

# 铁皮石斛基因组学、转录组学与功能基因研究进展

詹忠根

浙江经贸职业技术学院 应用工程系, 浙江 杭州 310018

**摘要:** 铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 是兰科石斛属药用植物中最为珍稀名贵的物种, 内含多糖、萜类、联苄类、生物碱类等化学成分, 具有抗氧化、抗肿瘤、增强免疫力、减轻肝损伤、降血糖等功效。其巨大的药用价值、科学价值和商业价值掀起了相关研究热潮, 尤其是近 5 年, 铁皮石斛在核酸分子生物学方面的研究取得了越来越多的成果。从铁皮石斛基因组学研究、转录组学研究和功能基因克隆等方面的研究进展进行综述, 以期对铁皮石斛功能基因的进一步深入研究提供参考。

**关键词:** 铁皮石斛; 基因组学; 转录组学; 功能基因; 克隆

**中图分类号:** R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)16-3979-11

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.034

## Research progress on genomics, transcriptomics and functional genes of *Dendrobium officinale*

ZHAN Zhong-gen

Applied Engineering Department, Zhejiang Economic and Trade Polytechnic, Hangzhou 310018, China

**Abstract:** *Dendrobium officinale* is one of the most precious medicinal plants in the family of Orchidaceae, and rich in polysaccharides, astragalus, bibenzyls and alkaloids. It has effects such as antioxidant, anti-cancer, immuno-enhancing, lowering blood sugar, and alleviating liver injury. Its huge medicinal, scientific and commercial value has raised a research upsurge, especially in the past five years, nucleic acid molecular biology of *Dendrobium officinale* has made more and more exciting results. In order to provide scientific guidance for further research on functional genes, this paper reviews the recent progress in research on genomics, transcriptomics and functional genes of *D. officinale*.

**Key words:** *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; genomics; transcriptomics; functional gene; cloning

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是兰科石斛属草本药用植物, 分布于东亚和东南亚等国。在中国, 主要分布于安徽西南部、广西西北部、四川、云南东南部、浙江东部和福建西部, 其中浙江、安徽、云南产的铁皮石斛最为著名。铁皮石斛内含多糖、萜类、联苄类、生物碱类等化学成分, 具有抗氧化、抗肿瘤、增强免疫力、减轻肝损伤、降血糖等功效, 是广受消费者欢迎的药食同源植物<sup>[1]</sup>。自铁皮石斛人工繁育成功后, 种植范围和种植面积迅速扩大, 现已形成年产万吨, 产值上百亿的产业规模。其特殊的药理药效和巨大的市场潜力也带动了相关研究, 如有效成分、药理药效、种质创新、栽培技术、产品开发, 分子机制等。尤其是近 5 年, 铁皮石斛在核酸分子生物学方面的研究取得了越来越多的成果。为此, 本文从铁皮石斛基

因组学研究、转录组学研究和功能基因克隆等方面的研究进展进行, 以供参考。

### 1 铁皮石斛基因组学研究

#### 1.1 遗传连锁图谱构建

遗传连锁图谱能呈现遗传标记在染色体上的相对位置和线性排列, 是基因定位和种质创新的重要手段。虽然石斛属植物因自交不亲和、基因高度杂合等特点给遗传图谱构建带来一定难度, 但近年来利用分子标记技术进行遗传图谱的构建也有少量报道, 如重唇石斛 *D. hercoglossum* Rchb. f.<sup>[2]</sup>、细茎石斛 *D. moniliforme* (L.) Sw. 和金钗石斛 *D. nobile* Lindl.<sup>[3]</sup>、密花石斛 *D. densiflorum* Lindl. 和卓花石斛 (檀香石斛) *D. superbum* Lindl.<sup>[4]</sup>、铁皮石斛<sup>[2,5-8]</sup>等均有遗传连锁图谱构建的报道, 其中以铁皮石斛最多。Xue 等<sup>[2]</sup>利用随机扩增多态性 DNA (RAPD)

收稿日期: 2019-03-09

作者简介: 詹忠根 (1971—), 男, 教授, 主要从事分子生物学和天然产物化学研究。Tel: (0571)86929736 E-mail: zhgz9321@163.com

和序列相关扩增多态性 (SRAP) 标记技术构建的铁皮石斛遗传图谱含 62 个位点、11 个连锁群和 3 个联体, 总图距为 629.4 cM, 平均图距为 11.2 cM。赵红燕<sup>[6]</sup>利用多种分子标记构建的图谱含 220 个位点和 22 个连锁群, 总图距为 1 425.9 cM, 平均图距为 10.41 cM。Lu 等<sup>[5,7]</sup>利用 EST-SSR 和 SRAP 分子标记技术构建的遗传图谱含 157 个位点和 27 个连锁群, 总图距为 1 580.4 cM, 平均图距为 11.89 cM。上述研究在一定程度上诠释了石斛的遗传背景, 然而其标记数量和覆盖度还不能用于性状的精确定位, 为此, Lu 等<sup>[8]</sup>利用 SLAF-seq 技术大规模、高通量检测了石斛基因组中的单核苷酸多态性 (SNP) 标记并对标记进行基因分型, 绘制出第 1 张基本覆盖石斛属基因组的高密度 SNP 综合遗传图谱, 该图谱含 8 573 个位点和 19 个连锁群, 总图距为 2 737.49 cM, 平均图距为 0.32 cM, 并鉴定出与茎总多糖含量相关的 5 个数量性状位点 (QTL), 其中 3 个 QTLs 区域中的 8 个 SNPs 标记在铁皮石斛的 4 个基因上被定位。

## 1.2 基因组测序与功能注释

铁皮石斛正常植株为二倍体,  $2n=38$ , 染色体小, 约  $2\ \mu\text{m}$ <sup>[9]</sup>, Yan 等<sup>[10]</sup>利用 2 代 Illumina HiSeq 技术结合 3 代 PacBio SMRT 技术对云南普洱 F3 代人工自交铁皮石斛进行全基因组测序, 组装后基因组大小为 1.35 Gb, 杂合性 0.48%, 覆盖 94% 的全基因组和 91.5% 的基因编码区, 注释蛋白编码基因 34 699 个, 非蛋白编码 RNA 中共注释 1 005 个 miRNA, 89 个 snRNA, 16 个 sRNA, 396 个 rRNA 和 545 个 tRNA, 并确定了完整的花序基因集。Zhang 等<sup>[11]</sup>利用二代 Illumina HiSeq 技术也对铁皮石斛进行全基因组测序, 组装后基因组大小为 1.01 Gb, 覆盖 93% 的全基因组和 97% 的基因编码区, 注释蛋白编码基因 28 910 个, 并绘制出高质量的铁皮石斛基因图谱。Yan 等<sup>[10]</sup>和 Zhang 等<sup>[11]</sup>均认为铁皮石斛有些基因家族发生了扩张, 如与真菌共生、抗旱相关的基因家族; 涉及多糖相关的基因有大量重复, 如蔗糖磷酸合成酶基因 SPS、蔗糖合成酶基因 SuSy、葡甘聚糖合酶基因 CsL。与此同时, Luo 等<sup>[12]</sup>、Yang 等<sup>[13]</sup>和 Zhong 等<sup>[14]</sup>相继测定了铁皮石斛叶绿体基因组 (cpDNA) 序列, 3 者序列拼接一致, 主要不同表现在于片段大小与基因数目上, 如 3 者测得铁皮石斛叶绿体基因大小分别为 152 221、152 018、152 185, 其中蛋白质编码基因分别为 76、83、89

