

DOI: 10.13376/j.cblls/2019118

文章编号: 1004-0374(2019)09-0959-09

珍稀药用植物铁皮石斛的组学及功能基因研究进展

李以格, 杨 杭, 姜琪梦, 陈研硕, 王晓锋, 陈 勇*

(温州大学生命与环境科学学院, 温州 325035)

摘 要: 铁皮石斛为兰科珍稀名贵药用植物, 具有极高的医药保健和生态观赏价值。以“高通量、高精度、低成本”为特点的新一代测序技术平台, 高效推动了铁皮石斛基因组和转录组等组学基础研究, 有关铁皮石斛多糖和石斛碱积累、生长发育调控、环境适应性等机制逐渐获得了分子数据支持。该文综述了近年来铁皮石斛基因组、转录组、蛋白质组等组学以及功能基因等研究, 内容涉及其非生物胁迫、多糖合成、种子萌发等过程, 最后对当前铁皮石斛分子生物学研究进行了讨论。

关键词: 铁皮石斛; 组学分析; 功能基因

中图分类号: Q7; Q75; S567.239 **文献标志码:** A

Investigation on omics and functional genes of *Dendrobium officinale* (Orchidaceae), a precious medicinal herb

LI Yi-Ge, YANG Hang, JIANG Qi-Meng, CHEN Yan-Shuo, WANG Xiao-Feng, CHEN Yong*

(Life Science and Environmental College, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China)

Abstract: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Orchidaceae) is an important, traditional Chinese herb with high medicinal, healthy as well as ecological, ornamental value. Next-generation sequencing platform, characteristic of remarkable technique advantages with high throughput, high precision as well as low cost, provided robust support for rapid understanding of omics knowledges on genome and transcriptome *etc.* of *D.officinale*. Therefore, molecular mechanisms regarding polysaccharides accumulation, development regulation and environment adaptation of *D.officinale* came to be elucidated. In this study, we review the dynamic progress on genome, transcriptome, proteome *etc.* as well as functional genes associated with abiotic stress response, polysaccharide biosynthesis and seeds germination *etc.* in *D.officinale*, and also discuss the existing problems on molecular investigation of *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale*; omics analysis; functional genes

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 为兰科、石斛属多年生草本植物, 该种植物茎直立或匍匐、多节、圆柱形、长 9~35 cm; 总状花序, 花期 3~6 月; 主要分布在亚洲和澳洲北部, 在我国浙江、福建、云南等地均有栽培^[1]。野生铁皮石斛主要生长在海拔约 1 600 m 的山地半阴湿岩石上, 由于长期过度采挖和栖息地遭受破坏, 野生铁皮石斛资源逐渐枯竭、濒临灭绝。

铁皮石斛为名贵中药材, 被誉为“中华仙草”和“药界大熊猫”。生化分析及药理学研究显示: 铁皮石斛富含多糖、石斛碱、氨基酸等药效成分,

具有抗肿瘤、抗氧化、提高人体免疫力、降低血糖等多种功能^[2-3]。过去, 铁皮石斛分子研究主要集中在种群遗传分析、基因分离与功能预测等方面, 所获信息量十分有限^[4-5]。然而, 最近几年, 以“高通量、高精度、低成本”为突出优势的新一代测序

收稿日期: 2018-11-01; 修回日期: 2019-05-30

基金项目: 温州市种子种苗科技创新专项(N20150009, Z20170009); 温州市科技特派员科技创新专项(X20-150008)

*通信作者: E-mail: chenrong700608@126.com

技术和功能基因研究手段的不断革新, 铁皮石斛基因组、转录组和蛋白质组等组学研究相继开展, 相关组学数据信息急剧增长^[6]; 同时, 功能基因研究也取得了较大进展, 因而很有必要对当前铁皮石斛组学及功能基因等研究进行综述。

1 铁皮石斛组学研究

1.1 基因组研究

铁皮石斛为二倍体单子叶植物, 共有 38 条染色体 ($2n = 38$)^[7]。Yan 等^[8]利用深度测序技术 (Illumina HiSeq 2000 和 Pacbio 平台) 首次从头组装出 1.35 Gb 的铁皮石斛基因组序列。该研究指出: 涉及真菌共生基因家族 (如 PRP: pathogenesis-related protein, 病程相关蛋白等基因家族)、抗旱等环境胁迫基因家族 (如 SSD1: subtilisin-like protease SDD1, 枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶 SDD1 等蛋白基因家族) 出现基因扩张现象; 与多糖合成相关的蔗糖磷酸合成酶 (sucrose-phosphate synthase, SPS) 和蔗糖合成酶 (sucrose synthase, SuSy) 等基因在基因组中分别存在 10 个和 15 个拷贝, 而生物碱合成通路首次拓展到了次生代谢物 16-epivellosimine 的生成。该研究鉴定出 25 个 MADS-Box 转录因子调控基因家族和 1 个特有的 MADS-Box ZMM17 基因家族, 暗示铁皮石斛基因组不仅具备兰科植物完整的开花基因, 而且还拥有一些特异开花基因。

Zhang 等^[7]采用 Illumina HiSeq 2000 测序平台和 SOAPdenovo2/Platanus 组装方式, 对铁皮石斛全基因组序列进行研究, 成功解析出 28 910 个蛋白质基因。基因组进化表明, 铁皮石斛与蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris*) 遗传关系最近。基因组比较显示, 铁皮石斛和蝴蝶兰抗病基因数目分别为 157 和 79 个, 以及热休克蛋白基因数目分别为 20 和 9 个, 暗示铁皮石斛比蝴蝶兰具有更强的免疫力以及环境适应能力。多糖合成关联基因存在大量重复 (如铁皮石斛基因组存在 13 个纤维素合成酶样 A 基因拷贝 (cellulose synthase-like A, CSLA), 暗示这些基因产物与药物多糖大量积累有关^[9-10]。MADS-box 基因家族在植物生长发育、形态建成 (如控制开花时间和花序结构) 等方面发挥重要调控作用, 研究指出, 铁皮石斛基因组存在 63 个 MADS-box 基因, 该基因家族的大量扩张暗示了铁皮石斛植物株型的多样性。此外, 铁皮石斛叶绿体基因组大小为 152 018~152 221 bp^[11-13], 与金钗石斛 (*Dendrobium nobile*) 叶绿体基因组 (150 793 bp) 相差不大^[14]。

