

## 铁皮石斛 *DoUGT83A1* 基因克隆及表达特性分析

张逸群<sup>1</sup>, 陈家栋<sup>2\*</sup>, 宋敏全<sup>3</sup>, 姜武<sup>2</sup>, 刘莹莹<sup>2</sup>, 段晓婧<sup>2</sup>, 陶正明<sup>2\*</sup>

1. 浙江农林大学食品与健康学院浙江省特色中药资源保护与创新利用重点实验室, 浙江 杭州 311300

2. 浙江省亚热带作物研究所, 药用植物研究室, 浙江 温州 325005

3. 浙江铁枫堂生物科技股份有限公司, 浙江 温州 325005

**摘要:** 目的 对铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 中糖基转移酶基因 *DoUGT83A1* 进行克隆, 并对其进行生物信息学及表达模式分析。方法 从铁皮石斛“雁荡山1号”叶组织中获得 *DoUGT83A1* 基因, 利用软件进行生物信息学分析, 利用 MEGA 11 构建系统发育树, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测基因表达模式。结果 通过 PCR 扩增得到 1 个 *DoUGT83A1* 基因 (GI: 1622023669), 该基因的 CDS 序列为 1 347 bp, 编码 448 个氨基酸。DoUGT83A1 蛋白相对分子质量为 54 330, 理论等电点为 5.75, 为亲水性不稳定蛋白, 无信号肽和跨膜区域, 含有 41 个磷酸化位点, 具有 UDPGT 和 PSPG 2 个保守结构域。氨基酸序列分析表明 DoUGT83A1 蛋白与金钗石斛 *Dendrobium nobile* 的 UGT83A1 蛋白的同源性最高, 相似度为 96.36%。分子对接结果证明 DoUGT83A1 蛋白对山柰酚具有较好的催化活性。组织特异性表达分析结果显示, *DoUGT83A1* 在“雁荡山1号”不同组织相对表达量为: 叶>茎>花>根(白根、绿根尖)。顺式作用元件分析结果表明, *DoUGT83A1* 基因启动子序列含有多个与非生物胁迫响应相关的元件, 且在低温、缺磷和菌根共生诱导下显著上调表达, 推测该基因可能参与调控铁皮石斛菌根共生及非生物胁迫响应过程。结论 成功克隆获得铁皮石斛 *DoUGT83A1* 基因, 并进行生物信息学分析和基因表达模式分析。为进一步探究 *DoUGT83A1* 基因功能及其在菌根共生和非生物胁迫响应中的作用机制提供理论依据。

**关键词:** 铁皮石斛; *DoUGT83A1* 基因; 生物信息学分析; 表达特性分析; qRT-PCR

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)01-0259-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.01.025

## Cloning and expression analysis of *DoUGT83A1* from *Dendrobium officinale*

ZHANG Yiqun<sup>1</sup>, CHEN Jiadong<sup>2</sup>, SONG Minquan<sup>3</sup>, JIANG Wu<sup>2</sup>, LIU Yingying<sup>2</sup>, DUAN Xiaojing<sup>2</sup>, TAO Zhengming<sup>2</sup>

1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Conservation and Innovative Utilization of Traditional Chinese Medicine Resources, College of Food and Health, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China

2. Laboratory of Medicinal Plants, Zhejiang Institute of Subtropical Crops, Wenzhou 325005, China

3. Zhejiang tiefengtang Biotechnology Co., Ltd., Wenzhou 325005, China

**Abstract: Objective** To clone one glycosyl transferase gene named *DoUGT83A1* from *Dendrobium officinale* and analyze its bioinformatics information and expression patterns. **Methods** The *DoUGT83A1* gene was obtained from the leaf tissue of *D. officinale* ‘Yandangshan 1’. Online softwares were used for bioinformatics analysis. Phylogenetic tree was constructed using MEGA 11. Gene expression patterns were analyzed by qRT-PCR. **Results** The *DoUGT83A1* gene (GI: 1622023669) was cloned by PCR. The CDS sequence of the *DoUGT83A1* gene was 1347 bp, encoding 448 amino acids. The DoUGT83A1 protein was a unstable hydrophilic protein, with no signal peptide or transmembrane region. The relative molecular weight of DoUGT83A1 was 54 330, and its theoretical isoelectric point (pI) was 5.75. DoUGT83A1 contained 41 phosphorylation sites and two conserved domains (UDPGT, PSPG). Amino acid sequence analysis showed that DoUGT83A1 had the highest homology with UGT83A1 protein of *D. nobile*, with a similarity of 96.36%. Molecular docking demonstrated the catalytic activity of DoUGT83A1 protein on kaempferol. Tissue-specific expression analysis showed that the relative expression levels of *DoUGT83A1* varied across different tissues

