

丹参 *SmWRKY65* 基因的克隆及其拟南芥遗传转化

于海征^a, 郭万里^{a,b}, 陈洋洋^a, 薛清静^a, 梁宗锁^{a,b}

(浙江理工大学, a. 生命科学学院; b. 浙江省植物次生代谢调控重点实验室, 杭州 310018)

摘 要: 为研究丹参 WRKY 家族基因的生物学特性, 通过生物信息学的方法从丹参转录组库中筛选出响应茉莉酸甲酯(MeJA)的 *SmWRKY65*, 通过实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测该基因的组织器官表达特性, 进而采用花序浸泡法把基因导入到拟南芥中。研究表明 *SmWRKY65* 基因编码区的长度为 867bp, 编码 288 个氨基酸, 含有 1 个 WRKY 保守结构域和 1 个 C₂H₂ 锌指结构域, 属于 WRKY 转录因子家族第 IIa 类成员。*SmWRKY65* 在根、茎、叶、花等组织器官中均有表达, 且在叶和茎中的表达量最高, 5 月份和 10 月份各个组织器官中表达也存在差异。最后获得了转基因拟南芥株系。

关键词: 丹参; 拟南芥; *SmWRKY65*; 基因克隆; 遗传转化

中图分类号: Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3851(2016)06-0906-06 **引用页码:** 110702

0 引 言

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)是唇形科常用的传统药用植物, 以干燥的根入药, 对心脑血管疾病有明确的疗效, 其主要活性成分为水溶性的酚酸类物质和脂溶性的丹参酮类^[1]。目前, 人们从丹参中分离出大约 40 多种水溶性成分和 20 多种脂溶性成分, 如咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹参素、丹参酮、隐丹参酮、丹参酮 IIA 等^[2]。随着代谢组和转录组等组学技术的发展, 为丹参次生代谢研究提供了一个更高的平台^[3]。

WRKY 是一类数量较大的转录因子家族之一^[4], 其成员数目随着植物的不断进化而丰富^[5], 不同植物中 WRKY 家族成员的数目差异较大, 如在拟南芥中发现有 90 多个成员, 在水稻(*Oryza sativa*)中发现拥有 100 多个成员, 而在向日葵(*Helianthus annuus*)中仅发现了 6 个成员(<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/family.php?fam=WRKY>)。根据其所含 WRKY 结构域的数目及锌

指结构特征, 可将其分为 3 类^[6]: 第 I 类通常含有 2 个 WRKY 结构域, 其锌指结构为 C-X₄-C-X₂₂₋₂₃-H-X-H(X 为任意氨基酸), 即 C₂H₂ 型。此类不仅存在于绿色植物中, 在原生生物黏菌阿米巴(*Dictyostelium discoideum*)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和寄生虫蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardi lamblia*)中也有发现, 由此推测第 I 类 WRKY 可能是最原始的^[7], 该类转录因子的 DNA 结合功能主要由羧基(C)端的 WRKY 结构域介导, 而氨基(N)端 WRKY 域单独不能与 DNA 结合, 其生物学功能还不清楚, 可能有助于增强氨基(N)端 WRKY 域与靶基因的结合。第 II 类只含有 1 个 WRKY 域, 其锌指结构与第 I 类 WRKY 转录因子相同, 目前鉴定出的大多数 WRKY 转录因子都属于该类型, 该类还可以再分为 5 个亚类(IIa、IIb、IIc、IId、IIe)^[5,7]。第 III 类含有 1 个 WRKY 域, 其锌指结构为 C-X₇-C-X₂₃-H-X-C, 即 C₂HC 型。越来越多的数据表明 WRKY 广泛参与植物的生长发育、响应逆境胁迫^[5,8], 以及参与次生代谢调控^[9-11]。

收稿日期: 2016-01-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(81373908); 浙江理工大学科研启动项目(14042008-Y); 浙江理工大学研究生创新研究项目(YCX14036)

