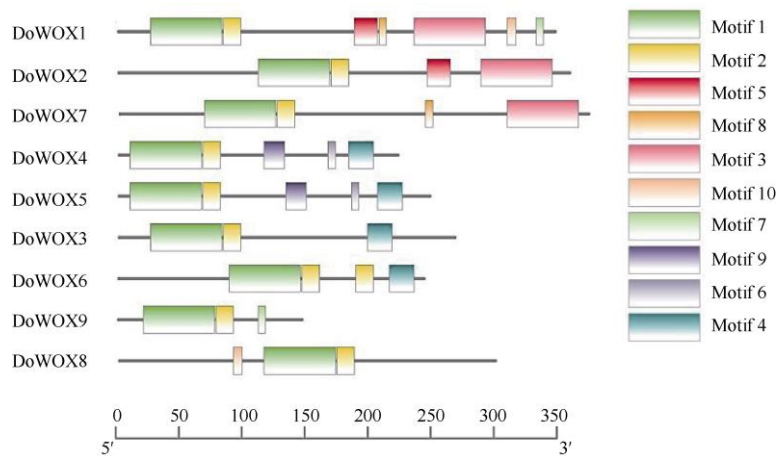


图 3 DoWOXs 蛋白的保守基序

Fig. 3 Conservative motifs of WOX proteins

使是相同分支的基因间也存在一定差异, 但同源性最高的 *DoWOX4* 和 *DoWOX5* 的基因结构极其相似。此外, 同为 WUS 支的 *DoWOX3*, 其基因结构与 *DoWOX4* 和 *DoWOX5* 相似, 皆为 2 个外显子, 1 个内含子, 说明 WUS 支的基因结构较为保守。Ancient 支中的 *DoWOX8* 有 3 个外显子和 2 个内含子。

对 *DoWOXs* 的启动子用 PlantCARE 进行分析 (图 5), 结果表明, 9 个 *DoWOXs* 共含有 13 个与生长发育相关的顺式作用元件, 不同基因间的顺式作用元件不同。其中, 顺式作用元件 meristem expression 共有 6 个, *DoWOX1* 含有 3 个, 说明其可能在铁皮石斛分生组织的生长上扮演重要角色。与激素相关的顺式作用元件有 auxin-responsive、gibberellin-responsive、MeJA-responsive、abscisic acid responsive、salicylic acid responsive 等, 在植物和环境胁迫的适应中扮演重要角色; 与逆境胁迫相关的非生物激素的顺式作用元件有 drought-inducibility、defense and stress responsive、low-temperature responsive 和 anaerobic induction 等, 间接影响生长

发育。这说明 WOX 家族成员在铁皮石斛生长发育过程中, 参与胚胎发育、种子萌发、分生组织生长、根系发育和环境胁迫的调控等活动。

2.4 DoWOXs 的表达

铁皮石斛类原球茎被认为是体胚^[28], 可增殖, 亦可分化成完整的植株, 而 WOX 成员在维持植物的干细胞状态中起着重要的作用。采用 qPCR 技术分析了 *DoWOXs* 在铁皮石斛不同发育阶段中的表达模式(图 6), 结果表明, 除 *DoWOX3* 外, 其余 *DoWOXs* 在类原球茎、丛生芽和小苗中有表达。*DoWOX1*、*DoWOX2*、*DoWOX3*、*DoWOX4* 和 *DoWOX9* 在类原球茎中的表达量最高, 表明 WOX 在铁皮石斛的类原球茎发育中扮演重要角色。*DoWOX5* 在丛生芽中的表达量最高, *DoWOX6* 在小苗中最高, *DoWOX7* 和 *DoWOX8* 在 3 个不同发育时期表达量均较高。此外, 不同发育时期优势表达的 *DoWOXs* 不同, 如 *DoWOX3* 在类原球茎特异表达, 可能与其具有不同的启动子顺式作用元件有关。