收稿日期: 2024-06-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32102485); 温州市科技特派员专项项目 (X2023018); 乐清市农业科技计划项目 (2023N002); 浙江省农业科学院乐清共同富裕产业研究院项目

作者简介: 张逸群 (1999—), 女, 浙江嘉兴人, 硕士, 从事中药品质评价与质量控制研究。E-mail: 1370640003@qq.com

\*通信作者: 陶正明 (1970—), 男, 浙江温州人, 研究员, 硕士, 从事药用植物栽培育种研究工作。E-mail: 312633768@qq.com

陈家栋 (1991—), 男, 浙江湖州人, 助理研究员, 博士, 从事药用植物有效成分合成机制研究工作。

E-mail: cjd18768101425@126.com

of ‘Yandangshan 1’ as follows: leaves > stems > flowers > roots (white roots, green root tips). The results of cis-acting element analysis showed that the promoter sequence of *DoUGT83A1* contained multiple elements, which were related to abiotic stress response. And the expression was significantly up-regulated under the induction of low temperature, phosphorus deficiency and mycorrhizal symbiosis, which suggested that this gene may regulate the mycorrhizal symbiosis and abiotic stress response process of *D. officinale*. **Conclusion** The cloning, bioinformatics analysis and expression patterns analysis of *DoUGT83A1* of *D. officinale* were completed, which provided a theoretical basis for further exploring the function of *DoUGT83A1* and its mechanism in mycorrhizal symbiosis and abiotic stress response.

**Keywords:** *Dendrobium officinale* Kimura et Migo.; *DoUGT83A1* gene; bioinformatics analysis; expression characteristic analysis; qRT-PCR

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. 是兰科石斛属多年生附生草本植物，主要分布于浙江、贵州、云南、福建等省，在我国已有两千多年的药用历史，为我国名贵中药材。铁皮石斛以干燥茎入药，还可用于煎汤、泡酒，广泛应用于食品、保健品等领域<sup>[1]</sup>，具有重要开发价值。《本草纲目》记载，铁皮石斛具有“补五脏虚劳，强阴益精”等功效。现代药理学证明，铁皮石斛含有多糖、生物碱、萜类、黄酮等多种活性成分，具有降血压、提高免疫、抗衰老等功效<sup>[2]</sup>。铁皮石斛体内多糖的生物合成是一个精细且复杂的过程，涉及一系列复杂的物质信号交互和基因表达的调控。糖基转移酶（glycosyl transferases, GTs）参与植物的糖基化反应，参与药用植物多糖合成过程，其家族数量众多，功能多样，已在拟南芥<sup>[3]</sup>、水稻<sup>[4]</sup>、番茄<sup>[5]</sup>等多个物种中被报道，可产生种类多样的具有生物活性的次级代谢产物，在植物激素调节、内源物质代谢及自我防御等方面具有重要作用<sup>[6-8]</sup>。

铁皮石斛多附生于海拔 1 600 m 以下的温暖湿润、空气畅通的半阴湿的树木或岩石上，在阳光直射的岩层峭壁上也可生长，有较强的环境适应性。环境因素是铁皮石斛的生长发育、产量的重要限制因子之一。低温造成的冷害、冻害会对铁皮石斛的生存、产量和品质造成严重影响。研究表明糖基转移酶基因受低温胁迫诱导表达上调，可能参与植物低温的抗性调控。沉默茶树 *UGT91Q2* 基因导致茶树抗寒能力下降<sup>[9]</sup>，花生 *UGT83A1-like* 基因在低温胁迫下表达量上调<sup>[10]</sup>，铁皮石斛多糖合成相关基因（*UAM*、*PGM*、*UGP*、*CSLA*、*RHM*、*SPS*）在低温胁迫下呈现不同的表达模式<sup>[11]</sup>。除低温外，磷是植物生长发育过程中必需的一种大量营养元素，参与能量代谢、光合作用、信号转导等生物过程<sup>[12]</sup>。研究表明，糖信号可能参与植物对磷饥饿的反应。水稻 *AGPL1* 和 *AGPS1* 在磷饥饿时上调表达，通过增加淀粉、蔗糖等糖类的合成，从而释放合成路径中利用的磷酸基