作者简介: 于海征(1989-), 男, 河南南阳人, 硕士研究生, 主要从事药用植物次生代谢调控方面的研究。

通信作者: 梁宗锁, E-mail: liangzs@ms.iswc.ac.cn

在烟草中过表达 *BcWRKY46* 可以提高抗冷、耐盐和抵御渗透胁迫的能力^[12]。*AtWRKY18* 和 *AtWRKY40* 能够调控 ABA 信号途径,抑制拟南芥种子萌发、根生长及对盐胁迫和渗透胁迫的敏感性^[13]。水稻 *OsWRKY45* 和 *OsWRKY53* 能够调控二萜类生物合成的关键酶 *CPS4*、*KSL4*、*CYP99A2*、*CYP99A3*、*MAS* 的基因表达,从而提高 Momilactone A、Oryzalexin、Phytocassane 的生物合成^[14-15]。番茄 *SlWRKY73* 可以激活 3 个单萜合成基因 *SlTPS5*、*SlTPS3*、*SlTPS7*^[16-17] 的表达,从而调控萜类的生物合成。

至今,对丹参 *WRKY* 基因功能的研究报道较少。为此,本研究对丹参毛状根转录组库(MeJA 处理,结果未发表)进行分析,得到一个响应 MeJA 的转录因子 *SmWRKY65*,通过该基因的克隆,组织表达分析、拟南芥遗传转化,获得该基因的基础信息,发现该基因可能参与调控次生代谢物的生物合成和响应逆境胁迫,为研究丹参 *WRKY* 转录因子的功能提供技术和材料基础。

1 实验材料与方法

1.1 材料

农杆菌 ATCC15834 诱导丹参叶片获得毛状根^[18-19],继代后的毛状根在 6,7-V 培养基中黑暗条件下 25 °C,110 r/min 震荡培养 18 d,用终浓度为 100 μ M 的茉莉酸甲酯(MeJA)处理。处理后 0.5、1、3、6、9 d 取样,液氮速冻,-80 °C 保存。2013 年 11 月种植于浙江理工大学药用植物园的丹参分别在 2014 年 10 月和 2015 年 5 月两个花期取根、茎、叶、花等组织以及种植于温室 25 °C,光照 16 h 生长 1 个月的丹参幼苗,液氮速冻,-80 °C 保存,用于组织特异性表达分析。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为 Col-0 生态型。

1.2 RNA 提取和 *WRKY* 基因的克隆

总 RNA 的提取采用 TIANGEN® (DP441) RNA 提取试剂盒,具体步骤参考说明书。用 NANO Drop 核酸定量测定仪测定 RNA 浓度,取 1 μ g RNA,应用 Takara® (RR047A) 反转录试剂盒,按照附带的说明书反转录获得总 cDNA。根据丹参转录组库中获得的 *SmWRKY65* 的基因序列,设计 PCR 特异性引物,在上下游分别加入 *Xba*I 和 *Kpn*I 的酶切位点。上游引物为: 5'-3' ATCTAG ATGGAAAATAATTGGAAGCCTCA (下划线为 *Xba*I 酶切位点),下游引物为: 5'-3' TGGTACCT

ACATTGAAAAACCTATAGAATTAGAAATA TTA(下划线为 *Kpn*I 酶切位点)。以丹参毛状根的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增体系为 H₂O 17.87 μ L, 10 \times Ex Taq Buffer(Mg²⁺ plus) 2.5 μ L, 10 \times Ex Taq(5 U/ μ L) 0.13 μ L, dNTP Mixture(各 2.5 mM) 2 μ L, 引物(10 μ M) 各 1 μ L, 模板 2 μ L。扩增条件为: 98 °C, 10 s; 63 °C, 30 s; 72 °C, 60 s; 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 1.2% 的琼脂糖跑胶验证 PCR 产物,采用 TaKaRa(9267) 琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物,连接到测序载体 pMD19-T 上,重组载体转到大肠杆菌 DH5 α ,挑取 3 个阳性单克隆测序。