铁皮石斛基因组数据不仅为研究铁皮石斛生长发育、形态建成、代谢调控、环境适应性等提供了分子信息, 而且为快速鉴定其转录组、蛋白质组、miRNA 组以及克隆功能基因等提供了基础参考。

1.2 转录组研究

广义转录组指某一特定生理条件下组织或细胞内所有转录产物集合; 狭义转录组是指特定生理条件下组织或细胞所有 mRNA 集合, 有时也包括非编码 RNA 集合。

1.2.1 多糖/生物碱代谢研究

He 等^[15]检测了铁皮石斛叶片和茎组织多糖含量, 并利用二代测序技术 (Illumina HiSeq 1500) 和单分子实时测序技术 (single-molecular real-time, SMRT) 分别对茎、叶组织进行转录组研究, 数据显示, 两种组织共有 1 414 个基因差异表达, 糖输出转运蛋白 DoSWEET1 和 DoSWEET14b (sugars will eventually be exported transporter) 基因在茎组织表达量大约是叶组织的 2 倍, 而 DoSWEET4 基因表达量是叶组织的 20 倍还要多, 纤维素转运蛋白 SUT (sucrose transporter) 基因在茎组织的表达量也显著高于叶组织, 他们推断茎组织基因 DoSWEET4 和 DoSUT1 的高水平表达可能与韧皮部中的糖负荷有关。选择性剪切研究发现: 12 910 个基因存在多个外显子, 其中 2 280 个基因存在选择性剪切, 如 2 个糖基转移酶 GT (glycosyltransferase) 基因和 4 个纤维素合成酶 Ce s (cellulose synthase) 基因。Shen 等^[16]通过检测铁皮石斛花、叶、茎、根等组织多糖与生物碱含量, 结合其转录组数据研究活性物质组织特异性分布机制, 结果发现, 多糖主要集中在茎组织而石斛碱在叶组织含量最高; 他们从转录组数据中解析出包含 35 个糖基转移酶基因和 49 个 P450 基因在内的大量基因, 并分析了这些基因的表达模式及其在金钗石斛和铁皮石斛的表达差异, 该研究为探索铁皮石斛多糖和生物碱合成等提供了有效信息。Guo 等^[17]转录组分析揭示了铁皮石斛 25 个基因产物参与了生物碱合成, 其中 5 个关键酶基因在叶组织表达量均高于茎组织, 他们认为细胞色素 P450、氨基转移酶、甲基转移酶、多药抗性蛋白 MDR (multidrug resistance protein) 和一些转录因子等可能参与生物碱合成。Zhang 等^[18]采用 Illumina 测序技术, 分别检测了铁皮石斛幼年 (10 个月) 和成年 (28 个月) 植株转录组, 成功鉴定出 430 个糖苷转移酶基因和 89 个纤维素合成酶基因。数据显示, 成年组共产生 32 794 个差异表达基因; 幼年和成年组分

别有 1 142 和 7 918 个特异表达基因, 这些差异表达基因主要与代谢通路和次生代谢物合成有关。此外, 该研究还鉴定出 170 个糖苷转移酶基因、37 个纤维素合成酶关联基因和 627 个转录因子基因, 为揭示多糖合成机制提供了基础信息。

1.2.2 遗传标记和内参基因研究

Guo 等^[17]从铁皮石斛茎组织分离出 553 084 条 EST 序列, 经拼装成 36 407 条转录本, 并从中筛选到 1 061 条 SSR 序列标记。Xu 等^[19]利用铁皮石斛栽培种两年生茎组织构建了 2 个转录组文库, 共获得 51 683 条转录本和 40 405 条 unigenes。在筛选的 8 527 条 SSR 序列中, 1 023 条 unigenes 至少含有 1 个 SSR 序列。数据支持 17 个 SSR 引物对能够产生多态性, 并且对霍山石斛基因组扩增同样有效。An 等^[20]从铁皮石斛原球茎转录组 26 个最稳定表达基因中筛选出 19 个基因, 结合 5 个常用的看家基因 (*Actin*、*Tubulin*、*EF-1A*、*GAPDH*、*SAND*), 研究它们在不同发育期、不同组织 (根、茎、叶) 等的稳定表达情况, 考察这些候选基因是否适合作为表达定量分析的内参基因, 数据显示上述候选内参基因中, 多数基因 (包括看家基因 *Actin1*、*GAPDH* 和 *EF-1A*) 在所检测样品中差异表达明显, 仅有少部分基因 (*ASS* 和 *APHIL*) 能够稳定表达。进一步研究发现, 选择上述不同参照基因做对照, *GNOM*、*AP2* 和 *TIL* 的表达量明显不同, 因而这 3 个基因表达需要特定内参或内参组合才能准确定量, 暗示了基因表达分析中内参基因筛选的必要性和重要性。

1.2.3 转录组其他研究

为了鉴定开花相关基因, Chen 等^[21]分析了铁皮石斛 4 个器官转录组, 鉴定出 2 645 个开花特异转录本, 功能注释表明 4 个糖代谢相关通路和 2 个脂肪酸相关通路被富集。同源序列比对揭示了铁皮石斛共有 24 个开花基因转录本, 暗示铁皮石斛存在经典的花合成通路, 种系分析显示兰科植物在进化过程中, 其开花基因座 Locus T 高度保守。Meng 等^[22]采用 RNA-seq、sRNA (small RNA) 和降解组测序技术研究铁皮石斛不同组织基因表达, 在组装的 536 558 条转录本中, 发现花、根、叶、茎 4 种组织中分别含有 2 645、256、42、54 条高表达转录本和 2 038、2、21、24 条特异 sRNAs, 并成功检测到 1 047 个成熟 miRNAs。同时, 他们建立起铁皮石斛激素转导、发育、次生代谢和 Argonaute 1 蛋白相关调控网络。铁皮石斛对低温环境高度敏感, Wu 等^[23]采用转录组和代谢组分析技术探讨了冷诱

