

冷胁迫下铁皮石斛抗寒相关基因的 SCoT 差异表达分析

李东宾, 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] 为了探讨铁皮石斛在冷胁迫下相关基因表达差异的分子机制, 选用抗寒性较强的铁皮石斛种质, 分别构建了冷胁迫处理总 RNA 混合池, 利用反转录 cDNA 进行 SCoT PCR 进行差异表达分析。通过 64 条引物筛选了约 500 个 cDNA 片段, 获得差异片段 11 个, 并进行割胶回收、克隆、测序和序列分析。结果表明, 利用 SCoT 方法可以筛选出冷胁迫下铁皮石斛的抗寒相关基因, 获得的基因片段分别与膜相关蛋白、渗透调节蛋白、CBF 转录因子、抗逆性蛋白有很高的同源性, 还有 1 个基因片段功能未知, 可能与铁皮石斛的抗寒有关。

[关键词] 铁皮石斛; 冷胁迫; SCoT; 抗寒基因; 差异表达

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是传统名贵珍稀中药材, 具有益胃生津、滋阴清热等功效^[1]。北纬 30 度是铁皮石斛自然分布与人工栽培的北缘, 低温是影响其生存与分布主要因素, 提高对低温环境胁迫的忍受能力有着十分重要的现实价值和意义^[2], 而有关低温环境胁迫的分子研究还未见相关研究报道。目标起始密码子多态性分子标记 (SCoT) 是 Collard 和 Mackill^[3] 提出的基于单引物扩增反应的新的目的基因分子标记方法, 具有操作简单、重复性好等特点, 现已应用于罗汉松^[4]、花生^[5]、龙眼^[6] 等植物的遗传多样性的分析并且在甘蔗的抗寒相关基因差异显示^[7] 以及赤霉素诱导甘蔗节间伸长基因的 cDNA-SCoT 差异表达^[8] 中得到了很好的验证。本文通过对铁皮石斛进行冷胁迫处理的 SCoT 差异显示研究, 获得抗寒表达相关的基因信息, 揭示抗寒分子机制, 为铁皮石斛抗寒育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用铁皮石斛来自浙江农林大学林木遗传

育种学科铁皮石斛种质资源圃, 经斯金平教授鉴定为抗寒性较强的铁皮石斛种质。铁皮石斛总 RNA 的提取所有塑料器具均用 0.1% 的 DEPC 超纯水浸泡过夜, 121 °C 高压灭菌 40 min 后 65 °C 烘箱干燥备用。研钵和杵子及其他玻璃器皿经洗涤剂清洗干净后, 蒸馏水冲洗, 晾干后 180 °C 烘箱中烘烤 4 h 以上备用。改良 CTAB 提取液: 2% CTAB, 2% PVP, 100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 25 mmol · L⁻¹ EDTA, 2.0 mol · L⁻¹ NaCl。SSTE: 1.0 mol · L⁻¹ NaCl, 0.5% SDS, 1 mmol · L⁻¹ EDTA (pH 8.0), 10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)。cDNA 第一链合成试剂盒为 TaKaRa 公司产品, SCoT 扩增引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 琼脂糖和 pGEM-T Easy vector 载体为 Promega 公司产品, DNA 回收试剂盒为上海生工产品, 其他试剂均为分析纯。

1.2 材料处理

选用生长基本一致的组培材料处理和对照各 2 瓶, 处理组进行冷胁迫处理 (4 °C, 72 h), 每隔 24 h 处理和对照取鲜嫩叶 1 次, 液氮快速冷冻后保存于 -70 °C 的超低温冰箱备用。

1.3 铁皮石斛总 RNA 的提取与 RNA 混合池的构建

1.3.1 改良的 RNA 提取方法 取 0.1 g 铁皮石斛幼嫩叶片, 置于液氮中, 加入适量 PVP 迅速研磨至粉末, 转移至含 700 μL 65 °C 预热的 RNA 提取液和 20 μL β-巯基乙醇的 1.5 mL 离心管中, 震荡混匀后

[稿件编号] 20120630003

[基金项目] 浙江省重大科技专项 (2012C12912-9)