个; 另外 tRNA 基因、rRNA 基因以及包含 1 个或 2 个内含子基因的数目也不一致。

## 2 铁皮石斛转录组学研究

转录组连接着基因组与蛋白质组, 是后基因组时代最活跃的学科之一。铁皮石斛转录组测序的不断推进, 为铁皮石斛功能基因挖掘、发育机制研究、分子标记开发、非编码区域 (ncRNA) 及转座因子研究提供了极大的方便。

### 2.1 功能基因挖掘

Guo 等<sup>[15]</sup>最先报道了铁皮石斛茎的转录组学研究成果, 经 454 GSFLX Titanium 高通量测序技术获得 553 084 条平均长度为 417 bp 的 EST, 拼接出 36 407 条独立基因, 其中 25 473 条独立基因获得注释, 并从中筛选出 25 个参与石斛碱合成的酶基因。搜索到参与石斛碱合成上游途径, 包括莽草酸途径、甲羟戊酸途径和酮酸/磷酸甘油酸途径的所有酶基因序列及可能参与生物碱合成下游反应的细胞色素 P450 (CYP450) 基因 93 条、氨基转移酶基因 25 条、甲基转移酶基因 122 条, 参与生物碱转运的多药耐药蛋白基因 11 条, 参与生物碱合成调控的转录因子序列 964 条。He 等<sup>[16]</sup>对 4 个生长阶段的铁皮石斛茎 (S1/S2/S3/S4) 进行数字基因表达谱分析, 获得 21 426 个差异表达基因 (DEGs), 其中 110 个与糖类代谢相关。Zhang 等<sup>[17]</sup>从铁皮石斛转录组中筛选出 135 个参与果糖、甘露糖代谢相关基因、430 个糖基转移酶基因、89 个纤维素合成酶基因, 其中 170 个差异表达的糖基转移酶基因, 37 个差异表达的纤维素合成酶基因及 627 个 DEGs 编码的转录因子在铁皮石斛甘露聚糖合成中起重要作用。Shen 等<sup>[18]</sup>注释了果糖、甘露糖代谢酶相关 Unigenes 及石斛碱生物合成上游元件相关 Unigenes, 并鉴定出 35 个糖基转移酶候选基因和 49 个 P450 候选基因。伊秀娟<sup>[19]</sup>对铁皮石斛叶进行转录组测序, 获得 64 195 个独立基因, 7 177 个差异表达基因中 3 155 个表达上调, 4 022 个表达下调, 并筛选出参与黄酮类合成相关的酶 13 种, 这些酶受 46 条 Unigene 控制。

### 2.2 发育机制研究

吴超等<sup>[20]</sup>利用 Illumina HiSeq2000 高通量测序技术研究了铁皮石斛发育机制, 共获得 121 596 个独立基因, 并对其中 52 345 个基因进行功能注释, 涉及核苷酸代谢、萜类与多酚生物合成与代谢、多糖生物合成与代谢、脂类代谢、碳水化合物代谢 5 大类 20 小类 128 个代谢途径分支, 在功能上分属生

物过程、细胞组分和分子功能 3 大类 57 个分支,可归为复制、重组和修复、转录、翻译、核糖体结构和生物合成等 25 类直系同源蛋白。Wu 等<sup>[21]</sup>利用转录组学和代谢组学技术揭示了铁皮石斛幼苗生长过程中低温驯化的响应机制。Chen 等<sup>[22]</sup>通过比较转录组学和蛋白质组学分析认为,在种子萌发的早期阶段,共生萌发与非共生萌发有着共同的信号通路,有 32 种蛋白在 2 种萌发方式中表达水平一致,但真菌能改变宿主植物的代谢,提高或提早了与碳水化合物、脂代谢及激素代谢相关基因的表达,从而促进石斛种子萌发,有 308 种蛋白在非共生和共生萌发的 3 个发育阶段有不同表达。阎波等<sup>[23]</sup>基于铁皮石斛基因组和转录组数据在 88 个铁皮石斛 ABC 转运蛋白中筛选出在铁皮石斛种子萌发及与微生物相互作用中参与脱落酸、生长素等激素运输的 ABCG-PDR 基因和 ABCB11 基因各 2 个。

### 2.3 分子标记开发

简单重复序列(SSR)分子标记分为基因组 SSR 和表达序列标签(EST)-SSR,从基因组开发 SSR 标记步骤复杂,有诸多不便,虽有谢明璐等<sup>[24]</sup>多位研究者开发过铁皮石斛基因组 SSR 标记,但至今在 NCBI 上登录的 SSR 数量仍很少,而从 EST 开发 SSR 标记可以找到大量的 SSR 位点,不仅降低了成本还显著提高了现有转录组测序数据的利用效率。Guo 等<sup>[15]</sup>对铁皮石斛转录组数据进行 SSRs 特征分析,发现分布于 961 条不同序列的 1 063 个 SSR 位点,其中含有 1 个以上 SSR 位点的序列 69 条,含有混合型 SSR 基原的序列 38 条。吴超等<sup>[20]</sup>从铁皮石斛 Unigene 中检测到 9 892 个 SSR 位点。该研究发现铁皮石斛 SSR 重复基序类型中 AG/CT 重复基元出现的频率最高,与 Guo 等<sup>[15]</sup>的研究结论相似。李聪<sup>[25]</sup>鉴定 7 218 条 SSR 重复序列,其中含有 1 个以上 SSR 位点的序列 712 条,含有混合型 SSR 基原的序列 260 条。同时其还对转录组数据进行 SNP 分析,共发现 119 701 个位点,其中 68 233 个位点发生碱基转换,A-G 和 C-T 的置换频率相近,另有 51 468 个位点发生碱基颠换,A-C、A-T、C-G 和 G-T 的颠换频率也较为接近。

### 2.4 非编码区域(ncRNA)研究

大规模转录组测序后,大量的 ncRNA 如对基因表达和生长发育起重要调节功能的 miRNA 陆续被发现。Meng 等<sup>[26]</sup>测定了铁皮石斛花、叶、茎和根的 RNA 序列,鉴定出在上述器官中高度表达的

转录本、特异性累积的 sRNA 和潜在的 miRNA 前体,鉴定出 1 257 个 miRNA 靶基因。Yang 等<sup>[27]</sup>比较了常规和微繁殖铁皮石斛 miRNA 表达谱,其中 6 个家族,45 条 miRNA 有不同表达,包括 5 个上调家族(MIR156、MIR164、MIR171、MIR827 和 MIR529)和 1 个下调家族(MIR167),这些差异表达的 miRNA 主要与激素刺激反应、生物和代谢过程调节、细胞内细胞器的形成和核酸结合等有关。

### 2.5 转座因子研究

转座因子普遍存在于真核生物基因组中,能插入到基因或基因调控元件中影响基因的功能或触发染色体重排。李聪<sup>[25]</sup>在铁皮石斛转录组中发现 203 条转座因子相关序列,其中 72 条为反转录转座子,包括 30 条 Ty1-copia 类和 16 条 Ty3-gypsy 类反转录转座子。并从铁皮石斛中扩增到 43 条具有较高异质性(可能由缺失突变、移码突变及终止密码子突变引起)的 Ty1-copia 类反转录转座子转座酶(RT)序列,分析认为序列中含有与低温、热、光、生长调节剂等胁迫作用相关的调控元件。随后的研究表明,经 ABA 诱导或冷胁迫处理后 Ty1-copia RT 序列中相关调控元件明显增加<sup>[28-29]</sup>。