1.3 丹参 *WRKY* 基因的生物信息学分析

测序后的结果采用 Bioedit 序列比对软件进行分析,选取正确的 *SmWRKY65* 序列,并翻译成氨基酸序列。氨基酸序列的理化性质采用在线分析软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行预测。并在 NCBI 上进行 BLASTp,搜索同源序列,用 MEGA 6 NJ 法(bootstrap 1000)进行构建系统发育树。

1.4 荧光定量 PCR 分析

提取丹参不同组织的总 RNA,以反转录的 cDNA 为模板,采用 TaKaRa SYBR Premix Ex TaqTM II (RR820A) 进行 RT-qPCR 反应。引物为 Q*SmWRKY65*-F: (5'-TTGTTGACTACGGACTGCTGC-3') 和 Q*SmWRKY65*-R (5'-CATGGCTCCTCTTAGGGAAA-3')。扩增片段为 130bp。内参基因为 *SmUBQ10*^[20]。引物为: *SmUBQ10*-F (5'-AGATGGGCGGACACTTGCTGATTA-3') 和 *SmUBQ10*-R (5'-ACTCTCCACCTCCAAAGTGATGGT-3')。扩增条件为: 第一步 95 °C 预变性 30 s; 第二步 95 °C, 5 s; 59 °C, 30 s; 40 个循环。生物学重复 3 次。

1.5 载体构建和拟南芥遗传转化

pCAMBIA-1300 为过表达常用载体。用 *Xba*I, *Kpn*I 将 pMD19-T: *SmWRKY65* 的质粒和 pCAMBIA-1300 分别酶切,回收目的片段。然后用 T4 连接酶进行连接。获得 pCAMBIA-1300: *SmWRKY65* 重组质粒。将重组质粒转化到农杆菌 GV3101 中,采用花序浸泡法侵染拟南芥花序^[21]。将获得的 T1 代种子消毒后,铺在含有 30 mg/L 潮霉素的 1/2 MS 培养上,4 °C 处理 2 d 后,16 h 光照培养 7~10 d,将抗性苗移入为蛭石: 泥炭土体积比 1:1 的培养基中培养 20 d 左右,参考 Edwards K 等^[22] DNA 提取方法获得 DNA,以此为模板进行

PCR 扩增,扩增体系为 H_2O 17.87 μL , $10\times\text{Ex Taq}$ Buffer(Mg^{2+} plus) 2.5 μL , $10\times\text{Ex Taq}$ (5 U/ μL) 0.13 μL , dNTP Mixture(各 2.5 mM) 2 μL , 引物(10 μM) 各 1 μL , 模板 2 μL 。扩增条件为: 98 $^{\circ}\text{C}$, 10 s; 63.5 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 60 s; 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。1.2% 的琼脂糖跑胶验证 PCR 产物。

1.6 数据分析

采用 Spss19.0 和 GraphPad Prism 5 数据分析软件进行数据差异性分析和图表的绘制。

2 结果

2.1 MeJA 对丹参 *SmWRKY65* 的表达量分析

从丹参转录组库中筛选到一个响应 MeJA 的 WRKY 转录因子 *SmWRKY65*。我们采用实时定量 PCR 验证 *SmWRKY65* 是否响应 MeJA。丹参毛状根在 6,7-V 液体培养基中生长 18d, 在长势均一的毛状根中加入终浓度为 100 μM MeJA, 分别在 0.5、1、3、6、9d 取样, 采用实时荧光定量 PCR 检测 *SmWRKY65* 的表达量, 如图 1 所示: 处理后前 6d, 实验组和对照组随时间的增加表达量逐渐提高, MeJA 明显诱导 *SmWRKY65* 的表达。在处理第 6d 基因表达量达到最高值, 实验组是对照组的 3.1 倍。而对照组的表达量一直上升, 说明 *SmWRKY65* 除了被 MeJA 诱导外, 还可能受其它诱导子的诱导。