[通信作者] * 高燕会, 副教授, 博士, 从事植物基因工程与遗传改良研究, E-mail: gaoyanhui408@126.com

[作者简介] 李东宾, 硕士研究生, 研究方向药用植物基因工程与遗传改良, E-mail: comeonldb@163.com

65 °C 水浴 20 min(期间上下颠倒摇匀几次),冷却至室温,然后加入 700 μL 酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)振荡均匀,于 4 °C 下 12 000 r · min⁻¹离心 10 min。小心吸取上清液至一新的 1.5 mL 离心管中,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)震荡混匀,4 °C 12 000 r · min⁻¹离心 10 min(可重复此步骤,直至中间层无白色絮状沉淀为止)。上清液移至一新的 1.5 mL 离心管,加入 1/3 体积的 10 mol · L⁻¹ LiCl,混合均匀,于 4 °C 冰箱沉淀过夜,然后 4 °C 12 000 r · min⁻¹离心 20 min,弃溶液并用移液枪吸干,用 500 μL SSTE 溶解沉淀,随后加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)震荡混匀,12 000 r · min⁻¹,4 °C 离心 10 min。小心吸取上清液至新的 1.5 mL 离心管中,加入 1/10 体积的 3 mol · L⁻¹ NaAc(pH 5.2)和 2 倍体积的预冷异丙醇,-70 °C 沉淀至少 30 min,4 °C 12 000 r · min⁻¹离心 20 min,弃上清后用 75% 的乙醇洗涤沉淀 2 次,12 000 r · min⁻¹,4 °C 离心 5 min,小心弃上清,晾干沉淀后,用 40 μL DEPC 处理过的超纯水溶解沉淀。提取的总 RNA 纯度和浓度用紫外分光光度计检测,同时用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,并用 Gene Genius Bio Imaging System (BioRad)凝胶成像系统观察拍照。

1.3.2 RNA 混合池的构建 根据紫外分光光度计的检测结果,等量混合对照和处理各时段的 RNA,并用 RNase free 的 ddH₂O 平衡两混合 RNA,构建相应的 RNA 混合池,分装后 -70 °C 保存备用。

1.4 cDNA 第一链的合成及 SCoT PCR 扩增

1.4.1 cDNA 第一链的合成 严格按照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书进行操作,锚定引物为 Oligo d(T)₁₈。反转录产物用无菌 ddH₂O 稀释 3 倍,与 -20 °C 保存备用。

1.4.2 cDNA 第一链的 SCoT PCR 扩增 PCR 反应体系为 10 × buffer,2.0 μL;2.5 mmol · L⁻¹ MgCl₂,2.0 μL;0.1 mmol · L⁻¹ dNTP 0.2 μL;0.5 μmol · L⁻¹ 引物,1.0 μL;Taq DNA 聚合酶,0.4 μL;第一链 cDNA 稀释产物 3.0 μL;加水至 20 μL。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 35 s,51 °C 退火 35 s,72 °C 延伸 1.5 min,共 35 个循环;72 °C 最后延伸 10 min。PCR 扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶以 120 V 恒压电泳 40 min。

1.5 差异片段的回收、克隆、测序与分析

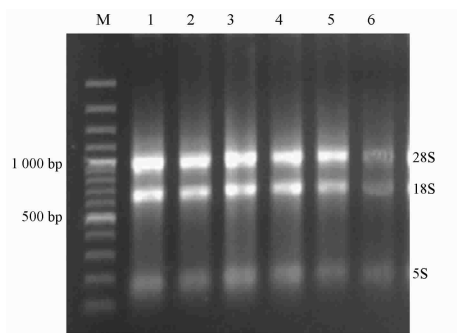
差异片段割胶用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试

剂盒回收纯化,溶于适量 ddH₂O,于 -20 °C 保存备用。将回收的差异片段克隆到 pGEM-T Easy vector 载体上。连接产物转化大肠杆菌感受态细胞,在含有 IPTG,X-gal,Amp 抗性的培养基上 37 °C 培养过夜,进行蓝白斑筛选,阳性克隆经菌液 PCR 检测后,于上海生工测序部测序。测序结果利用 NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库的 BLAST 分析功能比对测序结果。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取和逆转录