## 3 铁皮石斛功能基因克隆

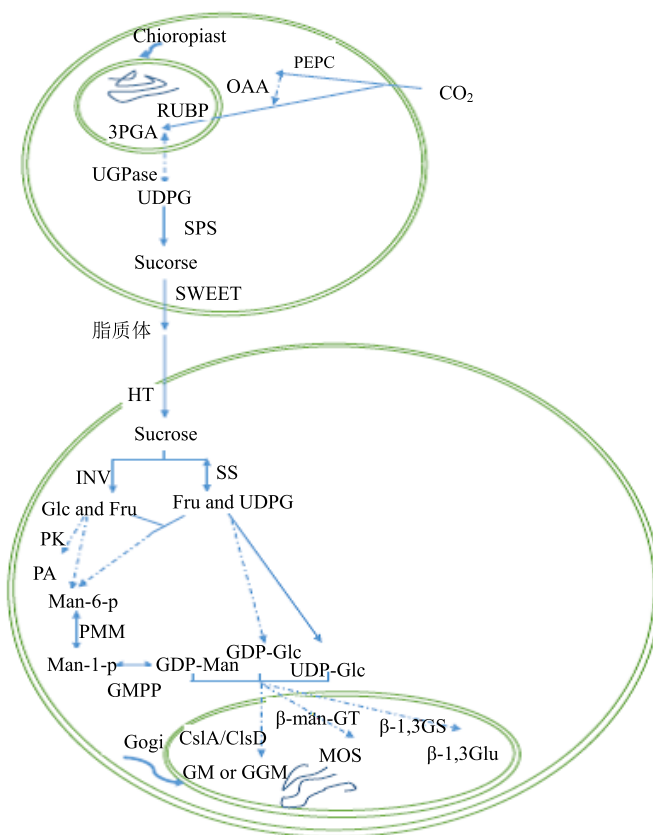
铁皮石斛功能基因克隆虽然起步较晚,但近年来发展迅速,分离鉴定的功能基因快速增长,主要涉及活性成分基因、生长发育调控基因及抗逆基因等。

### 3.1 活性成分相关基因克隆

**3.1.1 多糖合成基因** 多糖是铁皮石斛的主要药用成分,其合成与积累机制还未被完全解析,目前仅了解光合碳同化、蔗糖合成与转运、多糖合成途径的部分机制(图 1)。

铁皮石斛为兼性景天酸代谢途径(CAM)植物,CAM 途径在晴天表现得更加明显<sup>[30]</sup>。据测定 CAM 途径的源头关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 DoPEPC 在 F 型铁皮石斛中的表达量为 H 型的 5.55 倍,与 F 型、H 型铁皮石斛的多糖含量差异相吻合<sup>[31-32]</sup>。阴雨天,铁皮石斛呈 C3 途径,该途径的关键酶核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活化酶(RCA)基因 DoRCA 的表达有昼夜节律性,具明显的光诱导表达特性<sup>[33]</sup>,DoRCA2 包含 P-loop NTPase 超家族基因结构,编码亲水性蛋白,在中间代谢起重要作用<sup>[34]</sup>。

铁皮石斛光合作用生成的葡萄糖在细胞质中转化为尿苷三磷酸(UTP)后经尿苷二磷酸葡萄糖焦



PEPC-磷酸烯醇式丙酮羧化酶 RCA-核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活化酶 UGPase-尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 SPS-蔗糖磷酸合成酶 SWEET-糖转运最终输出蛋白 HT-己糖转运蛋白 INV-蔗糖转化酶 SS-蔗糖合成酶 PK-丙酮酸激酶 PMM-甘露糖变位酶 GMPP-GDP-甘露糖焦磷酸化酶 CslA/CslD-纤维素合成酶 A/纤维素合成酶 D β-1,3Glu-β-1,3-葡聚糖合成酶 β-man-GT-β型甘露糖基转移酶 PEPC-phosphoenolpyruvate carboxylase RCA-Ru Bis CO activase UGPase-UDP-glucose pyrophosphorylase SPS-sucrose phosphate synthase SWEET-sugars will eventually be exported transporters HT-hexose transporter INV-invertase SS-sucrose synthase PK-pyruvate kinase PMM-phosphomannomutase GMPP-GDP-D-mannose pyrophosphorylase CslA/CslD-cellulose-synthase-like protein A/cellulose-synthase-like protein D β-1,3Glu-β-1,3-glucan synthetase β-man-GT-β-mannose glycosyl transferase

图1 铁皮石斛多糖代谢部分机制

Fig. 1 Partial mechanism of polysaccharide metabolism of *D. officinalis*

磷酸化酶催化生成尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG),该酶基因UGPase偏好使用A/T结尾的密码子,在根、茎中的表达要远高于叶,但随着植株的老化表达减弱,添加蔗糖能促进其转录,是铁皮石斛优质育种的潜在靶标<sup>[35-37]</sup>。在细胞质中,UDPG在蔗糖磷酸合成酶(SPS)作用下合成蔗糖,DoSPS基因的编码蛋白为非跨膜结构的亲水不稳定蛋白,含有蔗糖合成及糖基转移功能域<sup>[38]</sup>。

蔗糖合成后,经共质体和质外体被运输到铁皮石斛茎部进行多糖合成,蔗糖的跨膜转运受糖最终输出蛋白和己糖转运蛋白的调节。张岗等<sup>[39]</sup>克隆了调控糖从韧皮薄壁细胞转运到胞外的糖最终输出蛋白基因DoSWEET1,该基因的表达能被共生真菌(胶膜菌)强烈诱导,在石斛种子共生萌发中可为共生真菌提供糖分养料。李依民等<sup>[40]</sup>克隆了铁皮石斛

调控糖从质外体转运到胞内的己糖转运蛋白基因DoHT1,该基因的表达具有组织特异性,在石斛叶和茎中的表达量分别为根中的19.36倍和1.82倍。He等<sup>[41]</sup>检测到糖最终输出转运蛋白DoSWEET4基因和糖转运蛋白DoSUT1基因在茎中显著表达,可能参与糖在韧皮部的转运。

蔗糖被转运到铁皮石斛茎部后,可在蔗糖合成酶(SS)作用下降解成葡萄糖和尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG),也可在转化酶(INV)的催化下不可逆地降解成葡萄糖和果糖,为多糖合成提供前体。孟衡玲等<sup>[42]</sup>克隆了铁皮石斛蔗糖合成酶基因DoSS,并在大肠杆菌中表达。铁皮石斛转化酶(INV)包括可溶性酸性转化酶(SAI)和中性/碱性转化酶(NI),DoSAI的表达具有时空差异<sup>[43]</sup>,DoNI1、DoNI2基因在铁皮石斛茎中的表达量与多糖含量、DoNI酶活性呈正相

关<sup>[44-45]</sup>。INV 的活性受转化酶抑制子 (InvInh) 调节, 时空研究表明, DoInvInh1 和 DoInvInh3 在铁皮石斛 1 年生茎中表达量最高, DoInvInh2 在 2 年生茎中表达量最高, DoInvInh2 和 DoInvInh3 在根中表达量最低, 而在花中表达量最高<sup>[46]</sup>。蔗糖降解得到的葡萄糖除一部分进行糖酵解途径外<sup>[47]</sup>, 其余的葡萄糖和果糖被转化为甘露糖-6-磷酸, 再在甘露糖变位酶 (PMM) 作用下转化为甘露糖-1-磷酸, 然后被 GDP-甘露糖焦磷酸化酶 (GMPP) 活化成 GDP-甘露糖。研究发现, DoPMM 基因上游调控区内含有 ABRE、HSE、LTR 等多个响应非生物逆境的顺式作用元件, 调控富含甘露糖的多糖的生物合成, 并与种子萌发与植株生长过程中的抗逆性有关<sup>[48]</sup>, 而铁皮石斛 DoGMPP 基因的编码蛋白没有跨膜区域, 不具跨膜功能<sup>[49]</sup>。蔗糖在 SS 作用下产生的 UDPG, 则可能被活化为 GDP-葡萄糖或 GDP-半乳糖。3 种活化己糖进入高尔基体后进行多糖合成, Yu 等<sup>[50]</sup>从铁皮石斛转录组数据库中筛选出 3 个均有 GDP-甘露糖结合位点 GXL/VNK motif 的甘露糖转运蛋白家族成员基因 DoGMT1、DoGMT2、DoGMT3, 其表达与多糖的积累有良好的相关性, 均有转运 GDP-甘露糖的能力, 可将 GDP-甘露糖从细胞质中转运到高尔基体中合成甘露聚糖。