团供植物利用<sup>[13]</sup>。在缺磷胁迫下，铁皮石斛多糖含量高于正常磷供给处理，*GH3* 基因家族成员在根和茎叶中的表达水平上调<sup>[14]</sup>，表明铁皮石斛多糖合成相关基因可能参与缺磷响应。植物主要通过根系的磷酸盐转运蛋白（主要是 *PHT1* 家族蛋白）从土壤中吸收磷酸盐，其他转录因子如 *MYB-CC* 转录因子 *PHR1* 及其同源基因 *PHL1*、*PHL2* 等在植物缺磷反应中也发挥了重要调控作用<sup>[15-16]</sup>。土壤中的磷极易被土壤吸附和固定，植物吸收利用率低，因此低磷通常成为植物生长发育的限制因素之一。在缺磷状态下，植物呈现植株矮小、生长缓慢、叶色暗绿、根系发育受阻等现象<sup>[17]</sup>。由于铁皮石斛自然繁殖率低，加之人类过度采挖和资源利用率低，野生铁皮石斛资源遭到严重破坏。近年来，大量研究表明，菌根真菌能与植物形成互惠共生关系，通过延伸的菌丝网络增加吸收面积，改善植物磷的吸收<sup>[18-19]</sup>，促进植物生长，提高其抗逆性。研究发现接种菌根真菌 *Mycena* sp.能大幅度提高铁皮石斛的多糖含量，但延长了多糖的形成时间<sup>[20]</sup>。外施生物菌剂也可增加铁皮石斛多糖含量<sup>[21-22]</sup>。利用分子生物学手段对铁皮石斛多糖合成代谢通路中关键酶基因进行调控研究，对解析铁皮石斛多糖合成的分子机制具有深远意义。本实验从铁皮石斛中克隆了 *DoUGT83A1* 基因编码区（CDS）序列，对该基因进行生物信息学和组织表达特异性分析，明确了该基因在低温、菌根共生、缺磷环境处理下的表达特性，为深入研究 *DoUGT83A1* 基因功能及其在非生物胁迫应答中的表达调控机制奠定基础，为培育优质抗逆性铁皮石斛优良品种提供参考。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

供试植物材料为铁皮石斛“雁荡山 1 号”两年生驯化苗，在乐清市龙西乡北垞村浙江铁枫堂生物科技股份有限公司基地采收，经浙江省农科院亚热带作物研究所陶正明研究员鉴定为铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Migo. 驯化苗；菌根

真菌摩西球囊霉 *Glomus mossesa* 购于北京农林科学院植物营养与资源研究所丛枝菌根真菌种质资源库 (bank of glomeromycota in China, BGC), 经实验室烟草扩繁获得接种物 (丛枝菌根真菌的菌丝体、孢子果、孢子、黄沙、石英砂以及干枯植物根段)。

### 1.2 仪器与试剂

2 × Taq PCR Mix、All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix 试剂盒、DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、pMD18-T 载体、cDNA 反转录试剂盒、Real Time PCR 试剂盒、质粒 DNA 抽提、DNA 胶回收、PCR 产物纯化试剂盒。PCR 引物合成委托北京擎科生物科技股份有限公司完成。

## 2 方法

### 2.1 实验设计

将采收的铁皮石斛种苗洗净根部, 取茎、叶、根组织, 经液氮速冻后保存于-80 °C 冰箱备用, 用于后续基因组织表达特性实验。每个样品 3 次生物学重复。其余种苗移栽入盆栽基质 (黄沙、石英砂) 中, 每盆 5 株, 每组设置 3 个重复。低温胁迫实验设低温组 (0 °C)、常温对照组 (20 °C), 处理时间 20 h, 参照 Wu 等<sup>[23]</sup>研究方法; 低磷胁迫实验设低磷处理组 (0.01 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, LP) 和常磷处理组 (1.0 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NP), 处理时间 6 个月; 菌根共生实验设置接菌组和不接菌组, 处理时间 6 个月。将烟草扩繁接种物分别与盆栽基质混匀, 保证每丛铁皮石斛周围有 200 个孢子左右。不