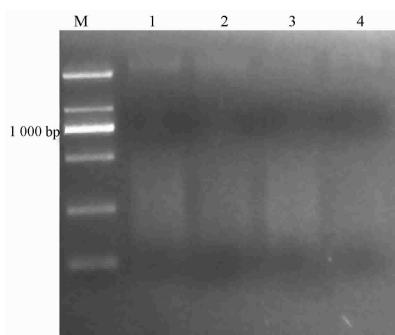
提取的总 RNA 经电泳检测,28S,18S,5S 带型完整且清晰,说明 RNA 的质量较好。紫外吸收值 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比在 2.0~2.1,说明所提取的总 RNA 纯度较高,也说明该方法可以有效去除蛋白、多糖、酚类等物质的干扰(图 1)。总 RNA 逆转录后的产物弥散性好,长度范围广。试验提取的总 RNA 和逆转录结果均能够达到后续试验的要求(图 2)。



M. DL 3 000 marker。

图 1 部分总 RNA 凝胶电泳

Fig. 1 Parts of the total RNA gel electrophoresis



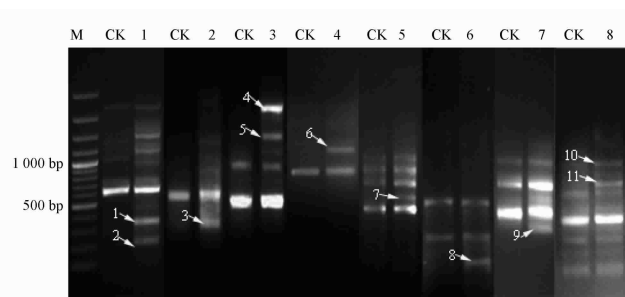
M. DL 2 000 marker。

图 2 部分逆转录 cDNA 凝胶电泳

Fig. 2 Parts of the reverse transcription cDNA gel electrophoresis

2.2 铁皮石斛抗寒相关基因的 SCOT 差异显示

用 64 条 SCoT 引物分别对 2 个 RNA 混合池进行扩增,扩增出大约 500 多条长度约为 100 ~ 3 000 bp 的清晰条带,其中筛选出 8 个 SCoT 引物能扩增出 11 条稳定差异片段。引物 1 能稳定扩增的差异片段有 2 条,序列大小约为 220,350 bp;引物 2 稳定扩增出 1 条约为 300 bp 的差异条带;引物 3 稳定扩增出 2 条差异条带,大小约 1 500,2 300 bp;引物 4 和引物 5 能稳定扩增出 1 200,600 bp 左右的差异条带;引物 6,7 分别扩增出大小约为 160,300 bp 的清晰条带;引物 8 能稳定扩增出 800,1 100 bp 左右的 2 条差异条带(图 3)。



M. DL 3 000 marker;CK. 未低温胁迫处理样品;1~8. 低温胁迫处理样品在不同引物下 SCoT PCR 扩增结果。

图 3 SCoT PCR 扩增差异片段

Fig. 3 Transcripts derived fragments by SCoT PCR

表 1 SCoT 差异片段的序列分析

Table 1 Sequences analysis of the SCoT transcripts derived fragments

No.	GenBank 登录号	SCoT 引物序列(5'-3')	相似蛋白	相似度/%
1	NP_001234228.1	ACCATGGCTACCACCGGC	番茄盐响应蛋白 2	79
2	BAJ91175.1	ACCATGGCTACCACCGGC	大麦预测蛋白	96
3	XP_002269110.2	ACCATGGCTACCACCGTC	葡萄甘露糖糖基转移酶	78
4	ADV58936.1	ACAATGGCTACCACCATC	大青杨纤维素合酶	83
5	XP_003571686.1	ACAATGGCTACCACCATC	二穗短柄草凝集素	97
6	ACP30609.1	CAACAATGGCTACCACGT	菜心抗病蛋白	95
7	NP_001147638.1	CCATGGCTACCACCGCC	玉米转录因子 HAP3	76
8	无	AAGCAATGGCTACCACCA	未知蛋白	0
9	ADP20179.1	ACCATGGCTACCACCGCA	白玉草细胞膜蛋白	98
10	XP_002270299.1	ACAATGCTACCACCATCC	葡萄木葡聚糖内糖基转移酶	85
11	AEX55235.1	ACAATGCTACCACCATCC	大蒜热激蛋白 70	94