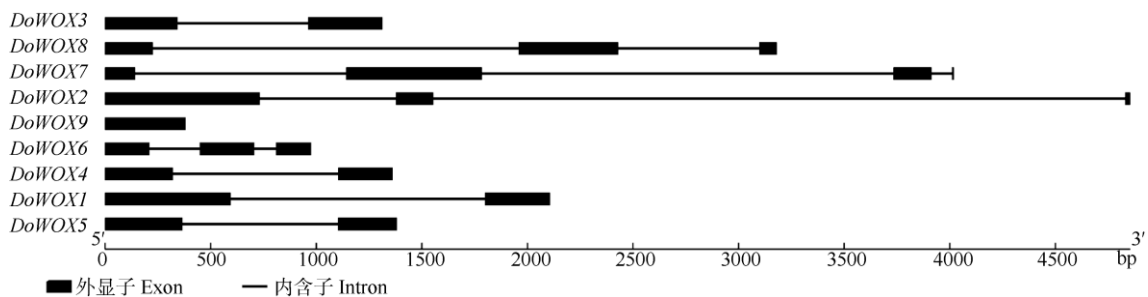


图 4 DoWOXs 基因结构

Fig. 4 Gene structure of DoWOXs

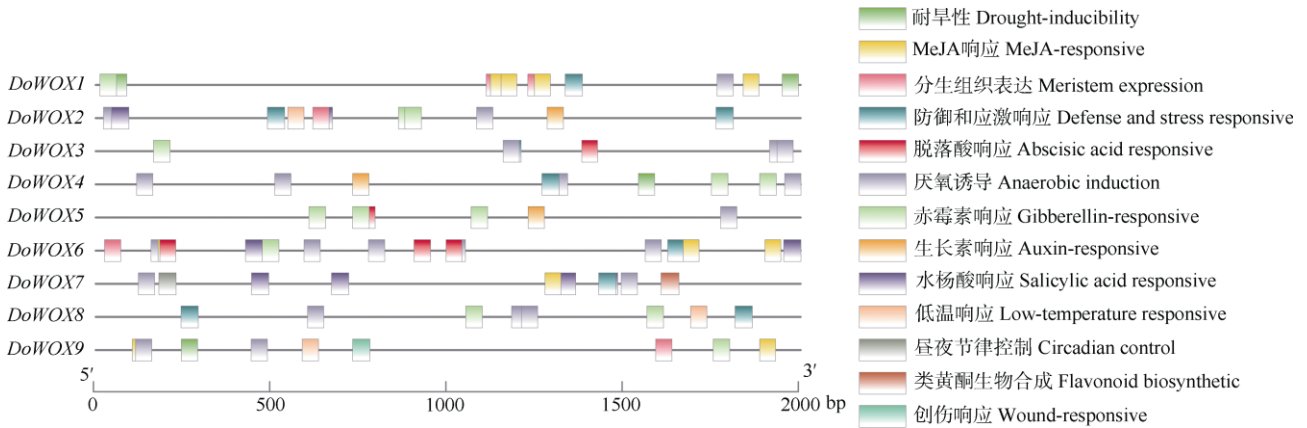


图 5 *DoWOXs* 启动子中的顺式作用元件

Fig. 5 *cis*-Acting elements of *DoWOXs* promoter

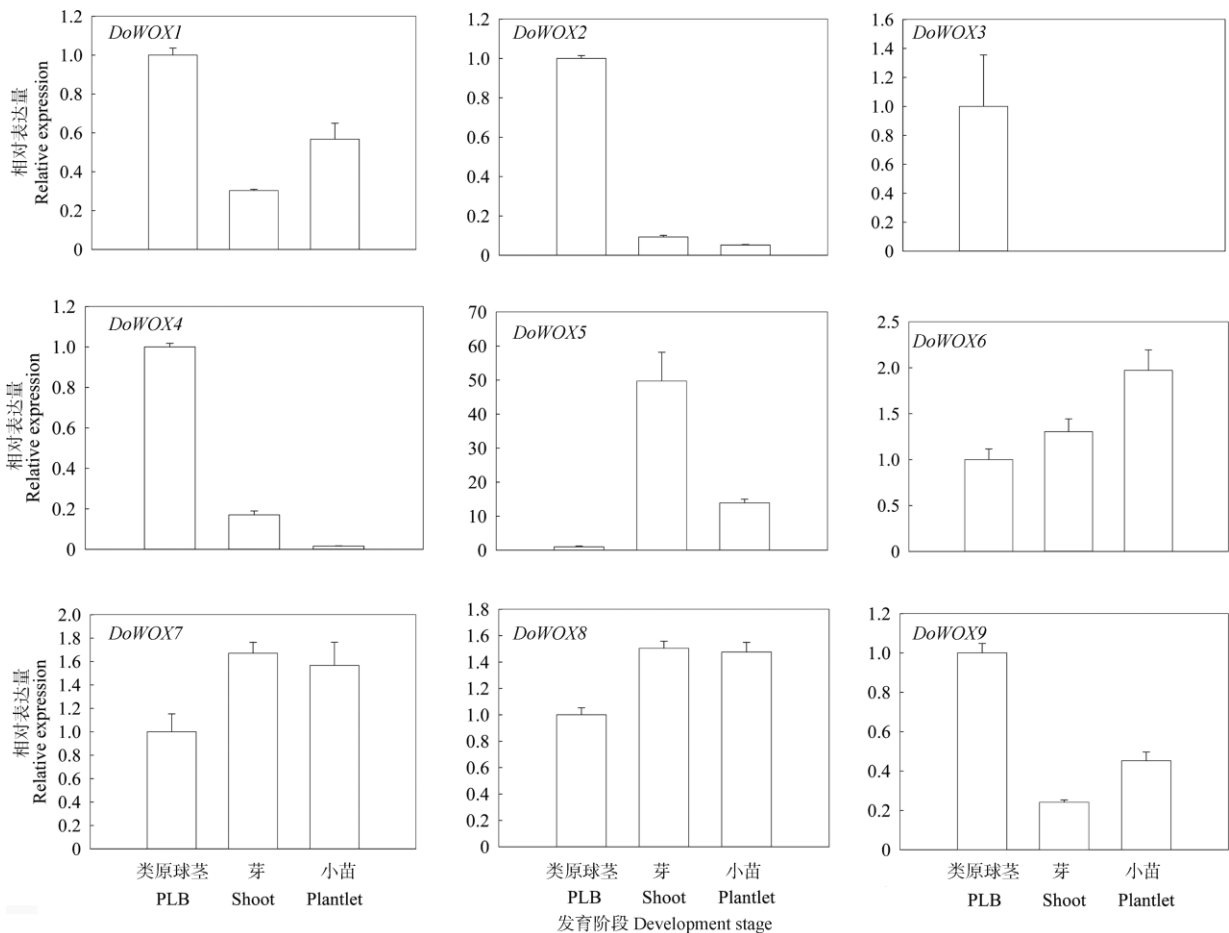


图 6 *DoWOXs* 基因在铁皮石斛不同发育时期的表达

Fig. 6 Expression of *DoWOXs* in *Dendrobium officinale* at different development stages

开花是植物发育中非常重要的阶段，WOX 参与植物花发育过程^[18]。利用本实验室建立的铁皮石斛花发育数据库，获取了 *DoWOXs* 在小花蕾(S1)、中花蕾(S2)和全开花(S3)中的表达数据，利用百迈客云平台在线软件绘制热图(图 7)，可见，*DoWOX4*、

DoWOX5 的表达模式较为相似，在 S1 时期的表达量最高，其次为 S2 时期，S3 时期最低，暗示这 2 个基因在花发育过程中功能相似。*DoWOX8* 在 3 个时期的 FPKM 值均大于 20，S2 时期的表达量最高，而其他 *DoWOXs* 在 3 个时期的 FPKM 均小于 5。