接菌对照处理为接种等量灭活接种物。用 25 μmol/L 磷浓度的霍格兰营养液浇灌, 每周浇 1 次营养液, 每次浇灌至盆栽基质全部润湿为止。参照 Liu 等<sup>[24]</sup>研究方法, 在 28 °C 光照 14 h / 22 °C 黑暗 10 h 条件下共生培养 3 个月。上述实验每处理均设置 3 次生物学重复。

### 2.2 铁皮石斛总 RNA 提取和 cDNA 合成

参照改良的 CTAB 法提取上述样品的总 RNA, 利用 Nanodrop 微量分光光度计检测其浓度。参照 All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix 试剂盒说明书反转录合成单链 cDNA。

### 2.3 基因克隆与测序

从 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载已知的铁皮石斛 *DoUGT83A1* 序列 (基因 ID: LOC110105079), 使用 Primer Premier 5.0 软件设计 *DoUGT83A1* 基因特异性扩增引物 (F: 5'-ATGAGCTCCCCTCATGCACT-3'; R: 5'-TTAAATTTCTCTTATAAAATC-3'), 由北京擎科生物科技股份有限公司合成。PCR 扩增体系 (20 μL): 2 × Taq PCR Mix 10 μL, 上、下游扩增引物各 1.0 μL, cDNA 模板为 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 7.0 μL。PCR 扩增程序: 94 °C、3 min; 94 °C、30 s, 58 °C、30 s, 72 °C、40 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 胶回收连接至 pMD18-T 线性载体, 并转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞, 筛选单克隆菌液进行 PCR 鉴定后, 选取阳性克隆送至委托公司测序验证, 见表 1。

表 1 *DoUGT83A1* qRT-PCR 实验引物

Table 1 qRT-PCR primers for *DoUGT83A1* gene

引物名称	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
DoUGT83A1F	ATGAGCTCCCCTCATGCACT	1 347
DoUGT83A1R	TTAAATTTCTCTTATAAAATC	
qDoUGT83A1F	CCAATTGTTAACCCTAAAGCT	156
qDoUGT83A1R	TTCAAAGCTTGAGATCTTGCC	
qDoActin-F	CCCTACCTCCTACCTCTGCG	150
qDoActin-R	GCAAACCCAGCCTTCACCAT	

### 2.4 生物信息学分析

在 NCBI 数据库提交克隆的 *DoUGT83A1* 基因的氨基酸序列, 进行 BLASTp 比对筛选相似性高的其他物种同源序列。利用 MEGA 11 软件的邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建系统发育进化树。利用 DNAMAN 软件对 *DoUGT83A1* 及其同源蛋白进行氨基酸多序列比对; 利用 NCBI-CDD 在线预测

*DoUGT83A1* 蛋白结构域, 利用 Pfam 进行保守结构域鉴定分析, 利用 MEME 软件分析 *DoUGT83A1* 及其他物种 UGT83A1 蛋白的保守结构域; 运用 ExPASy ProtParam 预测蛋白理化性质; 使用 SOPMA 进行蛋白二级结构分析, 采用 ProtScale 进行蛋白亲疏水性分析; 采用 SWISS-MODEL 预测蛋白三级结构, 采用 PyMod 插件对蛋白三级结构进

行合理性评估；使用 TMHMM 2.0 和 Signal P 5.0 预测蛋白跨膜区和信号肽，利用 CBS NetPhos 3.1 在线软件预测蛋白磷酸化位点。通过 PlantCARE 网站预测启动子顺式作用元件。选择黄酮醇类的山柰酚作为底物，利用 Autodock 软件将目标分子与 DoUGT83A1 进行蛋白底物对接。

## 2.5 组织表达特异性分析

花柱、花蕾、唇瓣、萼片、叶、茎、白根和绿根尖样本于 2024 年 6 月取自浙江铁枫堂生物科技股份有限公司铁皮石斛种植基地大棚中，自然条件下生长，为两年生成苗。利用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析 *DoUGT83A1* 基因在不同组织器官中的表达情况。

## 2.6 不同胁迫处理下的转录组分析

利用 qRT-PCR 分析 *DoUGT83A1* 基因在菌根共生、低温和缺磷处理下的表达情况。

## 2.7 数据处理与分析

采用 WPS 2019 软件对数据进行处理，使用 SPSS 21.0 进行统计分析，用 Duncan's 法进行多重比较，使用 GraphPad Prism 9.5 软件作图。