多糖结构复杂, 其合成包括不同核苷糖的相互转换及在糖基转移酶的催化下完成糖链上单糖的添

加。何春梅等<sup>[49]</sup>认为  $\beta$ -甘露糖基转移酶 ( $\beta$ -mannanase) 以 GDP-甘露糖为底物合成  $\beta$ -甘露聚糖, 并对该酶基因进行克隆与功能分析。Zhang 等<sup>[11]</sup>研究了铁皮石斛主要药用多糖葡甘露聚糖和半乳葡甘露聚糖的合成, 认为其合成酶类似于拟南芥纤维素合成酶 (CSLA) 进行糖基转移, 基于数字基因表达谱技术分析, 已克隆到的 8 个 DoCSLA 在不同生长阶段和不同器官中表达水平互有差异, 其中 DoCSLA1-4,6,8 在 S2 (10 月龄苗) 中, DoCSLA5,7 在 S3 (12 月龄苗) 中最高表达水平。DoCSLA1 在根中、DoCSLA2 在叶中、DoCSLA3-4、DoCSLA6-8 在茎中丰度最高<sup>[16]</sup>。张春柳等<sup>[51]</sup>克隆了调控铁皮石斛多糖 (果胶) 及葡糖醛酸木聚糖生物合成的糖基转移酶基因 DoGAUT1 和 DoPGSIP6, 发现 DoGAUT1 的表达符合多糖的积累规律, 而 DoPGSIP6 的表达与胞外多糖的合成相关, 可保护铁皮石斛免受低温的伤害, 而宋爽<sup>[52]</sup>则认为  $\beta$ -1,3-葡聚糖合成酶 ( $\beta$ -1,3-Glu) 能以葡聚糖为底物, 添加活化葡萄糖合成  $\beta$ -1,3-葡聚糖, 并克隆出  $\beta$ -1,3-葡聚糖合成酶基因序列。上述研究表明, 铁皮石斛多糖的合成是一个复杂的过程, 还需要进行更加深入地研究。

**3.1.2 石斛碱合成基因** 铁皮石斛中生物碱含量低、种类少,多属倍半萜类生物碱或萜类吲哚生物碱<sup>[15]</sup>,目前其上游生物合成研究,即萜类合成过程的相关研究较多(图2)。

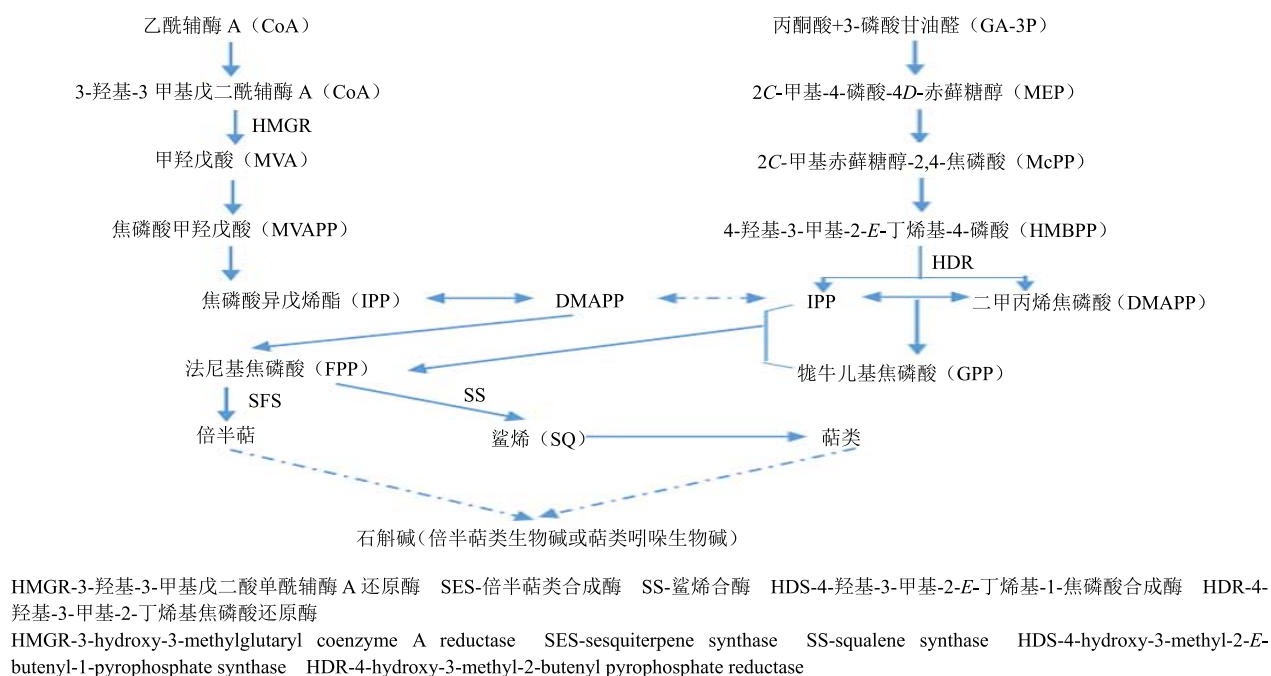


图2 铁皮石斛上游生物合成过程中萜类合成

**Fig. 2** Terpenes synthesis in upstream biosynthesis of *D. officinalis*

铁皮石斛中生物碱合成过程中, 倍半萜骨架可通过位于细胞质中的甲羟戊酸 (MVA) 途径, 如倍半萜、三萜, 或位于质体中的 2C-甲基-4-磷酸-4D-赤藓糖醇 (MEP) 途径合成, 如单萜、双萜、四聚类萜烯, 但二者并非孤立存在, 可共同提供合成前体异戊烯焦磷酸 (IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (DMAPP)<sup>[53]</sup>。3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 是 MVA 途径首个限速关键酶, 催化羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMG-CoA) 生成 MVA, 铁皮石斛 DoHMGR1 基因编码蛋白含 4 个保守结构域和 2 个跨膜基序, 在根和茎中有较高表达<sup>[54]</sup>。倍半萜类合成酶 (SES) 直接催化法尼基焦磷酸 (FPP) 环化或重排生成倍半萜骨架, 铁皮石斛 DoSES 基因编码 552 个氨基酸, 属 TPSa 亚家族, 无信号肽, 在茎、叶、花中的表达量均高于对照 (原球茎), 添加茉莉酸甲酯 (MeJA) 24 h 后基因表达量比对照提高了 19 倍<sup>[55]</sup>。4-羟基-3-甲基-2-E-丁烯基-1-焦磷酸合成酶 (HDS) 是 MEP 途径中催化 2C-甲基赤藓糖醇-2,4-环焦磷酸 (McPP) 生成 4-羟基-3-甲基-2-E-丁烯基-4-磷酸的限速酶, 铁皮石斛 DoHDS 基因编码 745 个氨基酸, 属 gcpE 蛋白家族, 在茎中表达量最高<sup>[56]</sup>。4-羟基-3-甲基-2-丁烯基焦磷酸还原酶 (HDR) 是 MEP 途径上最后一个关键酶, 催化 4-羟基-3-甲基-2-丁烯基焦磷酸 (HMBPP) 生成 IPP 和 DMAPP, 铁皮石斛 DoHDR 基因蛋白无跨膜结构和信号肽, 受脱落酸 (ABA)、水杨酸 (SA)、尖孢镰刀菌诱导子等信号分子诱导时呈现出短时间内显著升高然后下降的趋势<sup>[57-58]</sup>。鲨烯合酶基因 (SS) 是 FPP 生成鲨烯的关键酶, 铁皮石斛 DoSS 基因编码蛋白的 44~315 位氨基酸含有鲨烯/八氢番茄红素合成酶保守结构域及 6 个由 14~23 个氨基酸组成的保守肽段、蛋白激酶 C 磷酸化、N-豆蔻酰化和 ATP/GTP 结合位点, 根中的相对表达量为叶的 12.41 倍<sup>[59]</sup>。