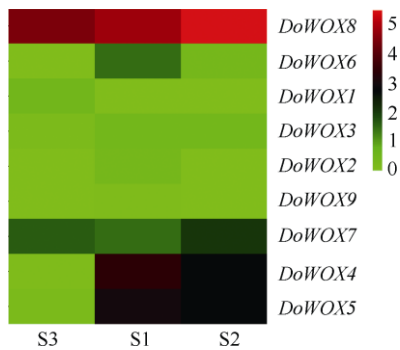


图7 DoWOXs 在铁皮石斛不同开花期的表达谱。S1: 小花蕾; S2: 中花蕾; S3: 全开花; 红色: 上调; 绿色: 下调。

Fig. 7 Expression profile of DoWOXs in *Dendrobium officinale* at different flowering stages. S1: Small flower bud; S2: Medium flower bud; S3: Full bloom; Red: Up-regulation; Green: Down-regulation.

兰科植物的花具有较高的观赏价值主要源于其独特的花型, 有 3 个瓣化的萼片, 2 个花瓣, 1 个唇瓣和 1 个合蕊柱^[29]。进一步选取 S2 时期的花蕾进行不同组织的表达分析, 结果表明(图 8), DoWOX1 和 DoWOX2 在花蕾的 4 个组织中均未表达; DoWOX3 仅在唇瓣和合蕊柱中表达; 其余 6 个 DoWOXs 在中花蕾的不同组织中均有表达, 其中 DoWOX4 在唇瓣中表达较高, DoWOX5 在萼片中表达最高, DoWOX6 在花瓣中表达最高, DoWOX7 和 DoWOX9 在合蕊柱中表达最高。这暗示 DoWOXs 家族成员在铁皮石斛花生长发育过程中具有不同的调控作用。此外, DoWOX3 和 DoWOX7 在合蕊柱的表达量远高于其他花器官, 可能与花形态发育密切相关。