无法进行。因此,必须先去除细胞质中大部分多糖等次生代谢物杂质,而后再提取总 RNA。改良方法以 LiCl 为沉淀剂,可在富含多糖、多酚植物材料中得到纯度和产率都较高的总 RNA,并且用 SSTE 溶液进一步溶解沉淀的 RNA,进一步去除多糖多酚等杂质,提高了提取的总 RNA 的纯度。采用异丙醇和

2.3 差异片段的序列分析

选择稳定出现的差异片段进行测序,测序结果利用 NCBI 数据库的 BLAST 分析功能进行基因序列和氨基酸序列同源性进行比对分析(表 1),同源性分析表明其中 5 条分别与大麦预测蛋白、二穗短柄草凝集素、菜心抗病蛋白、白玉草细胞膜蛋白和大蒜热激蛋白 HSP70 具有很高的同源性,同源性均达 90% 以上,基本确定属于该匹配类型蛋白;另外还有 5 条与番茄盐响应蛋白、葡萄甘露糖糖基转移酶、大青杨纤维素合酶、玉米转录因子 HAP3 和葡萄木葡聚糖内糖基转移酶也有较高的同源性,同源性在 80% 左右。葡萄甘露糖糖基转移酶、葡萄木葡聚糖内糖基转移酶、大青杨纤维素合酶通过序列比对分析可以确认属于糖基转移酶类,而番茄盐响应蛋白和玉米转录因子 HAP3 是否确切属于该类型蛋白还需进一步验证;还有 1 条在 NCBI 数据库中未能找到同源序列,说明是 1 条未知功能的序列。

3 结论与讨论

3.1 铁皮石斛 RNA 的提取

铁皮石斛叶片中多糖等次生代谢产物含量远远高于一般植物,采用一般方法不能达到理想的效果,主要是沉淀中仍有大量的多糖等次生代谢物无法去除,过多的多糖所形成的黏稠胶状物会使后续操作

NaAc 沉淀有机溶剂抽提后的 RNA。RNA 提取过程中,一般用无水乙醇和 NaAc 进行沉淀^[9],但在多糖、蛋白含量较高时宜用异丙醇沉淀,异丙醇的极性弱于乙醇,结合 NaAc 提供的高盐环境,易将多糖及蛋白游离在溶液中,从而较完全地去除残留在 RNA 中的多糖和蛋白^[10]。对于富含多糖的铁皮石斛叶

片,用异丙醇沉淀 RNA 更易摆脱多糖、杂蛋白的污染。本改良 CTAB 方法所提取的铁皮石斛总 RNA,不但获得的 RNA 纯度高、完整性好,完全可以满足进一步进行相关分子生物学实验的要求,并且具有简便、经济、获取的 RNA 质量高等优点,可为其他多糖多酚中药材植物总 RNA 的提取提供有益的借鉴和参考。

3.2 SCoT 分子标记在基因差异表达分析中的应用的可行性

目前研究基因差异表达的方法很多,但均存在一定的局限性。比如方法操作繁琐、实验费用高等,而 SCoT 作为一种新型分子标记技术具有操作简单、重复性好等特点,已成功运用于甘蔗的抗寒相关基因以及节间伸长基因的差异表达分析^[7-8],并取得了较好的效果。本研究对找到的差异片段都进行了3次的重复检测,以减少偶然误差。此外,为了减少因 RNA 浓度不同及 RNA 反复冻融引起的降解,对纯化的 RNA 先用 DEPC 水平衡各浓度,然后小管分装保存,以保证 PCR 模板的一致性和 RNA 的完整性。