**3.1.3 黄酮类合成基因** 铁皮石斛黄酮类成分主要包括柚皮素及黄酮碳苷类化合物<sup>[60-61]</sup>, 黄酮类化合物的生物合成是目前研究最清楚的次生代谢途径之一, 但对铁皮石斛黄酮类化合物合成途径研究不多, 仅见姚瑶从铁皮石斛中克隆了苯丙氨酸解氨酶基因 DcPAL, 并在大肠杆菌中进行高效表达<sup>[62]</sup>。孟衡玲等<sup>[63]</sup>克隆了铁皮石斛黄酮类物质合成的第 1 个关键酶查耳酮合成酶基因 DoCHS, 分析认为 DoCHS 在铁皮石斛生长发育早期主要参与生长激素和器官形

态建成, 随着植株的成熟, 主要参与黄酮类化合物的合成。伊秀娟<sup>[19]</sup>依据转录组测序结果, 重点克隆控制黄酮类化合物生物合成的查耳酮合成酶 (CHS)、黄烷酮-3-加氧酶 (F3H) 和二氢黄酮醇-4-还原酶 (DFR) 3 个关键酶基因的表达, 研究表明, 紫色植株的表达量高于普通植株, 同一植株中叶的表达量高于茎, 而在原球茎和组培苗中的表达量较少。

### 3.2 生长发育相关基因克隆

铁皮石斛的生长发育在分子水平受多种因素的调控, 如转录因子、钙依赖蛋白激酶、类受体激酶等。目前研究较多的转录因子包括 WRKY 类和 NAC 类, WRKY 类转录因子在植物生长发育、非生物信号刺激、病原体防御反应以及生物碱合成都发挥重要作用。铁皮石斛 DoWRKY1 的编码蛋白具有转录激活功能, 可激活下游报告基因表达<sup>[64]</sup>, DoWRKY2 在叶中表达量最高, 二者均可被茉莉酸甲酯 (MeJA) 和壳聚糖诱导表达<sup>[65]</sup>。DoWRKY3 在石斛根表达量最高<sup>[66]</sup>, DoWRKY5 均可被低温、ABA、蔗糖胁迫诱导表达, 在铁皮石斛应答胁迫中起调控作用<sup>[67]</sup>, DoWRKY6 在茎中表达量远高于根, 达 16.8 倍, 编码蛋白有较强的转录调控作用<sup>[68]</sup>。He 等<sup>[69]</sup>从全基因组水平鉴定到 63 个铁皮石斛 WRKY 转录因子, 大部分 DoWRKYs 启动子序列富含 ABA 响应元件和低温诱导元件, 部分 DoWRKYs 可被低温诱导, 部分靶基因与乙烯合成途径、抗坏血酸合成途径等逆境胁迫响应有关或者与多糖合成相关。NAC 类转录因子对分生组织形成、抑制细胞分裂、逆境抑制反应等具有重要作用。铁皮石斛 DoNAC 在体胚发育和原球茎的产生中发挥作用<sup>[70]</sup>, 家族成员数量众多, 各成员之间在功能上具有冗余性<sup>[71]</sup>。朱乾坤<sup>[72]</sup>克隆到 34 条 DoNAC, 其表达具有组织特异性, 崔毅慧<sup>[73]</sup>从克隆到的 31 条 DoNAC 筛选出 9 条基因进行功能分析, 其中 5 条具有转录激活作用, 而 DeNAC23 在分生组织形成期表达最高, 但不具有转录激活作用。

在从枝菌根、根瘤菌-宿主植物共生体系中,  $\text{Ca}^{2+}$  信号途径具有核心作用, 而  $\text{Ca}^{2+}$  的信号感应与传导有赖于钙依赖蛋白激酶 (CDPKs)、促分裂原活化蛋白激酶 (MAPKs)、钙网蛋白 (CRTs)、类钙调磷酸酶 B 蛋白 (CBLs) 及其级联途径的调控。CDPKs 通过识别并传递  $\text{Ca}^{2+}$  信号进而调控植物生长发育、逆境胁迫、细胞分化与凋亡等。盛况等<sup>[74-75]</sup>从铁皮石斛叶中克隆的 DoCDPK1、DoCDPK2、

DoCDPK6 基因主要表达场所在叶片,低温和高盐、ABA 胁迫下可被诱导表达,DoCDPK6 基因上游序列含有 TAAT-box 和 CAAT-box 等核心启动子元件以及光、温、BHA、ABA 等逆境信号响应元件。汪园等<sup>[76]</sup>利用 5'端缺失和 GUS 基因的融合表达研究了 DoCDPK8 基因启动子序列,推测 ABA 响应元件 (ARE) 对外源 ABA 的响应起正调控作用,而 MeJA 顺式作用元件对外源茉莉酸甲酯响应起抑制作用。张岗等<sup>[77]</sup>从铁皮石斛菌根中克隆到 DoCPK1 基因,赵明明等<sup>[78]</sup>克隆到 DoCDPK1、DoCDPK32-like 基因,在共生萌发种子中均上调表达。随后,张岗等<sup>[79]</sup>又从铁皮石斛叶分离到 DoCPK2、DoCPK3、DoCPK2,在根和原球茎中表达量较高,可能与体细胞胚发育有关,但 DoCPK3 在种子和茎中表达量较低,可能通过特异模式参与生长发育的调控。MAPKs 通过对目标蛋白激酶、转录因子等磷酸化修饰,参与细胞分裂、分化调控。张岗等<sup>[80-82]</sup>和赵明明等<sup>[83]</sup>研究表明,铁皮石斛 DoMPK1 基因在小菇真菌侵染早期互作时显著上调,DoMPK2 基因可能与种子萌发有关,DoMPK4 基因可能与原球茎的生长有关,DoMPK5 基因受菌根真菌诱导表达。CRTs 主要参与调控植物生长发育、免疫反应和逆境胁迫,铁皮石斛钙网蛋白基因 DoCRT1 编码蛋白 N 端含有 1 个信号肽和 1 个跨膜区域,隶属 CRT1/2 分支,在铁皮石斛根中表达量较高<sup>[84]</sup>。CBLs 在互作蛋白激酶 (CIPKs) 调控下感应钙信号,李依民等<sup>[85]</sup>克隆到铁皮石斛 DoCIPK1、DoCIPK2、DoCIPK3 和 DoCIPK4 等基因,4 个基因编码蛋白结构一致,均含 1 个蛋白激酶结构域、1 个 NAF/FISL 结构域和多个功能基元,无信号肽或跨膜域,DoCIPK1 在根中表达量最低,DoCIPK3 主要在茎、根中表达,DoCIPK2 与 DoCIPK4 主要在根中表达。此外,镁离子转运蛋白 (MGT) 对  $Mg^{2+}$  的胞内外转运进行调控,铁皮石斛镁离子转运蛋白基因 DoMGT1 的编码蛋白含有 CorA 家族和 MRS2/LPE10 保守结构域,近 C 末端存在  $Mg^{2+}$  结合 GMN 基序和 2 个跨膜区。其起始密码子附近序列遵循 KOZOK 规则,在叶中相对表达量较高<sup>[86]</sup>。锌铁调控转运蛋白 (ZRT) 家族成员可介导  $Zn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  等的转运,铁皮石斛锌铁调控转运蛋白基因 DoZIP1 的编码蛋白有 ZIP 家族的保守结构域和多个基序,含信号肽和跨膜域,可能在石斛根中微量元素的转运中发挥作用<sup>[87]</sup>。