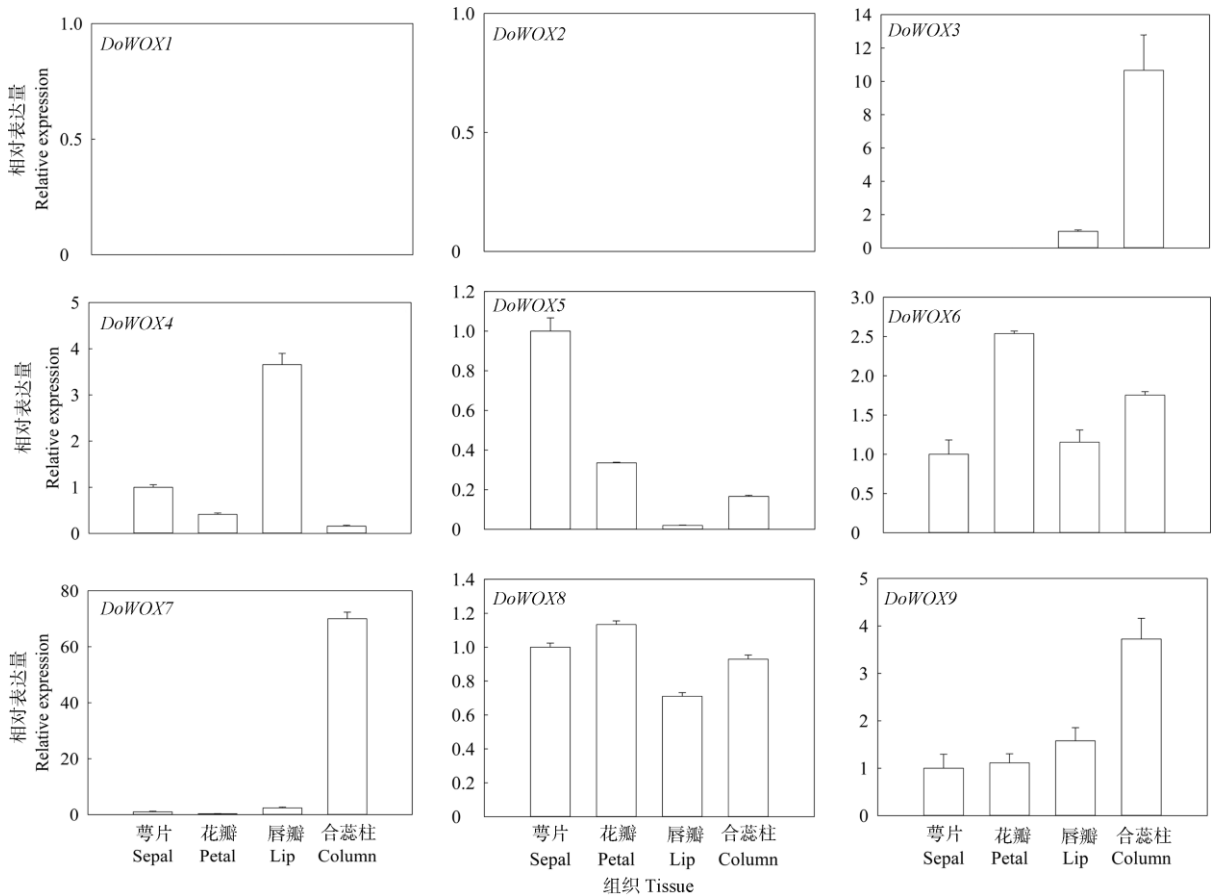


图8 DoWOXs 在铁皮石斛中花蕾不同组织中的表达模式

Fig. 8 Expression pattern of DoWOXs in different tissues of medium flower buds of *Dendrobium officinale*

3 结论和讨论

参与调控植物发育的基因在形态建成中起着关键的作用。WOX 转录因子是参与植物发育的重

要家族之一。本研究从铁皮石斛全基因组中鉴定出 9 个 WOX 转录因子(DoWOX1~DoWOX9), 生物信息学和表达分析表明, WOX 转录因子在铁皮石斛的生长发育尤其是类原球茎和花发育中起重要的

调控作用。*DoWOX4* 和 *DoWOX5* 在开花时期表达量的变化规律一致,且 *DoWOX4* 和 *DoWOX5* 氨基酸序列相似度高(图 1),暗示这 2 个转录因子可能在调控花发育过程中的功能相似。此外,*DoWOX4*、*DoWOX5* 和 *AtWOX3* 在系统进化树上的亲缘关系最近,*AtWOX3* 在拟南芥花发育尤其是花表型构成中起作用^[18]。

9 个 *DoWOXs* 编码蛋白的同源异型结构域(HD)保守性高,具有典型的“螺旋-环-螺旋-转角-螺旋”结构,这与其他物种^[30-31]的研究结果一致,表明该同源异型结构域在进化上具有较高的保守性。该同源异型结构域可以特异地和 DNA 序列结合而发挥重要的作用^[32],如作为 *HOX* 蛋白的辅助因子影响植物、动物和真菌的发育^[8]。基因结构分析表明,*WUS* 支的 *DoWOXs* 成员基因结构较为保守。不同支系 *DoWOXs* 蛋白的保守基序在数量、位置上具有较高的相似性,这与系统进化树的结果一致。此外,*Motif1* 和 *Motif2* 基序的保守程度更高。

基因的表达调控是一个复杂的过程,转录因子通过结合基因的顺式作用元件来调控基因的表达。*DoWOXs* 的启动子上含有响应植物激素和逆境胁迫等相关的顺式作用元件,生长素可调控胚胎发育^[33]、脱落酸影响种子休眠和萌发^[34],茉莉酸甲酯(MeJA)参与植物防御反应^[35],因此,*DoWOXs* 可能参与植物生长发育和防御反应。