## 3 结果与分析

### 3.1 *DoUGT83A1* 基因克隆与序列分析

以铁皮石斛“雁荡山 1 号”叶组织 cDNA 为模板，利用特异性引物进行 PCR 扩增，克隆得到目的条带 (图 1-A)。结果显示有清晰的目的基因条带，无弥散的降解条带，测序获得 *DoUGT83A1* 基因 CDS 序列全长为 1 347 bp，编码 448 个氨基酸，其终止密码子为 TAA。染色体定位结果显示，*DoUGT83A1* 位于 NW\_021319083.1 染色体上，含有 2 个外显子和 1 个内含子 (图 1-B)。

### 3.2 *DoUGT83A1* 蛋白生物信息学分析

利用 Pfam 及 SMART 预测分析 *DoUGT83A1* 蛋白结构，结果显示 *DoUGT83A1* 蛋白共存在 10 个开放阅读框 (open reading frame, ORF) (图 2)，采用在线软件 Prot Param 分析 *DoUGT83A1* 基因编码蛋白的理化性质，*DoUGT83A1* 基因编码 448 个氨基酸，分子式为  $C_{2422}H_{3797}N_{659}O_{693}S_{34}$ ，理论相对分子质量为 54 330，理论等电点为 5.75，不稳定指数为 46.89，在第 158 位甲硫氨酸 (Met) 处具有亲水

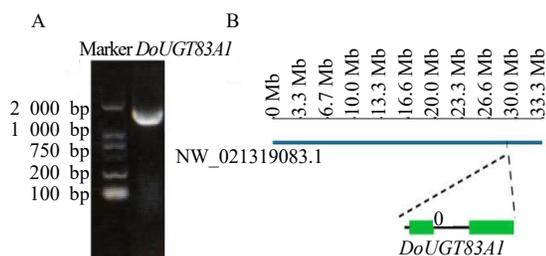


图 1 *DoUGT83A1* 基因克隆 (A) 及染色体定位 (B)

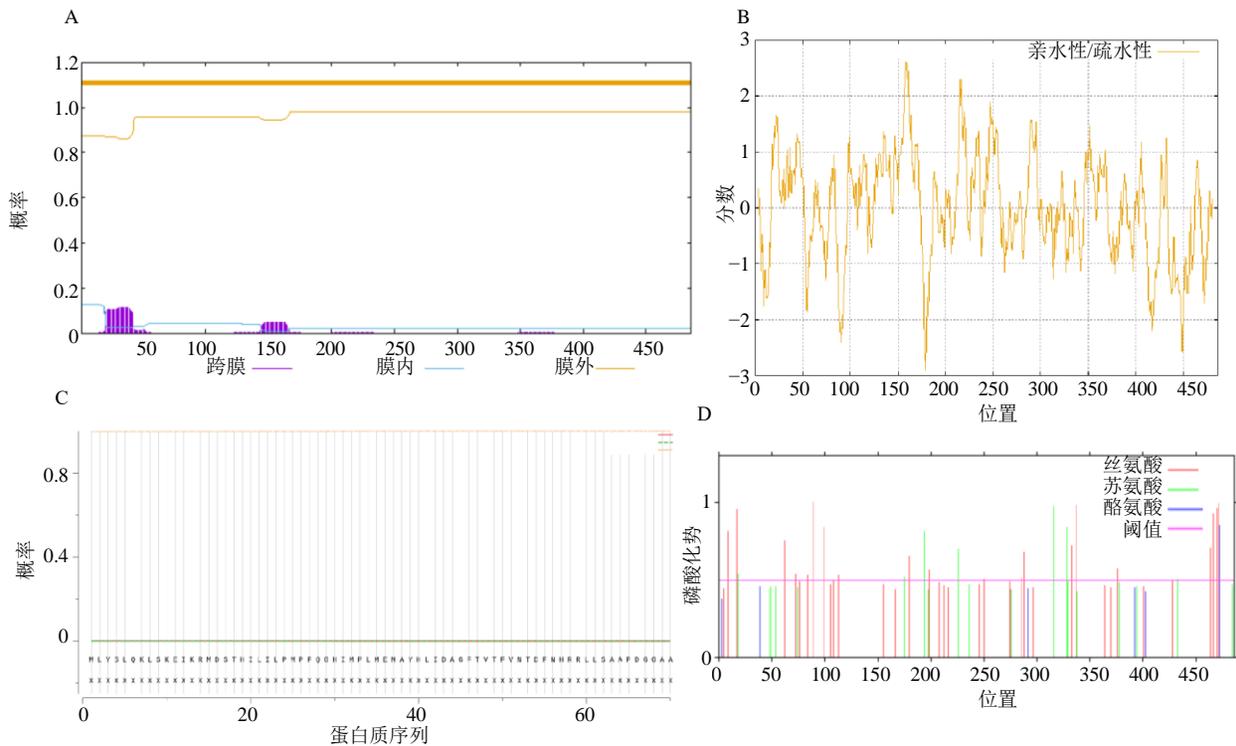
Fig. 1 Cloning (A) and chromosome location (B) of *DoUGT83A1*