导作用下基因表达模式 (详见 1.3 部分), 证实了冷处理能够显著调控基因表达水平。

上述转录组分析揭示了铁皮石斛不同器官或组织 (或不同发育期) 多糖代谢、石斛碱合成等基因表达与调控关系, 积累的海量数据为揭示铁皮石斛代谢调控、环境适应性机制等提供了动态分子基础。转录组遗传标记和内参基因等研究为铁皮石斛遗传多样性评估、分子鉴定与分类、种系重构以及基因表达定量分析等提供了新的序列位点信息。

1.3 蛋白质组/ miRNAs 组/代谢组等研究

Chen 等^[24]通过蛋白质组 (iTRAQ) 和转录组 (Illumina HiSeq2000) 比较分析, 研究铁皮石斛种子在共生和非共生萌发过程中表达谱变化, 共鉴定出 2 256 个蛋白质, 其中 308 个蛋白质存在差异表达 (S2/S3/S4), 与非共生相比, 共生种子萌发存在 229 个差异表达蛋白, 其中 32 个蛋白质基因在蛋白质组和转录组水平同时上调。关联性分析显示, 铁皮石斛种子萌发初期在共生与非共生条件下具有相似的蛋白质表达机制, 但共生途径 S2/S1 期 (原球茎形成期) 与非共生途径 A3/A2 期 (种子期) 的蛋白质表达谱相似, 暗示了真菌共生宿主细胞的碳水化合物、脂类代谢的关键蛋白质表达水平提高和提前表达, 因而促进了种子胚胎组织贮藏物质的利用率。

蛋白质赖氨酸琥珀酰化是细胞内最为广泛和重要的蛋白质修饰方式之一。Feng 等^[25]采用 LC-MS/MS 技术对赖氨酸琥珀酰化高效抗体免疫纯化铁皮石斛蛋白进行鉴定, 检测到 207 个蛋白存在 314 个赖氨酸琥珀酰化位, 其中糖分解代谢通路中有 5 个关键酶 (FBA、GAPDH、PGK、PGPG、ENO) 发生了赖氨酸琥珀酰化。蛋白质互作分析显示, 琥珀酰化蛋白参与了糖分解、TCA 循环、氧化磷酸化等代谢过程。Liu 等^[26]研究表明 miRNAs 在机体代谢、生长发育调控、形态建成等诸多方面发挥重要作用。Yang 等^[27]采用 miRNAs 微芯片和实时定量 PCR 技术, 检测了传统栽培和微繁殖的铁皮石斛 miRNAs 组表达, 发现两种材料中均存在 37 个 miRNAs 家族中的 120 种 miRNAs, 其中微繁殖植物 6 个家族的 45 种 miRNAs 存在差异表达, 包括 5 个上调家族 (miR156、miR164、miR171、miR827 和 miR529) 和 1 个下调家族 (miR167)。功能预测显示, 这些 miRNAs 主要涉及激素应激反应、生物代谢调控、胞内细胞器形成等生理过程。铁皮石斛对低温环境高度敏感。Wu 等^[23]代谢组和转录组分析指出, 低温处理 (4 °C 到 -2 °C) 导致铁皮石斛叶组织抗氧化

酶活性(SOD、CAT、POD、APX)、电渗现象显著提高;冷处理(0℃处理20h)代谢组分析表明,叶片组织68种代谢物有33种出现差异积累(差异倍数>1.5, $P<0.01$);冷处理能够激活糖类、氨基酸分解、柠檬酸循环等机制来满足高能量需求,显著影响2767个基因表达水平(如转录因子CBF表达上调153倍;MAPKKK16蛋白激酶可上调56倍),基因互作和调控网络分析证实了冷处理可在转录(后)及翻译(后)等多个水平调控相关基因表达。

铁皮石斛蛋白质组、miRNAs组、代谢组等研究尚处于初始阶段^[8,23-27],获得结论还需要更多组学数据补充和实验数据支持。然而,这些组学数据同基因组、转录组数据互为补充、相得益彰,为揭示铁皮石斛生理、生化代谢及环境适应性机制提供了更多分子基础信息。

2 铁皮石斛功能基因研究

2.1 非生物胁迫相关基因

铁皮石斛能够适应高温、寒冷、干旱等多样化环境,显示出极强的环境适应能力。蒋园等^[28]利用转录组测序数据和RT-PCR方法获得DoWRKY5蛋白基因(WRKY蛋白家族为转录因子家族中的超级家族,该类蛋白因含有1~2个高度保守的氨基酸序列WRKYGQK,即“WRKY结构域”而得名),经不同低温和4℃不同时间诱导处理幼苗后,该基因表达量升高,推测该基因产物与铁皮石斛低温胁迫应答有关。He等^[29]在铁皮石斛基因组中鉴定出63个DoWRKY基因,低温(4℃)处理10个月幼苗,发现根、茎组织中多数DoWRKY基因表达谱受到影响。此外,DoWRKY蛋白靶基因序列研究暗示,DoWRKY蛋白在多糖合成与分解代谢中发挥作用。前人研究也支持WRKY蛋白家族在植物生长发育、生物胁迫、次生代谢等过程中发挥调节作用^[28,30-32];Hong等^[33]基于铁皮石斛基因组和转录组数据鉴定出30个胚胎发生晚期丰富蛋白DofLEA基因(late embryogenesis abundant proteins),并从种子和根组织成功分离15个和2个DofLEAs基因。qPCR表达分析显示,4个LEA基因家族成员(DofLEA2-1、DofLEA2-2、DofLEA2-3、DofLEA3-1)在铁皮石斛种子、原球茎、根茎叶等组织均有表达;而DofLEA1-2等4个LEA基因仅在种子表达。环境胁迫处理(50℃高温和不同盐浓度)DofLEAs遗传转化的大肠杆菌菌株,其生存效率不同程度增加(除少数DofLEA家族成员),高温和盐处理的植株幼苗相关基因表