类原球茎、芽和小苗是铁皮石斛 3 个典型的生长发育阶段。5 个 *DoWOXs* 在类原球茎中高表达,说明 *DoWOXs* 在调控铁皮石斛类原球茎发育具有重要的作用,这与梁易等^[24]的研究结果一致。类原球茎发育是铁皮石斛的特有阶段。*DoWOX3* 在类原球茎中表达量最高,在芽和小苗中不表达,与同源性最高的 *AtWOX2* 的表达模式相似^[36]。有大量研究表明,*WOX* 在植物的胚胎发育中扮演不同的角色,如 *WOX2*、*WOX5*、*WOX8* 和 *WOX9* 影响拟南芥的胚胎模式^[12],*WOX2* 调控云杉(*Picea asperata*)的体细胞胚胎发生^[37]。*DoWOX5* 在芽中表达最高,可能与铁皮石斛芽发育有关。*WOX* 参与调控植物芽的发育,如 *WUS* 在拟南芥芽再生发育过程是必需的^[38]、*WOX11* 通过招募相关蛋白影响水稻芽的发育^[39]。除 *DoWOX3* 外,其余 *DoWOXs* 在小苗中均有表达,说明 *DoWOXs* 可能调控铁皮石斛小苗发育。花发育是植物生殖阶段的重要过程,*DoWOXs* 在小花蕾、中花蕾和全开花时期都有表达,说明 *DoWOXs* 在铁皮

石斛花发育中起着重要的调控作用。*WOX* 调控花发育的作用在拟南芥、矮牵牛和烟草等植物中已有报道^[17-20]。除 *DoWOX1* 和 *DoWOX2* 外,其余 *DoWOXs* 均在中花蕾不同组织中表达,说明在中花蕾时期 *DoWOX1* 和 *DoWOX2* 可能和其他 *DoWOXs* 存在功能冗余的情况,具体功能还需进一步研究。合蕊柱是兰科植物花的独特结构,*DoWOX3* 和 *DoWOX7* 在合蕊柱中的表达量远远高于其他组织,推测两者调控铁皮石斛花的发育,但具体功能有待进一步研究。同一亚家族成员存在一些相似的功能,有研究表明 *WUS* 分支的其他成员存在不同程度替代 *WUS* 在芽和花干细胞维持方面的功能^[16],这为寻找 *WOX* 家族的共性提供一个突破口。

植物组织培养技术是目前解决铁皮石斛种苗较难繁殖的主要方式,干细胞的形成与分化是组织培养中的重要环节,因此,研究铁皮石斛干细胞的相关分子机理具有十分重要的意义。兰科植物的花是重要的生殖器官,而且具有较高的观赏价值,研究兰科植物花器官发育对了解其花形成机制及品种选育提供了重要的理论基础。本研究为进一步挖掘铁皮石斛 *WOX* 转录因子功能奠定了基础。

参考文献

- [1] SCHERES B. Stem-cell niches: Nursery rhymes across kingdoms [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(5): 345-354. doi: 10.1038/nrm2164.
- [2] LAUX T. The stem cell concept in plants: A matter of debate [J]. *Cell*, 2003, 113(3): 281-283. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00312-x.
- [3] LUO L J, ZENG J, TIAN Z X, et al. Plant development: From cells to individuals [J]. *Chin Sci Bull*, 2016, 61(33): 3532-3540. doi: 10.1360/N972016-00906.
罗林杰, 曾健, 田朝霞, 等. 植物的发育: 从细胞到个体 [J]. *科学通报*, 2016, 61(33): 3532-3540. doi: 10.1360/N972016-00906.
- [4] SANG Y L, CHENG Z J, ZHANG X S. Plant stem cells and *de novo* organogenesis [J]. *New Phytol*, 2018, 218(4): 1334-1339. doi: 10.1111/nph.15106.
- [5] SCHOOF H, LENHARD M, HAECKER A, et al. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes [J]. *Cell*, 2000, 100(6): 635-644. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80700-X.
- [6] YU Y M, LEE E K, HONG S M, et al. Plant stem cell line derived from quiescent center and method for isolating the same: EP, 20080832681 [P]. 2010-05-26.
- [7] GEHRING W J. Homeo boxes in the study of development [J]. *Science*,