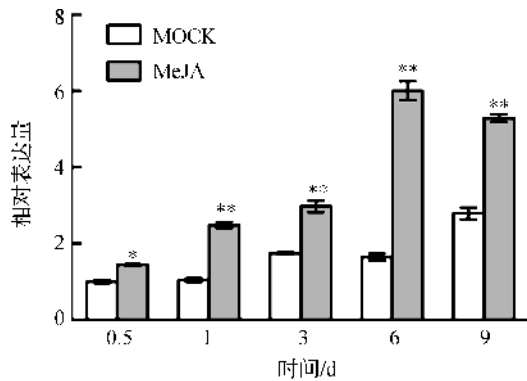


图1 MeJA 处理后 *SmWRKY65* 转录水平变化模式

注: “*”表示差异显著($p < 0.05$), “**”表示差异极显著($p < 0.01$), MOCK 为对照组, MeJA 为处理组。

2.2 丹参 *SmWRKY65* 基因序列分析

从丹参 cDNA 模板中扩增得到目的基因 *SmWRKY65*, 编码区为 867bp, 共编码 288 个氨基酸, 分子质量为 31.97kD, 等电点为 5.94。含有一个 WRKY 结构域和 1 个 C_2H_2 锌指结构域, 属于 WRKY 转录因子家族第 IIa 类成员, 与预期结果一致。在 NCBI 数据库进行同源搜索, 与保守性较高

的序列进行系统发育树构建, 如图 2。分析发现其与 *SmWRKY58* 序列相似度较高。

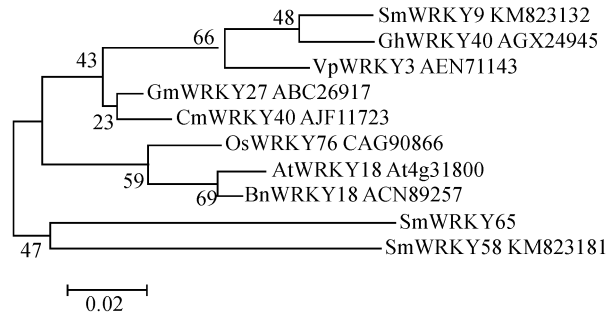


图2 WRKY 基因的系统发育树构建

2.3 丹参 *SmWRKY65* 组织表达分析

以浙江理工大学药用植物园种植的丹参为研究材料, 在两个花期(5 月和 10 月)取样, 检测 *SmWRKY65* 在各个组织中的表达量和时间变化的差异。从图 3 中可以看出 *SmWRKY65* 在各个组织中均有表达。在根中表达量最低, 在茎和叶中表达量较高, 花和幼苗次之, 且表达量呈现时间差异性。 *SmWRKY65* 在 10 月叶中的表达量是 5 月份的 3.88 倍, 在 10 月份根中的表达量是 5 月根中的 2.75 倍, 在 5 月份茎中的表达量是 10 月份的 1.88 倍。这与丹参在不同季节各个组织所行使的功能可能有关。