3.3 铁皮石斛抗寒相关表达基因和蛋白

低温胁迫下,铁皮石斛的 SCoT 差异表达显示 11 个差异片段,测序比对获得 10 个已知基因和 1 个未知基因。总体可分为以下几类:①膜相关蛋白。许多研究表明,细胞膜的相变温度越低,抗寒性就越强,降低植物的膜相变温度可以增强植物的抗寒性。而膜的相变温度高低与膜脂所含脂肪酸的饱和程度最为密切。H Kodama 将拟南芥叶绿体中 ω -3 脂肪酸脱氢酶基因 *fad7* 导入烟草中,所获得转基因烟草抗寒性增加^[11]。Ishizaki-Nishizawa 等^[12] 将从蓝细菌中克隆的 $\Delta 9$ -去氢酶的基因 *Des9* 转入到烟草后,结果发现转基因烟草的半致死温度 (LT_{50}) 明显降低。Shuji Yokio 等^[13] 通过根癌农杆菌介导把拟南芥的 3-磷酸甘油酯酰基转移酶基因 (GPAT) 导入水稻中,也提高了叶片叶绿体不饱和脂肪酸 (PG) 的含量和叶片低温耐受性。本研究获得的细胞膜蛋白可能和膜系统的相变有关,从而提高铁皮石斛的抗寒性。②渗透调节蛋白。在渗透胁迫过程中,植物体内会产生一些具有保水作用的渗透调节物质来降低植物体内的水势,从而维持体内的水分平衡。这类渗透调节物质有脯氨酸、甜菜碱、可溶性糖和醇类物质等。低温胁迫时,植物通过诱导渗透调节物质的生物合成酶基因的大量表达,以增加这类物质的