性最大值 (2.611)，在第 179 位丝氨酸 (Ser) 处具有亲水性最小值 (-2.900)，亲水性平均值为 -0.015 (图 3-B)，说明 *DoUGT83A1* 属于亲水性不稳定蛋白。对 *DoUGT83A1* 蛋白的跨膜区和信号肽结构分析，发现 *DoUGT83A1* 蛋白无信号肽和跨膜区结构区，表明 *DoUGT83A1* 属于非跨膜非分泌蛋白 (图 3-A、C)。对 *DoUGT83A1* 蛋白进行磷酸化位点分析，结果表明 *DoUGT83A1* 含有 41 个蛋白磷酸化位点，其中包括 31 个丝氨酸 (Ser) 位点和 10 个苏氨酸 (Thr) 位点 (图 3-D)，说明该蛋白的磷酸化修饰以丝氨酸为主。运用在线工具 SOPMA 预测蛋白二级结构，结果显示，*DoUGT83A1* 蛋白的二级结构由 40.95%  $\alpha$ -螺旋、13.58% 延伸链和 45.47% 无规则卷曲组成 (图 4-A)，主要以  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲组成为主；利用在线分析软件 SWISS-MODEL 预测蛋白三级结构 (图 4-B)。*DoUGT83A1* 与其他植物 UGT83A1 同源蛋白系统进化树分析见图 4-C，系统进化树结果表明，*DoUGT83A1* 蛋白与金钗石斛 *Dendrobium nobile* 的 UGT83A1 蛋白聚为一支，亲缘关系较近，可能具有类似的功能。*DoUGT83A1* 与其他植物 UGT83A1 保守基序分析见图 4-D，结果表明 7 个 UGT83A1 蛋白在 C 端存在一个由 44 个氨基酸残基组成的 UDP-糖基转移酶保守结构域，即 C 末端保守区域 PSPG 盒—HCGMNS。*DoUGT83A1* 与兰科植物 UGT83A1 的氨基酸序列具有较高的一致性，与金钗石斛的 UGT83A1 蛋白的同源性最高，相似度为 96.36%。为探究 *DoUGT83A1* 的底物特异性，选择黄酮醇类成分山



图 2 *DoUGT83A1* 蛋白保守结构域

Fig. 2 Conserved domains of *DoUGT83A1*



A-跨膜结构域; B-亲水性; C-信号肽; D-磷酸化位点。

A-transmembrane domains; B-hydrophilicity; C-signal peptide; D-phosphorylation sites.

图3 DoUGT83A1 蛋白预测分析

Fig. 3 Prediction analysis of DoUGT83A1

柰酚 (kaempferol) 作为底物, 与 DoUGT83A1 蛋白进行分子对接。对接结果如图 6 所示, DoUGT83A1 与山柰酚的结合亲和力为  $-7.08$  kJ/mol, 预测 DoUGT83A1 蛋白与山柰酚具有较好的酶活反应潜力。

### 3.3 DoUGT83A1 启动子顺式作用元件分析

本研究利用 PlantCARE 软件对铁皮石斛 DoUGT83A1 基因启动子进行分析。结果表明, 铁皮石斛 DoUGT83A1 启动子上中存在多个参与生理代谢和环境胁迫的顺式作用元件 (表 2), 例如, 启动子区域包括核心启动元件 (TATA-box、CAAT-box); ABA 响应元件 (ABRE); MeJA 响应元件 (TGACG-motif、CGTCA-motif); GA3 响应元件 (GARE-motif); 低温响应元件 (LTR)。由此推测铁皮石斛 DoUGT83A1 基因在低温响应、光响应表明 DoUGT83A1 可能在调控铁皮石斛生长发育和抵御非生物胁迫中可能发挥重要作用。