达模式与重组菌株实验结果大致相似,暗示了DofLEA基因家族在铁皮石斛种子成熟、植株生长发育、环境胁迫反应中发挥重要作用。Chen等^[34]基于铁皮石斛转录组分析,分离、鉴定出14个全长ARF基因(auxin response factor,生长素响应因子)cDNA序列。瞬时表达检测和转录激活能力分析显示,DnARF1、DnARF4、DnARF6定位在细胞核,其中只检测到DnARF6具有转录激活能力。不同激素(IAA、ABA、GA、6-BA)、不同胁迫(盐胁迫、脱水胁迫、4℃低温、30℃高温)分别处理3年生植株后,DnARFs基因表达水平显著上调或下调,暗示该类基因产物在多种非生物胁迫中发挥重要作用。此外,钙依赖蛋白激酶DoCDPK1、DoCDPK2、DoCDPK6(calcium-dependent protein kinase)^[35-36]、钙调磷酸酶B样蛋白互作蛋白激酶DoCIPK1-4(calcineurin B-like protein-interacting protein kinase)^[37]、多聚泛素DoUb1(polyubiquitin)^[38]等基因产物也可能在铁皮石斛非生物胁迫应答中发挥重要作用。

2.2 多糖代谢等相关基因

多糖是铁皮石斛药效主要成分之一,多糖合成、运输、代谢等涉及多个蛋白质或酶基因^[4]。张岗等^[39]分离到铁皮石斛蔗糖转运蛋白(sucrose transporter, SUT)基因DoSUT1,该基因在叶、茎组织表达量较高,分别为根组织的2.783和2.150倍。甘露糖焦磷酸化酶(GDP-mannose pyrophosphorylase, GMP)能够催化GDP-甘露糖生成,而GDP-甘露糖可参与甘露多糖生物合成;He等^[40]参照转录组数据,采用RACE技术(rapid amplification of cDNA ends, cDNA末端快速扩增技术)获得铁皮石斛DoGMP1、DoGMP2和DoGMP3全长cDNA克隆,DoGMP1基因遗传转化拟南芥植株显示:其DoGMP1表达量和甘露聚糖含量均显著提高,表明DoGMP基因产物参与甘露多糖生成;该研究证实盐胁迫下转基因株系种子萌发率提高、实生苗生长状况更好,暗示DoGMP1产物在种子萌发及植物盐胁迫方面发挥作用。He等^[10]研究指出,构成铁皮石斛水溶性多糖的单糖比例差异显著(甘露糖:葡萄糖:半乳糖=223:48:1);茎组织水溶性多糖含量高达367 mg/g(约占35%)(w/w),而水溶性多糖中甘露糖含量竟高达257 mg/g;农杆菌介导遗传转化拟南芥实验证实:含有铁皮石斛DoCSLA6基因的拟南芥转基因植株,其甘露糖含量明显提高,暗示DoCSLA6基因产物有助于甘露多糖合成。Gao等^[41]采用RACE技术从铁皮石斛组织分离到完整的碱性/中

性转化酶 (DoNI, alkaline/neutral invertase) 基因, 数据支持铁皮石斛茎组织多糖含量、DoNI 基因表达水平、DoNI 酶活均最高, 暗示 DoNI 基因表达与多糖积累有关。此外, DoSWEET1 蛋白^[42]、尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 DoUGPase1 (UDP-glucose pyrophosphorylase)^[43] 等基因产物均参与多糖代谢。

2.3 种子萌发、生长发育等基因

真菌菌丝对石斛植物的种子萌发、幼苗生长和有效成分积累等发挥重要作用^[44]。赵明明等^[45]利用 RACE 技术, 从铁皮石斛接菌共生萌发种子分离到 DoMAPK5 基因 cDNA 全长序列 (mitogen-activated protein kinase, 分裂素原活化蛋白激酶, 即 MAP 激酶)。数据支持该基因在未接菌组织中组成型表达, 在接菌共生萌发组织中显著上调 (10.49 倍), 暗示 DoMAPK5 基因产物在真菌共生萌发组织中发挥作用。ABC 转运蛋白 (ATP-binding cassette transporter) 是一类跨膜转运蛋白, 在植物次生代谢物质的转运与积累、植物抗病等方面发挥重要作用; 阎波等^[46]基于铁皮石斛基因组和转录组数据, 初步鉴定了 88 个铁皮石斛 ABC 转运蛋白 (包括 ABCA-ABCI 等 7 个亚家族), 种子萌发过程中 ABC 转运蛋白表达模式研究表明, 与无菌萌发种子相比, 2 个 ABCB11 基因和 2 个 ABCG-PDR 基因在接菌共生萌发中表达量显著上调 (上调 ≥ 10 倍), 暗示这些蛋白与铁皮石斛种子共生萌发直接相关。2017 年, 李依民等^[47]研究也表明, 铁皮石斛 ABC 转运蛋白 F 家族成员 DoABCF1 和 DoABCF2 基因在叶组织显著表达, 推测该类蛋白参与铁皮石斛生长发育。刘思思等^[48]分离到赤霉素 3-氧化酶 DoGA3ox 基因 (gibberellin 3-oxidases, GA3ox), 该基因在共生萌发种子中的表达量高于非共生萌发种子, 表明该基因在铁皮石斛种子萌发过程中发挥重要调控作用。