膜富亮氨酸重复序列类受体蛋白激酶 (LRR-RLK) 基因在植物体细胞胚胎发生中对细胞内外的信号转导起着重要的作用。王晓娟等<sup>[88]</sup>依据转录组测序数据克隆了铁皮石斛类受体激酶基因 DoSERK,通过预测 DoSERK 的理化性质、结构特征和功能,以及分析该基因的时空表达,认为 DoSERK 在铁皮石斛体胚发生和生长发育过程均有参与。

此外,赵明明等<sup>[89]</sup>克隆了铁皮石斛多胺生物合成的限速酶 S-腺苷酸脱羧酶基因 (DoSAMDC1),刘思思等<sup>[90]</sup>克隆了铁皮石斛赤霉素 (GA) 生物合成关键限速酶赤霉素 3-氧化酶基因 (DoGA3ox),阎波等<sup>[23]</sup>克隆的 ABCG-PDR 和 ABCB11 基因在种子接菌共生萌发中显著上调表达,在种子接菌共生萌发中可能参与多胺调控途径的信号应答,以及脱落酸、生长素等激素的运输。安红强等<sup>[91]</sup>克隆了铁皮石斛 DoEMB8 基因,该基因在原球茎不同发育时期表达量高且持续稳定,对铁皮石斛体细胞胚的发育起重要作用。李依民等<sup>[92]</sup>分离到 2 个 F 家族 ABC 转运蛋白基因 DoABCF1 和 DoABCF2,编码蛋白无信号肽或跨膜域,在叶中高度表达。铁皮石斛泛素结合酶基因 (DoUBC24) 在椭圆形原球茎、根端分生组织和类原球茎中表达量较高,主要参与调控原球茎发育及组织的形态建成<sup>[93]</sup>。

### 3.3 抗逆性相关基因克隆

野生铁皮石斛生长环境恶劣,北纬 30°是其自然分布与人工栽培的北缘,了解铁皮石斛对干旱、盐渍、极端温度等逆境胁迫响应机制,揭示其分子生理机制有利于抗逆性品种的选育,对资源的可持续利用与控制意义重大。

Chen 等<sup>[94]</sup>为探究甘露糖结合凝集素与病虫害抗性的关系,克隆了铁皮石斛甘露糖结合凝集素基因 (DoA),DoA 编码凝集素前体,在茎中表达量最高。铁皮石斛 HSP70 编码蛋白为存在于细胞质中的无跨膜区亲水蛋白,冷胁迫能诱导热激蛋白 HSP70 基因的表达,胁迫消除 48 h,表达量不降反而有一定的累积提高<sup>[95]</sup>。晚期胚胎发育富集蛋白 (LEA) 在逆境胁迫时诱导表达以提高植物对逆境胁迫的抵御和适应,凌鸿等<sup>[96]</sup>从盐胁迫处理的铁皮石斛苗中分离到 DoLEA2,盐胁迫时该基因表达量明显上调,原核表达耐盐实验表明,DoLEA2 蛋白的积累有效提高了重组菌的耐盐能力。蔗糖非酵解 I 型相关蛋白激酶 2 (SnRK2) 能够被高渗、干旱、低温等多种非生物胁迫所激活,铁皮石斛 DoSRK2E

可被 NaCl 胁迫和 ABA 激活,参与逆境胁迫应答<sup>[97]</sup>。泛素也是逆境胁迫产生的应答蛋白,能在逆境解除时对错误折叠的蛋白进行活化、标记,铁皮石斛多聚泛素蛋白基因 (DoUb1) 在干旱、温度胁迫下表达都低于正常状况,但随胁迫时间的延长,表达会缓慢升高<sup>[98]</sup>。过氧化氢酶 (CAT) 对植物生长发育和抗逆反应具有重要作用,目前已报道的植物 CAT 多属于典型过氧化氢酶,该酶通过调节胞内活性氧 (ROS) 稳态发挥作用。铁皮石斛 DoCAT1 基因编码蛋白隶属 CATs 分子进化树 Class III 分支,在根中特异表达,可能参与铁皮石斛根的生长发育调控或生理响应<sup>[99]</sup>。

铁皮石斛功能基因的研究还在不断推进之中,如硫氧还蛋白基因 (DoTrxL2)<sup>[100]</sup>、蛋白磷酸酶 2A 基因 (DoPP2A)<sup>[101]</sup>、蛋白磷酸酶基因 (DoPP2C1)<sup>[102]</sup> 等的克隆与表达分析也已见相关报道,相信随着研究的深入,将会取得越来越多的成果。

#### 4 展望

铁皮石斛具有十分可观的药用和经济价值,目前在铁皮石斛基因组学、转录组学和功能基因克隆、解析等方面已经取得了令人振奋的成果,但相较于拟南芥、水稻等模式植物而言,还有相当的差距,有待更全面、系统且深入地研究。笔者认为未来铁皮石斛核酸分子生物学的研究还需在以下 4 个方面深入研究:(1) 基因组测序工作的完成,使铁皮石斛基因组重测序及关联分析成为可能。通过不同个体的基因组测序,分析基因组间的结构差异,找到更多的 SNP,插入缺失位点 (InDel)、结构变异位点 (SV) 位点和拷贝数变异位点 (CNV)。(2) 开展大规模的基因功能分析。铁皮石斛基因组序列测定的完成可了解到编码某种蛋白激酶或转录因子的基因序列,但要了解基因在特定生物中的具体功能仅仅知道序列并不能给出具体相关过程的信息,需要通过基因表达连续分析法 (SAGE)、微阵列或 DNA 芯片法等对获得的基因进行大规模的功能分析。(3) 结合一代测序技术修正测序结果。由于利用二代技术进行测序,在制作测序文库时对待测片段的 PCR 扩增会增加序列的错误率,要获得准确的序列,还需结合一代技术对测序结果进行综合分析。(4) 功能基因的筛选、代谢调控机制等研究需进一步深化。功能基因的研究除基因克隆和表达分析外,更需充分利用 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术实施功能缺失型筛选策略,快速解析基因功能及基因间的