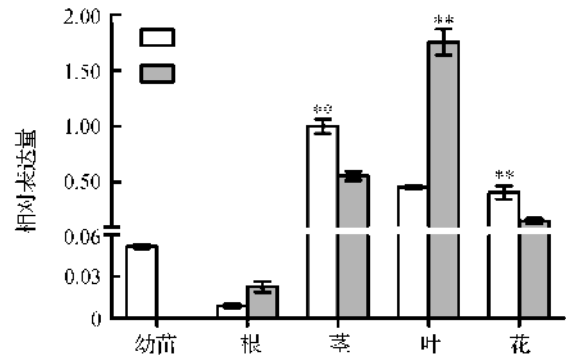


图3 *SmWRKY65* 组织表达模式

注: “*”表示差异显著($p < 0.05$); “**”表示差异极显著($p < 0.01$)。

2.4 *SmWRKY65* 的拟南芥遗传转化

通过花序浸泡法, 将重组质粒 *pCambia-1300:SmWRKY65* 导入拟南芥 Col-0 中。将 T1 代种子铺在含有潮霉素的培养基上, 光下培养。能够在培养基上正常生长的可能是转基因拟南芥的阳性植株。然后将苗移到蛭石: 泥炭土体积比为 1:1 的基质上, 22 $^{\circ}\text{C}$, 16 h 光下培养一段时间, 提取 DNA 进行阳性苗鉴定。鉴定结果如图 4 所示。获

得了 7 株转基因拟南芥, 泳道 12 为阳性对照, 泳道 13 为阴性对照。

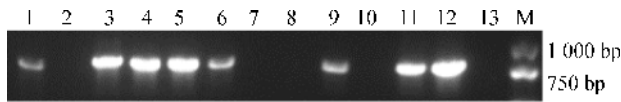


图 4 转基因拟南芥中 *SmWRKY65* 的 PCR 鉴定

3 讨 论

WRKY 在植物逆境胁迫响应过程中起着重要的作用。近年来,越来越多的数据表明其广泛参与植物的次生代谢调控^[23]。本研究从丹参转录组库中筛选出响应 MeJA 的 *SmWRKY65*, 其编码的蛋白属于 WRKY 转录因子家族 IIa 类成员。研究发现许多 IIa 类 WRKY 转录因子参与生物或非生物胁迫响应。如 *OsWRKY76* 可以响应 MeJA 和病原菌 *Magnaporthe oryzae* 的诱导,也可以抑制二萜类和黄酮类植物抗毒素的生物合成^[24]。过表达 *GmWRKY27* 的大豆毛状根可以提高其对盐和干旱的耐受性。氨基酸序列相近的 WRKY 转录因子可能具有相似的生物学功能^[25-26]。因此我们推测 *SmWRKY65* 可能参与丹参的抗病途径。

Schluttenhofer 等^[27]对拟南芥和长春花全基因组生物信息学分析发现,与茉莉酸信号相关的 WRKY 转录因子可能参与调控植物的次生代谢物合成。MeJA 调控植物次生代谢一般通过调控与次生代谢相关的转录因子。如 Hong 等^[28]研究发现 MeJA 可以上调转录因子 MYC2 的表达从而提高倍半萜类合成基因 *AtTPS1*、*AtTPS1* 的表达。如图 1 所示, *SmWRKY65* 在 MeJA 的诱导下,表达量显著上调,在第六天达到最高,这与丹参重要的次生代谢物丹酚酸 B 的积累规律较为类似^[3]。同时研究发现酚酸类生物合成途径上的关键酶基因 *SmPAL1*、*SmTAT*、*SmRAS* 的启动子区均含有 WRKY 转录因子的结合位点 W-box。 *SmWRKY65* 是否直接作用于这些关键酶基因有待下一步研究。

为了进一步阐明 *SmWRKY65* 在丹参各个组织中所起的作用,我们分析了 *SmWRKY65* 组织表达模式。由于丹参根鲜重在 9 月份之前增长缓慢,之后生长迅速^[29]。我们的研究发现 *SmWRKY65* 在 10 月份根中的表达量高于 5 月,因此推测其参与根的生长,以及参与次生代谢的生物合成。另外,其在茎中的表达量 5 月份高于 10 月,这可能与丹参在 5 月份节间伸长较快,与木质素生物合成相关。木质素在丹参中的合成途径与丹酚酸 B 合成的上游途