2.4 其他基因

研究指出: 铁皮石斛 Rubisco 活化酶 DoRCA (Rubisco activase) 参与光合作用^[49-50]; 花青素合成酶 DoANS (anthocyanin synthase)、UDP-葡萄糖黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶 DoUFGT (UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyl transferase) 参与铁皮石斛花青素合成^[51]; 转化酶抑制子 DoInvInh1-3 (invertase inhibitor) 参与调节铁皮石斛茎组织细胞壁结合转化酶活性^[52]; 查尔酮合酶 DoCHS (chalcone synthase) 参与铁皮石斛激素运输、器官形态建成及类黄酮合成等^[53]。此外, Kui 等^[54]借助农杆菌介导的遗传转化技术, 成功筛选出 4 个高效启动子 (MMV、CVMV、PCISV、35S) 用于铁皮石斛转化研究, 他们采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9, 规律成簇间隔短回文重复 - Cas9 蛋白系统), 对铁皮石斛木质纤维素合成途径的 5 个关键基因 (C3H、C4H、4CL、CCR、IRX) 进行突变分析, 获得不同程度编辑效果 (10%~100%)。该研究为后续铁皮石斛基因功能分析提供了技术支持 (过表达和基因敲除)。李清等^[4]综述了 5 年 (2011—2016 年) 石斛属植物开花基因、与菌根互作基因、萜类合成等 30 多个基因及其功能 (研究材料多为铁皮石斛); 本文对 2016 年以来报道的铁皮石斛功能基因研究也做了系统梳理 (表 1)。

上述功能基因研究涉及铁皮石斛非生物胁迫、多糖代谢、种子萌发等多方面内容, 涵盖了植物生长发育、代谢调控相关的主要功能基因, 这些基础性研究为全面深入探索铁皮石斛生命活动规律提供了重要参考。

3 铁皮石斛分子生物学研究现状分析

当前铁皮石斛组学分析及功能基因等研究已经

表1 铁皮石斛功能基因研究

分类	基因名称	英文名称(NCBI编号)	鉴定方法	功能预测	文献
参与多糖代谢、运输	纤维素合成酶样 A6	<i>DoCSLA6 (cellulose synthase-like A)</i> (KF195561.1)	RT-PCR	甘露糖合成	[10]
	蔗糖转运蛋白	<i>DoSUT1 (sucrose transporter)</i> (KF876842)	RACE、RT-PCR	运输蔗糖	[39]
	GDP甘露糖焦磷酸化酶	<i>DoGMPI (GDP-mannose pyrophosphorylase)</i> (ND)	RACE、transformation、Western blot	甘露聚糖合成; 盐胁迫反应	[40]
	DoSWEET1蛋白	<i>DoSWEET1 (sugars will be eventually exported transporters)</i> (KT957550)	RACE、RT-PCR	糖转运及种子共生萌发调控	[42]
	尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶	<i>DoUGPase1 (UDP-glucose pyrophosphorylase)</i> (ND)	RACE、qRT-PCR	多糖累积	[43]
	碱性/中性转化酶	<i>DoNI2 (alkaline/neutral invertase)</i> (KY794404)	RACE、qRT-PCR	参与蔗糖代谢	[55]
	己糖转运蛋白	<i>DoHT1 (hexose transporter)</i> (KU160469)	RT-PC、RACE	调控糖代谢	[56]

表1 续表

分类	基因名称	英文名称(NCBI编号)	鉴定方法	功能预测	文献
	可溶性酸性转化酶	<i>SAI (soluble acid invertase)</i> (KU598852)	qRT-PCR	参与蔗糖代谢	[57]
胁迫应答、逆境生理等	WRKY蛋白(该类蛋白含有WRKY残基)	<i>DoWRKYs (sugars will be eventually exported transporters)</i> 、 <i>DoWRKY5</i> (ND)、 <i>DoWRKY3</i> (KT957549)、 <i>DoWRKY6</i> (ND)	qRT-PCR、RACE	非生物胁迫、糖转运、共生萌发; 生长发育、逆境生理	[28,30-32]
	钙依赖蛋白激酶	<i>DoCDPK1</i> 、 <i>DoCDPK2</i> 、 <i>DoCDPK6</i> (KY682702) (<i>calcium-dependent protein kinase</i>)	RACE、RT-PCR、qRT-PCR	参与非生物胁迫	[35-36]
	类钙调磷酸酶B蛋白互作蛋白激酶	<i>Do CIPK1-4 (CBL-interacting protein kinase)</i> (KT957557)、(KT957558)、(KT957559)、(KT957560)	RACE、q-PCR	生长发育、逆境生理	[37]
	多聚泛素基因	<i>DoUB1 (polyubiquitin)</i> (ND)	RACE、qRT-PCR	参与低温胁迫、干旱胁迫	[38]
	晚期胚胎富集蛋白	<i>DoLEA2 (late embryogenesis abundant protein)</i> (KY626329)	RACE、RT-PCR、qPCR	耐盐胁迫	[58]
	钙网蛋白	<i>DoCRT1 (calreticulin)</i> (KT957551)	RACE、q-PCR	参与生长发育、逆境生理	[59]
	生长素响应因子	<i>DnARF1</i> 、 <i>DnARF4</i> 、 <i>DnARF6</i> (<i>auxin response factor</i>)	qRT-PCR	非生物胁迫抗性	[60]
种子萌发	促分裂原蛋白激酶	<i>DoMAPK5 (mitogen- activated protein kinase)</i> (KJ472788)	RACE、qRT-PCR	参与接菌共生种子萌发	[45]
生长发育、形态建成	ABC转运蛋白	<i>ABCA-ABCI (ATP-binding cassette transporters)</i> (ND)	基因组、转录组分析、qPCR	种子萌发、微生物互作	[46]
	ABC转运蛋白F家族	<i>DoABCF1</i> (KU160474)、 <i>DoABCF2</i> (KU160475) (<i>ATP-binding cassette</i>)	RACE、qRT-PCR	参与生长发育	[47]
	赤霉素3-氧化酶	<i>DoGA3ox (gibberellin 3-oxidases)</i> (KT205842)	RACE、qRT-PCR	参与种子萌发	[48]
	蛋白磷酸酶2C1	<i>DoPP2C1 (protein phosphatase)</i> (KJ995533)	qRT-PCR、RACE	生长发育、逆境生理、次级代谢	[61]
	泛素结合酶	<i>DoUBC24 (ubiquitin-conjugating enzyme)</i> (KX524067)	RACE、nest PCR、qRT-PCR	原球茎发育、组织形态建成	[62]
	胚胎发育相关基因	<i>DoEMB8 (embryogenesis-associated protein)</i> (ND)	RACE、RT-qPCR	参与胚胎发育	[63]
	富羟脯氨酸糖蛋白	<i>HRGPs (hydroxyproline-rich glycoproteins)</i> (ND)	Real-time PCR	参与共生萌发	[64]
其他	Rubisco活化酶	<i>RCA2</i> (KT205842)、 <i>Do RCA</i> (KT205841) (<i>Rubisco activase</i>)	RT-PCR、RACE	参与光合作用	[49-50]
	Obg GTP酶	<i>Obg GTPases (ObgCs)</i> (KU598852)	RACE、Real-time PCR	核糖体合成、叶绿体发育	[65]
	花青素合成酶; UDP-葡萄糖黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶	<i>DoANS (anthocyanidin synthase)</i> (MH458949)、 <i>DoUFGT1-2</i> (MH663506; MH663505) (<i>UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase</i>)	Real-time PCR、NestedPCR	花青素合成	[51]
	转化酶抑制子	<i>DoInvInh1-3 (invertase inhibitor)</i> (KY947274-KY947276)	RACE、qRT-PCR	调节茎组织细胞壁结合转化酶活性	[52]
	查尔酮合酶	<i>DoCHS (chalcone synthase)</i> (KT783451)	qRT-PCR	参与激素运输、类黄酮合成	[53]
	倍半萜合成酶	<i>DoSES (sesquiterpene synthase)</i> (KX278311)	RACE、qRT-PCR	萜类代谢	[66]
	焦磷酸合成酶	<i>DoHDS (4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase)</i> (KJ161312)	RACE、RT-PCR	焦磷酸合成	[67]