相互作用,通过编辑关键性状基因,以提高活性成分含量、改善抗逆性或调控生长周期等研究进度。

#### 参考文献

- [1] 孙恒,胡强,金航,等.铁皮石斛化学成分及药理活性研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(11):225-234.
- [2] Xue D W, Feng S G, Zhao H Y, et al. The linkage maps of *Dendrobium* species based on RAPD and SRAP markers [J]. *J Genet Genom*, 2010, 37(3): 197-204.
- [3] Feng S, Zhao H, Lu J, et al. Preliminary genetic linkage maps of Chinese herb *Dendrobium nobile* and *D. moniliforme* [J]. *J Gene*, 2013, 92(2): 205-212.
- [4] 鹿京华.基于 SSR 和 SRAP 分子标记的石斛兰遗传连锁图谱构建[D].武汉:华中农业大学,2016.
- [5] Lu J J, Zhao H Y, Suo N N, et al. Genetic linkage maps of *Dendrobium moniliforme* and *D. officinale*, based on EST-SSR, SRAP, ISSR and RAPD markers [J]. *Sci Hortic*, 2012, 137(1): 1-10.
- [6] 赵红燕.石斛分子遗传图谱的构建[D].杭州:杭州师范大学,2011.
- [7] Lu J J, Wang S, Zhao H et al. Genetic linkage map of EST-SSR and SRAP markers in the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. *Genet Mol Res*, 2012, 11(4): 4654-4667.
- [8] Lu J J, Liu Y, Xu J, et al. High-density genetic map construction and stem total polysaccharide content-related QTL exploration for Chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9(3): 398-408.
- [9] 江金兰,叶炜,李永清,等.同源四倍体铁皮石斛的生长及多糖积累[J].植物生理学报,2014,50(4): 519-526.
- [10] Yan L, Wang X, Liu H, et al. The genome of *Dendrobium officinale* illuminates the biology of the important traditional Chinese orchid herb [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(6): 922-934.
- [11] Zhang G, Xu Q, Bian C, et al. The *Dendrobium catenatum* Lindl. genome sequence provides insights into polysaccharide synthase, floral development and adaptive evolution [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): e19029.
- [12] Luo J, Hou B, Niu Z, et al. Comparative chloroplast genomes of photosynthetic orchids: Insights into evolution of the Orchidaceae and development of molecular markers for phylogenetic applications [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99016.
- [13] Yang P, Zhou H, Qian J, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Dendrobium officinale* [J]. *Mitochondrial DNA*, 2016, 27(2): 1262-1264.
- [14] Zhong Z, Zhang G, Lai X, et al. The complete chloroplast

- genome sequence of a new variety of *Dendrobium officinale* 'zhong ke IV hao' [J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2016, 1(1): 669-670.
- [15] Guo X, Li Y, Li C, *et al.* Analysis of the *Dendrobium officinale* transcriptome reveals putative alkaloid biosynthetic genes and genetic markers [J]. *Gene*, 2013, 527(1): 131-138.
- [16] He C, Zhang J, Liu X, *et al.* Identification of genes involved in biosynthesis of mannan polysaccharides in *Dendrobium officinale* by RNA-seq analysis [J]. *Plant Mol Biol*, 2015, 88(3): 219-231.
- [17] 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 [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7(2): e5.
- [18] 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 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(3): e187.
- [19] 伊秀娟. 基于转录组测序的石斛黄酮生物合成相关基因的克隆与表达分析 [D]. 上海: 上海师范大学, 2016.
- [20] 吴超, 彭娟, 向林, 等. 基于高通量测序的铁皮石斛叶片转录组分析 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(12): 3334-3346.
- [21] Wu Z, Jiang W, Chen S, *et al.* Insights from the cold transcriptome and metabolome of *Dendrobium officinale*: Global reprogramming of metabolic and gene regulation networks during cold acclimation [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7(11): e1653.
- [22] Chen J, Liu S, Kohler A, *et al.* iTRAQ and RNA-Seq analyses provide new insights into regulation mechanism of symbiotic germination of *Dendrobium officinale* seeds (Orchidaceae) [J]. *J Proteome Res*, 2017, 16(6): 2174-2187.
- [23] 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 [J]. 药学学报, 2018, 53(7): 1177-1189.
- [24] 谢明璐, 侯北伟, 韩丽, 等. 珍稀铁皮石斛 SSR 标记的开发及种质纯度鉴定 [J]. 药理学学报, 2010, 45(5): 667-672.
- [25] 李聪. 冷胁迫下铁皮石斛转录组及 *Ty1-copia* 类反转录转座子表达分析 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2014.
- [26] Meng Y, Yu D, Xue J, *et al.* A transcriptome-wide, organ-specific regulatory map of *Dendrobium officinale*, an important traditional Chinese orchid herb [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): e18864.
- [27] Yang Z, Yang D, Ding X, *et al.* MicroRNA expression profiles in conventional and micropropagated *Dendrobium officinale* [J]. *Genes Genom*, 2015, 37(4): 315-325.
- [28] 李聪, 斯金平, 高燕会, 等. 铁皮石斛 *Ty1-copia* 类反转录转座子反转录酶 (RT) 序列的克隆与分析 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(2): 209-215.
- [29] 李聪, 斯金平, 高燕会, 等. 脱落酸对铁皮石斛 *Ty1-copia* 类反转录转座子转录活性的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(10): 1788-1794.
- [30] 苏文华, 张光飞. 铁皮石斛叶片光合作用的碳代谢途径 [J]. 植物生态学报, 2003, 27(5): 631-637.
- [31] 曾淑华, 文国松, 徐绍忠, 等. 铁皮石斛磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 766-771.
- [32] 张治国, 俞巧仙, 叶智根. 名贵中药—铁皮石斛 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2006.
- [33] 崔波, 王洁琼, 宋彩霞, 等. 铁皮石斛 *DoRCA* 基因的克隆及表达分析 [J]. 西北植物学报, 2016, 36(1): 23-29.
- [34] 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 [J]. 广西植物, 2017, 37(1): 80-86.
- [35] 吕楠. 铁皮石斛 *UGPase* 基因克隆表达分析及部分 *MYB* 基因家族分子克隆与温度胁迫分析 [D]. 成都: 西南交通大学, 2013.
- [36] 孙晶, 何涛, 万闰兰, 等. 铁皮石斛尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因 (*UGP*) 的密码子偏好性分析 [J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(5): 759-766.
- [37] Wan R, Sun J, He T, *et al.* Cloning cDNA and functional characterization of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Dendrobium officinale* [J]. *Biol Plant*, 2017, 61(1): 147-154.
- [38] 孟衡玲, 杨生超, 查应洪, 等. 铁皮石斛蔗糖磷酸合成酶基因的克隆与原核表达 [J]. 西北植物学报, 2013, 33(4): 692-696.
- [39] 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 [J]. 药学学报, 2016, 51(6): 991-997.
- [40] 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 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(6): 1124-1130.
- [41] He L, Fu S, Xu Z, *et al.* Hybrid sequencing of full-length cDNA transcripts of stems and leaves in *Dendrobium officinale* [J]. *Genes*, 2017, 8(10): e257.
- [42] 孟衡玲, 段承俐, 萧凤回, 等. 铁皮石斛蔗糖合成酶基因的克隆及表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(7): 833-837.
- [43] 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 [J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(2): 81-85.
- [44] Gao F, Cao X, Si J, *et al.* Characterization of the alkaline/neutral invertase gene in *Dendrobium officinale*