- 1987, 236(4806): 1245–1252. doi: 10.1126/science.2884726.
- [8] VAN DER GRAAFF E, LAUX T, RENSING S A. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family [J]. *Genome Biol*, 2009, 10(12): 248. doi: 10.1186/gb-2009-10-12-248.
- [9] LIAN G B, DING Z W, WANG Q, et al. Origins and evolution of WUSCHEL-related Homeobox protein family in plant kingdom [J]. *Sci World J*, 2014, 2014: 534140. doi: 10.1155/2014/534140.
- [10] MUKHERJEE K, BROCCIERI L, BÜRGLIN T R. A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant Homeobox genes [J]. *Mol Biol Evol*, 2009, 26(12): 2775–2794. doi: 10.1093/molbev/msp201.
- [11] SARKAR A K, LUIJTEN M, MIYASHIMA S, et al. Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers [J]. *Nature*, 2007, 446(7137): 811–814. doi: 10.1038/nature05703.
- [12] HAECKER A, GROß-HARDT R, GEIGES B, et al. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, 2004, 131(3): 657–668. doi: 10.1242/dev.00963.
- [13] HAMANN T, BENKOVA E, BÄURLE I, et al. The *Arabidopsis BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(13): 1610–1615. doi: 10.1101/gad.229402.
- [14] SHENG L H, HU X M, DU Y J, et al. Non-canonical *WOX11*-mediated root branching contributes to plasticity in *Arabidopsis* root system architecture [J]. *Development*, 2017, 144(17): 3126–3133. doi: 10.1242/dev.152132.
- [15] SUER S, AGUSTI J, SANCHEZ P, et al. *WOX4* imparts auxin responsiveness to cambium cells in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(9): 3247–3259. doi: 10.1105/tpc.111.087874.
- [16] DOLZBLASZ A, NARDMANN J, CLERICI E, et al. Stem cell regulation by *Arabidopsis* WOX genes [J]. *Mol Plant*, 2016, 9(7): 1028–1039. doi: 10.1016/j.molp.2016.04.007.
- [17] LAUX T, MAYER K F X, BERGER J, et al. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 1996, 122(1): 87–96.
- [18] COSTANZO E, TREHIN C, VANDENBUSSCHE M. The role of WOX genes in flower development [J]. *Ann Bot*, 2014, 114(7): 1545–1553. doi: 10.1093/aob/mcu123.
- [19] VANDENBUSSCHE M, HORSTMAN A, ZETHOF J, et al. Differential recruitment of WOX transcription factors for lateral development and organ fusion in petunia and *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(8): 2269–2283. doi: 10.1105/tpc.109.065862.
- [20] MCHALE N A, MARCOTRIGIANO M. *LAMI* is required for dorso-ventrality and lateral growth of the leaf blade in *Nicotiana* [J]. *Development*, 1998, 125(21): 4235–4243.
- [21] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Vol. 2 [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 282–283.
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 第2部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 282–283.
- [22] ZHANG M Z, HE C M, WANG H B, et al. Advances in active polysaccharides in medicinal plants of Orchidaceae [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2019, 27(5): 611–622. doi: 10.11926/jtsb.4073.
- 张明泽, 何春梅, 王浩斌, 等. 兰科药用植物活性多糖研究进展 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2019, 27(5): 611–622. doi: 10.11926/jtsb.4073.
- [23] RAMKUMAR T R, KANCHAN M, UPADHYAY S K, et al. Identification and characterization of WUSCHEL-related homeobox (WOX) gene family in economically important orchid species *Phalaenopsis equestris* and *Dendrobium catenatum* [J]. *Plant Gene*, 2018, 14: 37–45. doi: 10.1016/j.plgene.2018.04.004.
- [24] LIANG Y. Expression analysis of *DoWOX* and *DoSERK* in *dendrobium officinale* during protocorm development [D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2018: 1–61.
- 梁易. 铁皮石斛原球茎发育过程中 *DoWOX* 与 *DoSERK* 的表达分析 [D]. 成都: 西南交通大学, 2018: 1–61.
- [25] XIANG L, LI B J, QIN D H, et al. Advances in molecular biology of orchid floral development [J]. *Chin J Cell Biol*, 2011, 33(5): 554–563.
- 向林, 李伯钧, 秦德辉, 等. 兰花花发育的分子生物学研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(5): 554–563.
- [26] ZHANG G Q, LIU K W, LI Z, et al. The *Apostasia* genome and the evolution of orchids [J]. *Nature*, 2017, 549(7672): 379–383. doi: 10.1038/nature23897.
- [27] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [28] LEE Y I, HSU S T, YEUNG E C. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos [J]. *Amer J Bot*, 2013, 100(11): 2121–2131. doi: 10.3732/ajb.1300193.
- [29] RUDALL P J, BATEMAN R M. Roles of synorganisation, zygomorphy and heterotopy in floral evolution: The gynostemium and labellum of orchids and other lilioid monocots [J]. *Biol Rev*, 2002, 77(3): 403–441. doi: 10.1017/S1464793102005936.
- [30] WANG M M, LIU M M, RAN F, et al. Global analysis of WOX transcription factor gene family in *Brassica napus* reveals their stress- and hormone-responsive patterns [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3470. doi: 10.3390/ijms19113470.