注: ND表示未检测到

取得较大进展, 然而, 目前对于这些海量数据的解读和功能研究却远远不够: (1) 铁皮石斛基因组含有近 3 万个基因^[7], 大量基因功能尚未注释, 精细结构基因组和功能基因组研究尚未真正开展; (2) 转录组、蛋白质组、miRNAs 等组学数据需要进一步实验验证, 进化基因组、糖组 (glycome) 等组学研究尚未有报道; (3) 多数功能基因研究仅局限于基因分离及生物信息学预测, 缺乏直接实验证据 (如基因过表达或敲除分析), 基因表达分析多从转录水平开展 (定量 PCR 检测), 缺乏其他水平分析, 如表观遗传以及非编码 RNA (尤其 lncRNAs 和 circRNAs) 调控分析。很显然, 当前对铁皮石斛组学和功能基因的认知依然十分有限。此外, 铁皮石斛研究还存在其他问题: (1) 尚未引起国际同行广泛关注 (铁皮石斛为地域性物种, 文献报道绝大多数来自国内; 国际权威杂志报道较少); (2) 铁皮石斛多糖 / 石斛碱等功效研究需要更精准、权威数据支撑^[2]; (3) 铁皮石斛种群退化、遗传多样性水平降低、野生资源濒临灭绝, 且当前种群遗传研究样本量较少并有部分重复^[5]; (4) 铁皮石斛亚分类 (如亚种 / 变种) 是否必要, 如叶片宽 / 窄、节间长 / 短、叶茎颜色 (紫 / 绿) 等已经出现较大性状变异。综上所述, 未来铁皮石斛基础研究依然任重道远。

致谢: 感谢浙江省聚优品生物科技股份有限公司、温州“雁圣源”铁皮石斛有限公司、雁荡山铁皮石斛研究所等单位提供支持!

[参 考 文 献]