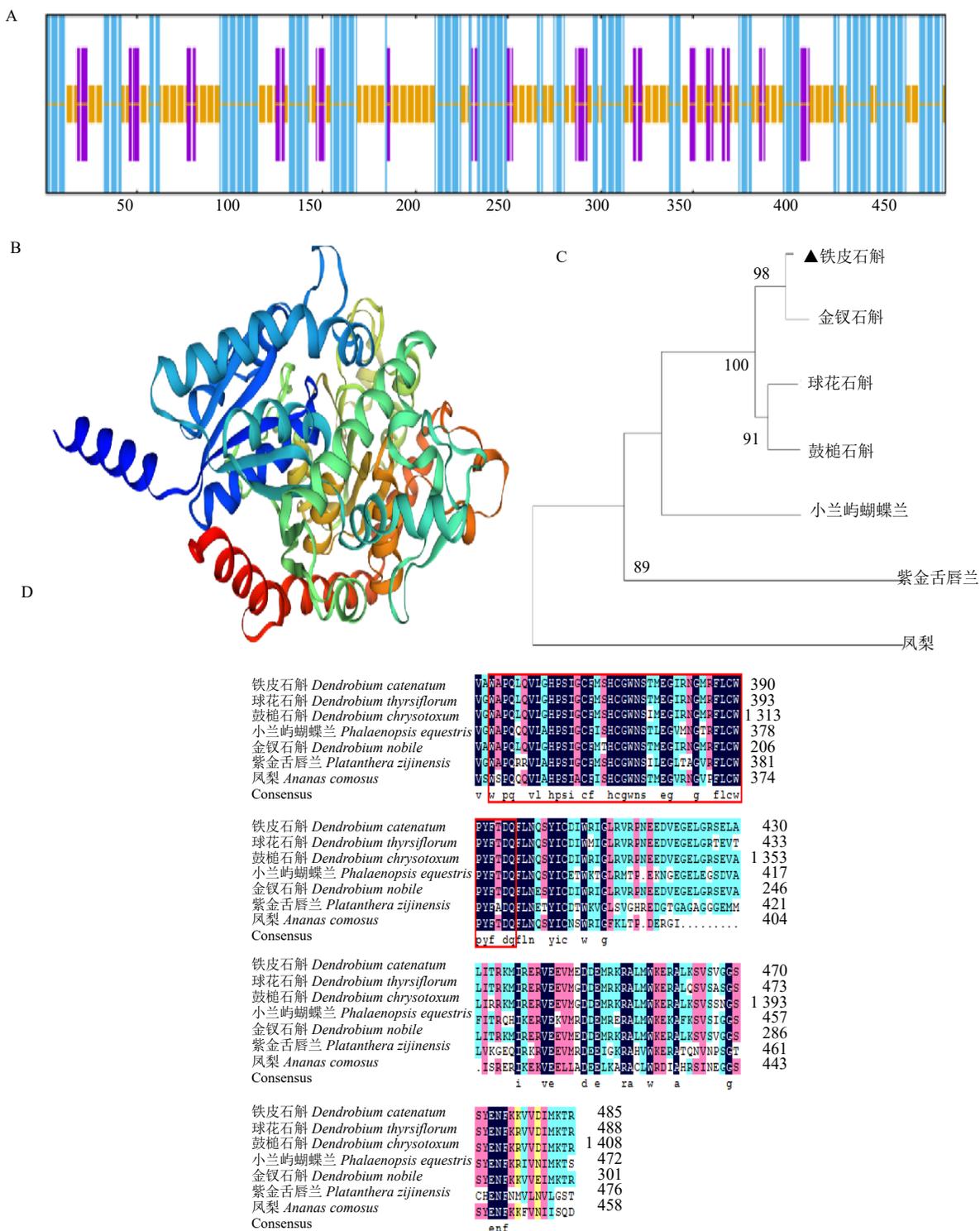
### 3.4 DoUGT83A1 基因组织特异性表达特性分析

为了进一步分析铁皮石斛 DoUGT83A1 基因的时空表达特性, 利用 qRT-PCR 检测了 DoUGT83A1 基因在铁皮石斛不同组织中的表达情况。结果显示,

DoUGT83A1 基因在铁皮石斛不同组织器官中均有表达 (图 7), 相对表达量存在明显差异, 在叶中表达量最高, 其次为茎, 再者为花, 在根组织 (白根和绿根尖) 中表达量最低。基因在植物不同部位的表达情况与其功能存在一定的联系<sup>[25-26]</sup>。由此推测 DoUGT83A1 在叶中高表达可能暗示其在铁皮石斛叶的生长发育中发挥重要的调控作用。