径相同,而 *TAT* 与 *PAL1* 是这两类物质生物合成的上游关键酶基因,因此更加说明 *SmWRKY65* 可能参与丹参次生代谢的生物合成。

拟南芥作为模式生物,各项生理活动相对丹参来说,研究的较为透彻,在拟南芥中异位表达 *SmWRKY65*, 便于对其功能的研究。同一个 WRKY 转录因子可能参与多个生理过程,例如过表达 *AtWRKY33* 可以提高对死体营养型真菌 *Botrytis cinerea* 和 *Alternaria brassicicola* 的抗性^[30]。同时又发现其对病原诱导合成的抗毒素 camalexin 以及乙烯的生物合成调控都有重要的作用^[31-32]。 *SmWRKY65* 是否参与逆境胁迫以及次生代谢调控,我们可以借助拟南芥,以全面认识丹参 *SmWRKY65* 转录因子调控逆境胁迫或目标代谢途径表达的分子机理。

参考文献:

- [1] WANG X, MORRIS-NATSCHKE S L, LEE K-H. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen [J]. Medicinal Research Reviews, 2007, 27(1): 133-148.
- [2] XU Z, PETERS R J, WEIRATHER J, et al. Full-length transcriptome sequences and splice variants obtained by a combination of sequencing platforms applied to different root tissues of *Salvia miltiorrhiza* and tanshinone biosynthesis [J]. Plant J, 2015, 82(6): 951-961.
- [3] GE Q, ZHANG Y, HUA W-P, et al. Combination of transcriptomic and metabolomic analyses reveals a JAZ repressor in the jasmonate signaling pathway of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 1-14.
- [4] ULKER B, SOMSSICH I E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function [J]. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7(5): 491-498.
- [5] RUSHTON P J, SOMSSICH I E, RINGLER P, et al. WRKY transcription factors [J]. Trends Plant Sci, 2010, 15(5): 247-258.
- [6] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(5): 199-206.
- [7] ZHANG Y, WANG L. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants [J]. BMC Evol Biol, 2005, 5: 1-12.
- [8] 肖培连, 冯睿杰, 侯丽霞, 等. 葡萄 WRKY18 基因的克隆及表达特性分析 [J]. 植物生理学报, 2015(3): 391-398.
- [9] KATO N, DUBOUZET E, KOKABU Y, et al. Identification of a WRKY protein as a transcriptional