- [31] LI X X, LIU C, LI W, et al. Genome-wide identification, phylogenetic analysis and expression profiling of the *WOX* family genes in *Solanum lycopersicum* [J]. *Hereditas*, 2016, 38(5): 444–460. doi: 10.16288/j.ycz.15-499.
李晓旭, 刘成, 李伟, 等. 番茄 *WOX* 转录因子家族的鉴定及其进化、表达分析 [J]. *遗传*, 2016, 38(5): 444–460. doi: 10.16288/j.ycz.15-499.
- [32] GEHRING W J, MÜLLER M, AFFOLTER M, et al. The structure of the homeodomain and its functional implications [J]. *Trends Genet*, 1990, 6: 323–329. doi: 10.1016/0168-9525(90)90253-3.
- [33] SU Y H, ZHAO X Y, LIU Y B, et al. Auxin-induced *WUS* expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2009, 59(3): 448–460. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2009.03880.x.
- [34] DU Z Y, CHEN M X, CHEN Q F, et al. *Arabidopsis* acyl-CoA-binding protein ACBP1 participates in the regulation of seed germination and seedling development [J]. *Plant J*, 2013, 74(2): 294–309. doi: 10.1111/tpj.12121.
- [35] DU M M, ZHAI Q Z, DENG L, et al. Closely related NAC transcription factors of tomato differentially regulate stomatal closure and reopening during pathogen attack [J]. *Plant Cell*, 2014, 26(7): 3167–3184. doi: 10.1105/tpc.114.128272.
- [36] PÉRET B, DE RYBEL B, CASIMIRO I, et al. *Arabidopsis* lateral root development: An emerging story [J]. *Trends Plant Sci*, 2009, 14(7): 399–408. doi: 10.1016/j.tplants.2009.05.002.
- [37] PALOVAARA J, HAKMAN I. Conifer *WOX*-related homeodomain transcription factors, developmental consideration and expression dynamic of *WOX2* during *Picea abies* somatic embryogenesis [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 66(5): 533–549. doi: 10.1007/s11103-008-9289-5.
- [38] ZHANG T Q, LIAN H, ZHOU C M, et al. A two-step model for de novo activation of *WUSCHEL* during plant shoot regeneration [J]. *Plant Cell*, 2017, 29(5): 1073–1087. doi: 10.1105/tpc.16.00863.
- [39] CHENG S F, TAN F, LU Y, et al. *WOX11* recruits a histone H3K27me3 demethylase to promote gene expression during shoot development in rice [J]. *Nucl Acids Res*, 2018, 46(5): 2356–2369. doi: 10.1093/nar/gky017.