- and its relationship with polysaccharide accumulation [J]. *Gene Mol Res*, 2016, 15(2): e15027647.
- [45] 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 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3659-3666.
- [46] 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 [J]. 生物技术通报, 2018, 34(1): 129-136.
- [47] 张琳, 蔡茜, 张大为, 等. 铁皮石斛丙酮酸激酶基因的克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 990-995.
- [48] He C, Zeng S, Teixeira da Silva J A, et al. Molecular cloning and functional analysis of the phosphomannomutase (PMM) gene from *Dendrobium officinale* and evidence for the involvement of an abiotic stress response during germination [J]. *Protoplasma*, 2017, 254(4): 1693-1704.
- [49] 何春梅, 张建霞, 王聪, 等. 铁皮石斛多糖合成相关基因的克隆 [A] // 生态文明建设中的植物学: 现在与未来—中国植物学会第十五届会员代表大会暨八十周年学术年会论文集 [C]. 南昌: 中国植物学会, 2013.
- [50] Yu Z, He C, Teixeira da Silva J A, et al. The GDP-mannose transporter gene (DoGMT) from *Dendrobium officinale* is critical for mannan biosynthesis in plant growth and development [J]. *Plant Sci*, 2018, 277(12): 43-54.
- [51] 张春柳, 赖钟雄. 铁皮石斛原球茎 DoGAUT1 和 DoPGSIP6 基因的克隆及其在不同昼夜温差下的表达分析 [J]. 热带作物学报, 2015, 36(2): 456-465.
- [52] 宋爽. 铁皮石斛糖基转移酶基因分析及  $\beta$ -1,3 葡聚糖合成酶基因的克隆 [D]. 昆明: 云南农业大学, 2016.
- [53] Lange B M, Ahkami A. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes-current status and future opportunities [J]. *Plant Biotechnol J*, 2012, 11(2): 169-196.
- [54] 张琳, 王继涛, 张大为, 等. 珍稀濒危药用铁皮石斛 HMGR 基因的克隆和特征分析 [J]. 药学学报, 2014, 49(3): 411-418.
- [55] 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 [J]. 中草药, 2017, 48(23): 4963-4969.
- [56] 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 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 803-809.
- [57] 吴秋菊, 武梅娟, 王翔铁, 等. 铁皮石斛 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因的克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 405-411.
- [58] 林艳君, 赖钟雄. 铁皮石斛 HDR 基因克隆及真菌诱导子对其表达和生物碱含量的影响 [J]. 热带作物学报, 2015, 36(4): 680-686.
- [59] 张岗, 唐志书, 周莉英. 铁皮石斛鲨烯合酶基因的克隆及其组织表达模式分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(9): 151-158.
- [60] 李燕. 铁皮石斛化学成分的研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 中国医学科学院, 2009.
- [61] 周桂芬, 吕圭源. 基于高效液相色谱-二极管阵列光谱检测-电喷雾离子化质谱联用鉴定铁皮石斛叶中 8 种黄酮碳苷化合物及裂解规律研究 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(1): 13-18.
- [62] 姚瑶. 石斛苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及表达分析 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- [63] 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 [J]. 南方农业学报, 2016, 47(12): 2015-2019.
- [64] 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.
- [65] 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.
- [66] 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 [J]. 中草药, 2017, 48(14): 2930-2936.
- [67] 蒋园, 朱玉球, 高燕会, 等. 铁皮石斛 WRKY5 基因的克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 301-308.
- [68] 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 [J]. 现代生物医学进展, 2017(4): 615-619.
- [69] He C, Teixeira da Silva J A, Tan J, et al. A genome-wide identification of the WRKY family genes and a survey of potential WRKY target genes in *Dendrobium officinale* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): e9200.
- [70] Zhao P, Wang W, Sun M. Characterization and expression pattern analysis of DcNAC gene in somatic embryos of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 2011, 107(10): 151.
- [71] 丁懿. NAC 家族对铁皮石斛原球茎发生的机理研究与 PIN 的生物信息学分析 [D]. 成都: 西南交通大学, 2012.
- [72] 朱乾坤. AtNAC1 转录因子的分子建模和铁皮石斛 NAC 家族基因的克隆及表达分析 [D]. 成都: 西南交通大学, 2011.
- [73] 崔毅慧. 铁皮石斛体胚发育及其 NAC 家族基因克隆与特性分析 [D]. 成都: 西南交通大学, 2013.
- [74] 盛况, 高燕会, 斯金平, 等. 铁皮石斛 DoCDPK 基因的克隆与表达分析 [J]. 园艺学报, 2016, 43(12): 2412-2422.
- [75] 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 [J]. 农业生物技术学

- 报, 2017, 25(4): 588-598.
- [76] 汪 园, 高燕会, 朱玉球, 等. 铁皮石斛 *DcCDPK8* 基因启动子克隆及功能分析 [J]. 中国中药杂志, doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20181106.005.
- [77] 张 岗, 赵明明, 李 标, 等. 一个受菌根真菌诱导的铁皮石斛钙依赖蛋白激酶基因的克隆及表达分析 [J]. 药学学报, 2012, 47(11): 1548-1554.
- [78] 赵明明, 郭顺星. 两条受菌根真菌诱导的铁皮石斛 *CDPK* 基因的克隆及特征分析 [A] // 第十六届中国科协年会一分 2 东南亚生物多样性保护和利用国际论坛论文集 [C]. 昆明: 中国科协, 2014.
- [79] 张 岗, 赵明明, 张大为, 等. 铁皮石斛钙依赖蛋白激酶基因的分子克隆及特征分析 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(12): 958-964.
- [80] 张 岗, 赵明明, 宋 超, 等. 铁皮石斛促分裂原活化蛋白激酶基因 *DoMPK* 的克隆及特征分析 [J]. 药学学报, 2012, 47(12): 1703-1709.
- [81] 张 岗, 张大为, 赵明明, 等. 铁皮石斛促分裂原活化蛋白激酶基因 *DoMPK2* 的分子特征 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(19): 1654-1659.
- [82] 张 岗, 李依民, 胡本祥, 等. 铁皮石斛促分裂原活化蛋白激酶基因 *DoMPK4* 的分离和差异表达分析 [J]. 药学学报, 2014, 49(7): 1076-1083.
- [83] 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 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(2): 509-512.
- [84] 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 [J]. 西北植物学报, 2017, 37(12): 2350-2356.
- [85] 李依民, 张 娜, 沈霞珍, 等. 稀药用铁皮石斛 4 个 *CIPKs* 基因的鉴定与表达分析 [J]. 药学学报, 2018, 53(2): 304-312.
- [86] 张 岗, 翟清华, 张大为. 铁皮石斛镁离子转运蛋白基因的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3443-3448.
- [87] 张 岗, 李依民, 李 标, 等. 铁皮石斛锌铁调控转运蛋白基因的克隆与表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 42-47.
- [88] 王晓娟, 张建霞, 何春梅, 等. 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 [J]. 热带亚热带植物学报, 2015, 23(5): 518-526.
- [89] 赵明明, 张 岗, 张大为, 等. 铁皮石斛 *S*-腺苷酸脱羧酶基因 *DoSAMDC1* 的克隆及特征分析 [J]. 药学学报, 2013, 48(6): 946-952.
- [90] 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 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 990-996.
- [91] 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 [J]. 生物学杂志, 2017, 34(4): 1-5.
- [92] 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 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3153-3159.
- [93] 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 [J]. 生物技术通讯, 2016, 27(5): 643-648.
- [94] Chen Z, Sun X, Tang K. Molecular cloning and characterization of a mannose-binding lectin gene from *Dendrobium officinale* [J]. *J Plant Biochem Biotech*, 2005, 14(1): 33-36.
- [95] 李东宾, 高燕会, 斯金平, 等. 铁皮石斛 *HSP70* 基因的克隆及冷胁迫表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3446-3452.
- [96] 凌 鸿, 曾 旭, 郭顺星. 铁皮石斛 *DoLEA2* 基因的克隆、表达及功能分析 [J]. 药学学报, 2017, 52(8): 1337-1344.
- [97] 张明英, 李依民, 高 静, 等. 铁皮石斛 *DoSRK2E* 基因的克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 4960-4966.
- [98] 裴 薇, 梁 易, 范 静, 等. 铁皮石斛多聚泛素基因 *Polyubiquitin1 (DoUb1)* 的克隆及表达分析 [J]. 生物学杂志, 2017, 34(3): 6-10.
- [99] 李 欢, 陈 莹, 黑小斌, 等. 铁皮石斛过氧化氢酶基因 *DoCAT1* 的鉴定与表达分析 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53(17): 1447-1452.
- [100] 范 静, 毛 欢, 刘楚琪, 等. 铁皮石斛硫氧还蛋白基因 (*DoTrxL2*) 的克隆及表达分析 [J]. 生物学杂志, 2018, 35(5): 18-22.
- [101] 刘亮亮, 张 娜, 黑小斌, 等. 铁皮石斛蛋白磷酸酶 2A 基因的分子克隆研究 [J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(9): 62-68.
- [102] 张 娜, 刘亮亮, 李 欢, 等. 铁皮石斛蛋白磷酸酶 *DoPP2C1* 基因的克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1661-1666.