- [1] Ng T, Liu J, Wong J, et al. Review of research on *Dendrobium*, a prized folk medicine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93: 1795-803
- [2] Tang HX, Zhao TW, Sheng YJ, et al. *Dendrobium officinale*. Kimura et Migo: a review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and industrialization. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 7436259
- [3] Sun J, Guo Y, Fu X, et al. *Dendrobium candidum* inhibits MCF-7 cells proliferation by inducing cell cycle arrest at G2/M phase and regulating key biomarkers. *Onco Targets Ther*, 2015, 9: 21-30
- [4] 李清, 李标, 郭顺星. 兰科石斛属植物分子生物学研究进展. *中国中药杂志*, 2016, 41: 2753-61
- [5] Teixeira da Silva JA, Jin X, Dobránszki J, et al. Advances in *Dendrobium* molecular research: applications in genetic variation, identification and breeding. *Mol Phylogenet Evol*, 2016, 95: 196-216
- [6] Zheng SG, Hu YD, Zhao RX, et al. Genome-wide researches and applications on *Dendrobium*. *Planta*, 2018, 248: 769-84
- [7] Zhang GQ, Xu Q, Bian C, et al. The *Dendrobium catenatum* Lindl. genome sequence provides insights into polysaccharide synthase, floral development and adaptive evolution. *Sci Rep*, 2016, 6: 19029
- [8] Yan L, Wang X, Liu H, et al. The genome of *Dendrobium officinale* illuminates the biology of the important traditional Chinese Orchid herb. *Mol Plant*, 2015, 8: 922-34
- [9] He CM, Zhang J, Liu X, et al. Identification of genes involved in biosynthesis of mannan polysaccharides in *Dendrobium officinale* by RNA-seq analysis. *Plant Mol Biol*, 2015, 88: 219-31
- [10] He CM, Wu KL, Zhang JX, et al. Cytochemical localization of polysaccharides in *Dendrobium officinale* and the involvement of *DoCSLA6* in the synthesis of mannan polysaccharides. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 173
- [11] Yang P, Zhou H, Qian J, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Dendrobium officinale*. *Mitochondrial DNA*, 2014, 27: 1262-4
- [12] Zhong ZM, Zhang GF, Lai XP, et al. The complete chloroplast genome sequence of a new variety of *Dendrobium officinale* 'zhong ke IV hao'. *Mitochondrial DNA Part B*, 2016, 1: 669-70
- [13] Luo J, Hou BW, Niu ZT, et al. Comparative chloroplast genomes of photosynthetic orchids: insights into evolution of the Orchidaceae and development of molecular markers for phylogenetic applications. *PLoS One*, 2014, 9: e99016
- [14] Yan W, Niu Z, Zhu S, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Dendrobium nobile*. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 2016, 27: 4090-2
- [15] He L, Fu S, Xu Z, et al. Hybrid sequencing of full-length cDNA transcripts of stems and leaves in *Dendrobium officinale*. *Genes*, 2017, 8: 257
- [16] Shen C, Guo H, Chen H, et al. Identification and analysis of genes associated with the synthesis of bioactive constituents in *Dendrobium officinale* using RNA-Seq. *Sci Rep*, 2017, 7: 187
- [17] Guo X, Li Y, Li C, et al. Analysis of the *Dendrobium officinale* transcriptome reveals putative alkaloid biosynthetic genes and genetic markers. *Gene*, 2013, 527: 131-8
- [18] Zhang J, He C, Wu K, et al. Transcriptome analysis of *Dendrobium officinale* and its application to the identification of genes associated with polysaccharide synthesis. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 5
- [19] Xu M, Liu X, Wang JW, et al. Transcriptome sequencing and development of novel genic SSR markers for *Dendrobium officinale*. *Mol Breeding*, 2017, 37: 18
- [20] An HQ, Zhu QK, Pei W, et al. Whole-transcriptome selection and evaluation of internal reference genes for expression analysis in protocorm development of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. *PLoS One*, 2016, 11: e0163478
- [21] Chen Y, Shen Q, Lin R, et al. *De novo* transcriptome analysis in *Dendrobium* and identification of critical genes associated with flowering. *Plant Physiol Biochem*, 2017, 119: 319-27