- regulator of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(1): 8-18.
- [10] MA D, PU G, LEI C, 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 and Cell Physiology*, 2009, 50(12): 2146-2161.
- [11] SUTTIPANTA N, PATTANAIK S, KULSHRESTHA M, et al. The transcription factor *crWRKY1* positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *catharanthus roseus* [J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(4): 2081-2093.
- [12] WANG F, HOU X, TANG J, et al. A novel cold-inducible gene from Pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*), *BcWRKY46*, enhances the cold, salt and dehydration stress tolerance in transgenic tobacco [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(4): 4553-4564.
- [13] CHEN H, LAI Z, SHI J, et al. Roles of *Arabidopsis* *WRKY18*, *WRKY40* and *WRKY60* transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 1-15.
- [14] AKAGI A, FUKUSHIMA S, OKADA K, et al. *WRKY45*-dependent priming of diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice and the role of cytokinin in triggering the reaction [J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 86(1-2): 171-183.
- [15] CHUJO T, MIYAMOTO K, OGAWA S, et al. Overexpression of phosphomimic mutated *OsWRKY53* leads to enhanced blast resistance in rice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98737.
- [16] SPYROPOULOU E A, HARING M A, SCHUURINK R C. RNA sequencing on *Solanum lycopersicum* trichomes identifies transcription factors that activate terpene synthase promoters [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 1-16.
- [17] Xu Y H, WANG J W, WANG S, et al. Characterization of *GaWRKY1*, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)- δ -cadinene synthase-A [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(1): 507-515.
- [18] LIANG Z S, YANG D F, LIANG X, et al. Roles of reactive oxygen species in methyl jasmonate and nitric oxide-induced tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(5): 873-883.
- [19] YANG D, DU X, LING X, et al. Different roles of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways in cell growth and tanshinone production of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *PloS One*, 2012, 7(11): e46797.
- [20] MA Y, YUAN L, WU B, et al. Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(7): 2809-2823.
- [21] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 16(6): 735-743.
- [22] EDWARDS K, JOHNSTONE C, THOMPSON C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(6): 1349.
- [23] SCHLUTTENHOFER C, YUAN L. Regulation of specialized metabolism by *WRKY* transcription factors [J]. *Plant Physiol*, 2014, 167(2): 295-306.
- [24] YOKOTANI N, SATO Y, TANABE S, et al. *WRKY76* is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(16): 5085-5097.
- [25] LI S, FU Q, CHEN L, et al. *Arabidopsis thaliana* *WRKY25*, *WRKY26*, and *WRKY33* coordinate induction of plant thermotolerance [J]. *Planta*, 2011, 233(6): 1237-1252.
- [26] LAI Z, VINOD K, ZHENG Z, et al. Roles of *Arabidopsis* *WRKY3* and *WRKY4* transcription factors in plant responses to pathogens [J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 1-13.
- [27] SCHLUTTENHOFER C, PATTANAIK S, PATRA B, et al. Analyses of *Catharanthus roseus* and *Arabidopsis thaliana* *WRKY* transcription factors reveal involvement in jasmonate signaling [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 1-20.
- [28] HONG G J, XUE X Y, MAO Y B, et al. *Arabidopsis* *MYC2* interacts with *DELLA* proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(6): 2635-2648.
- [29] 梁宗锁,董娟娥,蒋传中. 丹参规范化生产[M]. 北京: 科学出版社, 2014: 26-29.
- [30] ZHENG Z, QAMAR S A, CHEN Z, et al. *Arabidopsis* *WRKY33* transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens [J]. *Plant J*, 2006, 48(4): 592-605.
- [31] MAO G, MENG X, Liu Y, et al. Phosphorylation of a *WRKY* transcription factor by two pathogen-responsive

MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*
[J]. Plant Cell, 2011, 23(4): 1639-1653.
[32] BIRKENBIHL R P, DIEZEL C, SOMSSICH I E.

Arabidopsis WRKY33 is a key transcriptional regulator of
hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea*
infection [J]. Plant Physiol, 2012, 159(1): 266-285.

Cloning of *SmWRKY65* from *Salvia Miltiorrhiza* and Its Genetic Transformation in *Arabidopsis Thaliana*

YU HaiZheng^a, GUO Wanli^{a,b}, CHEN Yangyang^a, XUE Qingjing^a, LIANG Zongsuo^{a,b}

(a. College of Life Science; b. Zhejiang Province Key Laboratory of Plant Secondary Metabolism and Regulation, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To investigate the biological characteristics of WRKY family gene in *Salvia miltiorrhiza* (Lamiaceae), we screened out *SmWRKY65* which responds to methyl jasmonate (MeJA) from *Salvia miltiorrhiza* transcriptome bank through bioinformatics method, detected tissue and organ expression characteristics of this gene through real-time fluorescence quantification of PCR (RT-qPCR), and then adopted floral dip method to transfer the gene into *Arabidopsis thaliana*. The results indicate that, the length of *SmWRKY65* gene coding region is 867bp; 288 amino acids are encoded; *SmWRKY65* contains WRKY conserved structure domain and C₂H₂ zinc finger structure domain; *SmWRKY65* belongs to the IIa subgroup of WRKY family. *SmWRKY65* is expressed in roots, stems, leaves, flowers and so on, and the expression quantity is the highest in leaves and stems. *SmWRKY65* expression differs in each tissue and organ in May and October. Finally, some transgenic *Arabidopsis* strains with *SmWRKY65* were produced.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; *Arabidopsis thaliana*; *SmWRKY65*; gene cloning; genetic transformation

(责任编辑: 许惠儿)