积累,维持渗透压的平衡,从而避免低温伤害^[16]。可溶性糖因为具有良好的水溶性而具有调节渗透压的功能。Pilon-Smits 等^[14] 将杆菌 *Bacillus subtilis* 编码果聚糖的基因 *SacB* 转入到烟草中,结果显示转基因烟草表现出比对照组更强的抗渗透胁迫能力。本研究获得的差异基因中,有 3 个与细胞内糖代谢有关。甘露糖糖基转移酶和木葡聚糖内糖基转移酶与细胞内多糖的水解有关,从而增加胞内的渗透压,避免低温的伤害,但纤维素合酶与植物抗寒性的关系还未见报道。③CBF 转录因子。植物在遭受低温胁迫时,从感受低温信号到发生一系列生理生化反应和调节基因表达,进而产生抗寒能力,存在一个复杂的信号网络传导系统,1997 年,Stochinger 等^[15] 首次从拟南芥中克隆出 *CBF1* 基因,并将其转入到拟南芥中获得 *CBF1* 高表达的植株,发现转基因植株不经低温驯化就具有强抗寒性。随后又有人在拟南芥中相继克隆出了 *CBF2*, *CBF3*, 并通过类似的方法将其转入到拟南芥中,也获得不经低温驯化就具有强抗寒性转基因植株,并发现其体内大量的冷诱导基因转录水平有了明显的提高,如 *COR15a*, *RD29a* 等^[16]。最近 Heish 等^[17] 把拟南芥的 *CBF1* 基因转入到不能冷驯化的西红柿中,发现转基因的西红柿的低温存活率大大提高。本研究获得的 1 条基因序列与转录因子 CBF/NF-YB/HAP3 (NF-YB3) 有较高的同源性,该基因虽与植物抗寒性的关系还未经验证,但 Donald E Nelson 等的研究表明该基因与玉米的抗旱性密切相关^[18],但是否与铁皮石斛的抗寒也有密切关系,很值得进一步研究分析。④抗逆性蛋白。近年来,有关热激蛋白与耐寒性的关系屡见报道。李慧聪、郭秀林等研究证实玉米中热激蛋白基因明显 42 °C 热激诱导表达,热激 2 h 其表达量达最大值;4 °C 冷胁迫也能诱导 *HSP70* 表达量增加,冷胁迫 4 h,其表达量达最大值^[19]。本研究中获得的热激蛋白序列与大蒜的热激蛋白 70 基因序列同源性达 94%,冷胁迫下在铁皮石斛中具体的基因表达分析接下来会进一步重点研究。而冷胁迫下抗病蛋白和盐响应蛋白的表达虽未见报道,在一定程度上也能提高铁皮石斛的抗寒性。预测蛋白和未知序列。预测蛋白通过比对和大麦中一预测蛋白有很高的同源性,未知基因片段在 NCBI 数据库中未找到同源性序列,预计可能与铁皮石斛的抗寒性有关,但还需要大量后续的试验和表达分析来验证。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:265.
- [2] 王华,杨建峰. 植物抗寒基因工程研究进展[J]. 现代农业科技, 2007(23):117.
- [3] Bertrand C Y Collard, David J Mackill. Start codon targeted (SCoT) poly-morphism; a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. Plant Mol Biol Rep, 2009, 27:86.
- [4] 韦泳丽,何新华,罗聪,等. 罗汉松遗传多样性的 SCOT 分析[J]. 广西植物, 2012, 32(1):90.
- [5] 熊发前,蒋菁,钟瑞春,等. 目标起始密码子多态性(SCoT)分子标记技术在花生属中的应用[J]. 作物学报, 2010, 36(12):2055.
- [6] 陈虎,何新华,罗聪,等. 龙眼 24 个品种的 SCoT 遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(10):1651.
- [7] 陈香玲,李杨瑞,杨丽涛,等. 低温胁迫下甘蔗抗寒相关基因 cDNA-SCoT 差异显示[J]. 生物技术通报, 2010, 8:120.
- [8] 吴建明,李杨瑞,王爱勤,等. 赤霉素诱导甘蔗节间伸长基因的 cDNA-SCoT 差异表达[J]. 作物学报, 2010, 36(11):1883.
- [9] Bugos R C, Chiang V L, Zhang X, et al. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine[J]. Biotechniques, 1995, 19:734.
- [10] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂译. 北京:科学出版社, 2003:516.
- [11] H Kodama, T Hamada, G Horiguchi, et al. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast w-3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco[J]. Plant Physiol, 1994, 105:601.
- [12] Osamu Ishizaki-Nishizawa, Toshio Fujii, Mizue Azuma, et al. Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase[J]. Nat Biotech, 1996, 14:1003.
- [13] Shuji Yokoi, Sho-Ichi Higashi, Sachie Kishitani, et al. Introduction of the cDNA for shape *Arabidopsis* glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) confers unsaturation of fatty acids and chilling tolerance of photosynthesis on rice[J]. Mol Breed, 1998, 4:269.
- [14] Jun Huang, Rozina Hirji, Luc Adam, et al. Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations[J]. Plant Physiol, 2000, 122:747.
- [15] Eric J Stockinger, Sarah J Gilmour, Michael F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94:1035.
- [16] Sarah J Gilmour, Audrey M Sebolt, Maite P Salazar, et al. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation [J]. Plant Physiol, 2000, 124:1854.
- [17] Tsai-Hung Hsieh, Jent-Turn Lee, Pei-Tzu Yang, et al. Heterology expression of the *Arabidopsis* c-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato [J]. Plant Physiol, 2002, 129:1086.
- [18] Donald E Nelson, Peter P Repetti, Tom R Adams, et al. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 10(42):16450.
- [19] 李慧聪,郭秀林,王冬梅,等. 玉米热激蛋白 70 基因对温度胁迫的响应[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(6):12.

SCoT differential expression of cold resistance related genes in *Dendrobium officinale* under low temperature stress

LI Dong-bin, GAO Yan-hui*, SI Jin-ping

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

[Abstract] In order to study the molecule mechanism of the differential expression in *Dendrobium officinale* under low temperature, the high cold resistance germplasm were used for constructing the RNA pools. SCoT markers were used to analyze the different cDNA pools transcribed from the RNA pools. 11 transcripts derived fragments from 500 cDNA amplified bands were amplified by 64 primers, and were sorted out, cloned, sequenced and analyzed. The results showed that cDNA pools with SCoT markers could be used for differential display in *D. officinale* under low temperature stress. Sequence analysis indicated that the transcripts derived fragments were significantly homologous in nucleotide sequence with membrane-associated proteins, osmotic regulation protein, CBF transcriptional factor, resistance protein. One left gene segments functions were still unknown, which may be related to the cold resistant gene expression in *D. officinale*.

[Key words] *Dendrobium officinale*; cold resistance; SCoT; cold resistance gene; differential expression

doi:10.4268/cjcm20130409

[责任编辑 吕冬梅]