- [22] Meng YJ, Yu DL, Xue J, et al. A transcriptome-wide, organ specific regulatory map of *Dendrobium officinale*, an important traditional Chinese orchid herb. *Sci Rep*, 2016, 6: 18864
- [23] Wu ZG, Jiang W, Chen SL, et al. Insights from the cold transcriptome and metabolome of *Dendrobium officinale*: global reprogramming of metabolic and gene regulation networks during cold acclimation. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1653
- [24] Chen J, Liu SS, Kohler A, et al. iTRAQ and RNA-Seq analyses provide new insights into regulation mechanism of symbiotic germination of *Dendrobium officinale* seeds (Orchidaceae). *J Proteome Res*, 2017, 16: 2174-87
- [25] Feng S, Jiao K, Guo H, et al. Succinyl-proteome profiling of *Dendrobium officinale*, an important traditional Chinese orchid herb, revealed involvement of succinylation in the glycolysis pathway. *BMC Genomics*, 2017, 18: 598
- [26] Liu H, Yu H, Tang G, et al. Small but powerful: function of microRNAs in plant development. *Plant Cell Rep*, 2018, 37: 515-28
- [27] Yang ZL, Yang DF, Ding XF, et al. MicroRNA expression profiles in conventional and micropropagated *Dendrobium officinale*. *Genes Genomics*, 2015, 37: 315-25
- [28] 蒋园, 朱玉球, 高燕会, 等. 铁皮石斛WRKY5基因的克隆与表达分析. *中草药*, 2016, 47: 301-8
- [29] He CM, Teixeira da Silva JA, Tan J, et al. A genome-wide identification of the WRKY family genes and a survey of potential WRKY target genes in *Dendrobium officinale*. *Sci Rep*, 2017, 7: 9200
- [30] Wang T, Song Z, Wei L, et al. Molecular characterization and expression analysis of WRKY family genes in *Dendrobium officinale*. *Genes Genomics*, 2018, 40: 265-79
- [31] 张岗, 刘思思, 彭亮, 等. 铁皮石斛转录因子基因DoWRKY3的克隆与分子特性分析. *中草药*, 2017, 48: 2930-6
- [32] 张子凤, 吕楠, 安红强, 等. 铁皮石斛DoWRKY6转录因子基因的克隆与分析. *现代生物医学进展*, 2017, 17: 615-8
- [33] Hong L, Xu Z, Guo S. Functional insights into the late embryogenesis abundant (LEA) protein family from *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) using an *Escherichia coli* system. *Sci Rep*, 2016, 6: 396938
- [34] Chen Z, Ye Y, Fu D, et al. Identification and expression profiling of the auxin response factors in *Dendrobium officinale* under abiotic stresses. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 2719
- [35] 盛况, 高燕会, 斯金平, 等. 铁皮石斛DoCDPK基因的克隆与表达分析. *园艺学报*, 2016, 43: 2412-22
- [36] 盛况, 高燕会, 斯金平, 等. 铁皮石斛DoCDPK6基因及启动子的克隆与表达分析. *农业生物技术学报*, 2017, 25: 588-98
- [37] 李依民, 张娜, 沈霞, 等. 珍稀药用铁皮石斛4个CIPKs基因的鉴定与表达分析. *药学学报*, 2018, 53: 304-12
- [38] 裴薇, 梁易, 范静, 等. 铁皮石斛多聚泛素基因Polyubiquitin1 (DoUbl1)的克隆及表达分析. *生物学杂志*, 2017, 34: 6-10
- [39] 张岗, 刘阿萍, 邵大庆, 等. 铁皮石斛蔗糖转运蛋白基因分离和表达分析. *中草药*, 2016, 47: 3688-95
- [40] He CM, Yu ZM, Teixeira da Silva JA. DoGMP1 from *Dendrobium officinale* contributes to mannose content of water-soluble polysaccharides and plays a role in salt stress response. *Sci Rep*, 2017b, 7: 41010
- [41] Gao F, Cao XF, Si JP, et al. Characterization of the alkaline/neutral invertase gene in *Dendrobium officinale* and its relationship with polysaccharide accumulation. *Genet Mol Res*, 2016, 15: gmr.15027647
- [42] 张岗, 刘思思, 杨新杰, 等. 一个全新的铁皮石斛DoSWEET1基因的分子克隆与特性分析. *药科学报*, 2016, 51: 991-7
- [43] 吕楠, 安红强, 裴薇, 等. 铁皮石斛尿苷二磷酸葡萄糖蔗糖磷酸化酶基因的克隆与分析. *现代生物医学进展*, 2017, 17: 1215-9,1232
- [44] 陈娟, 张丽春, 邢咏梅. 兰科石斛属植物菌根共生研究进展. *中国药学杂志*, 2013, 48: 1644-8
- [45] 赵明明, 张岗, 张大为, 等. 铁皮石斛DoMAPK5基因的克隆及表达特征分析. *时珍国医国药*, 2016, 26: 509-12
- [46] 阎波, 刘思思, 陈娟, 等. 药用植物铁皮石斛ABC转运蛋白基因的鉴定及其差异表达分析. *药科学报*, 2018, 53: 1177-89
- [47] 李依民, 雷根平, 颜永刚, 等. 铁皮石斛2个F家族ABC转运蛋白基因的克隆和表达研究. *中草药*, 2017, 48: 3153-9
- [48] 刘思思, 张岗, 陈晓梅, 等. 铁皮石斛赤霉素3-氧化酶基因的克隆及表达分析. *中草药*, 2016, 47: 990-6
- [49] 蒋素华, 张燕, 王默霏, 等. 铁皮石斛RCA2基因克隆与生物信息学分析. *广西植物*, 2017, 37: 80-6
- [50] 崔波, 王洁琼, 宋彩霞, 等. 铁皮石斛DORCA基因的克隆及表达分析. *西北植物学报*, 2016, 36: 23-9
- [51] Yu Z, Liao Y, Teixeira da Silva JA, et al. Differential accumulation of anthocyanins in *Dendrobium officinale* stems with red and green peels. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 2857
- [52] 苗小荣, 牛俊奇, 莫昭展, 等. 铁皮石斛转化酶抑制子家族基因的克隆和表达分析. *生物技术通报*, 2018, 34: 129-36
- [53] 孟衡玲, 张薇, 卢丙越, 等. 铁皮石斛查尔酮合酶基因克隆与表达分析. *南方农业学报*, 2016, 47: 2015-9
- [54] Kui L, Chen H, Zhang W, et al. Building a genetic manipulation tool box for Orchid biology: identification of constitutive promoters and application of CRISPR/Cas9 in the Orchid, *Dendrobium officinale*. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 2036
- [55] 苗小荣, 牛俊奇, 莫昭展, 等. 铁皮石斛中性/碱性转化酶(DoNI2)基因的克隆和表达分析. *中草药*, 2018, 49: 3659-66
- [56] 李依民, 陈莹, 刘阿萍, 等. 铁皮石斛己糖转运蛋白基因DoHT1的分离和表达分析. *中国中药杂志*, 2018, 43: 1124-30
- [57] 孟衡玲, 张薇, 卢丙越, 等. 铁皮石斛可溶性酸性转化酶基因克隆与表达分析. *华南农业大学学报*, 2017, 38: 81-5
- [58] 凌鸿, 曾旭, 郭顺星. 铁皮石斛DoLEA2基因的克隆、表达及功能分析. *药学学报*, 2017, 52: 1337-44
- [59] 李依民, 张娜, 李欢, 等. 铁皮石斛钙网蛋白基因DoCRT1的分子克隆与表达研究. *西北植物学报*, 2017, 37: 2350-6
- [60] Chen Z, Yuan Y, Fu D, et al. Identification and expression profiling of the auxin response factors in *Dendrobium*

- officinale* under abiotic stresses. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: E2719
- [61] 张娜, 李欢, 黑小斌, 等. 铁皮石斛蛋白磷酸酶*DoPP2C1*基因的克隆与表达分析. *中草药*, 2018, 49: 1661-6
- [62] 安红强, 范静, 梁易, 等. 铁皮石斛泛素结合酶基因*DoUBC24*的克隆及表达分析. *生物技术通讯*, 2016, 27: 643-8
- [63] 安红强, 王万军. 铁皮石斛胚胎发生相关基因*DoEMB8*的克隆及表达分析. *生物学杂志*, 2017, 34: 1-5; 16
- [64] Li YY, Chen XM, Zhang Y, et al. Immunolocalization and changes of hydroxyproline-rich glycoproteins during symbiotic germination of *Dendrobium officinale*. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 552
- [65] Chen J, Deng F, Deng M, et al. Identification and characterization of a chloroplast-targeted Obg GTPase in *Dendrobium officinale*. *DNA Cell Biol*, 2016, 35: 802-11
- [66] 沈王琴, 陈龙龙, 张传明, 等. 铁皮石斛倍半萜合成酶基因的克隆与表达分析. *中草药*, 2017, 48: 4963-9
- [67] 王翔, 吴林松, 吴秋菊, 等. 铁皮石斛HDS基因的克隆与初步表达分析. *中草药*, 2016, 47: 803-9