### 3.5 DoUGT83A1 基因在低温、缺磷、菌根共生下的表达特性分析

利用 PlantCARE 软件预测 DoUGT83A1 基因的启动子序列, 结果显示 DoUGT83A1 基因上游启动子区中含有多种植物激素及环境因子相关的顺式作用元件。因此对 DoUGT83A1 基因在低温、缺磷、菌根共生处理下的表达模式进行分析。qRT-PCR 结果 (图 8) 表明, DoUGT83A1 基因受低温、缺磷、菌根共生诱导表达显著上调表达, 表达模式基本一致, 提示该基因可能在铁皮石斛低温相应和缺磷耐和菌根共生途径过程中发挥重要功能。本研究中检测了低温、缺磷、菌根共生实验中铁皮石斛中多糖含量, 由表 3 可知, 3 种处理均能提高铁皮石斛多糖含量。



A-蛋白二级结构预测; B-蛋白质三级结构预测; C-DoUGT83A1 与其他植物 UGT83A1 同源蛋白系统进化树, 黑色三角形为 DoUGT83A1; D-DoUGT83A1 与其他植物 UGT83A1 氨基酸多重序列比对, 红色方框为 PSPG 保守结构域; 黄色: 同源性≥33%, 浅蓝色: 同源性≥50%, 粉色: 同源性≥75%, 深蓝色: 同源性=100%。

A-predicted secondary structure of DoUGT83A1; B-deduced three-dimensional structure of DoUGT83A1; C-phylogenetic analysis of DoUGT83A1 and other plants UGT83A1 homologous protein, black triangle refers to DoUGT83A1; D-multiple sequence alignment of DoUGT83A1 and UGT83A1 from other plants, red box refers to PSPG conserved domains; yellow: sequence identity ≥ 33%, light blue: sequence identity ≥ 50%, pink: sequence identity ≥ 75%, dark blue: sequence identity = 100%.

图 4 DoUGT83A1 蛋白生物信息学分析

Fig. 4 Bioinformatic analysis of DoUGT83A1



图5 DoUGT83A1 与其他植物 UGT83A1 保守基序分析

Fig. 5 Conserved motifs of DoUGT83A1 and UGT83A1 in other plants

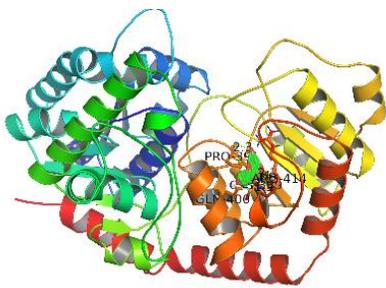


图6 DoUGT83A1 与山柰酚分子对接预测结果

Fig. 6 Molecular docking results of DoUGT83A1 with kaempferol

#### 4 讨论

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸糖基转移酶 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) 基因家族是一类成员数量最多、功能最重要的糖基转移酶之一, 参与植物次生代谢物质合成过程的下游修饰, 可改变最终产物的理化性质及生物学性质。植物 UGT 可催化植物中糖苷类化合物的合成, 广泛存在于植物中, 已在广东金钱草<sup>[27]</sup>、红花<sup>[28]</sup>、女贞<sup>[29]</sup>等多种药用植物中被鉴定和克隆出来, 并进行了基因相关功能分析。而在兰科植物中关于 UGT 基因的相关研究较少。铁皮石斛中共鉴定出 44 个 UGT 基因家族成员,

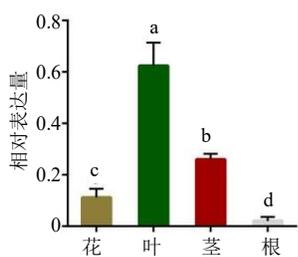
表2 DoUGT83A1 基因启动子顺式作用元件分析

Table 2 Analysis of cis-acting elements of DoUGT83A1 promoters

元件名称	序列 (5'-3')	数目	功能
CAAT-box	CAAT	15	启动子和增强子区域共有的顺式作用元件
TATA-box	TATATAAATC	17	转录起始-30区的核心启动子元件
ABRE	CGCACGTGTC	1	ABA 响应
TGACG-motif/CGTCA-motif	TGACG/CGTCA	4	MeJA 响应
GARE-motif	TCTGTTG	1	GA <sub>3</sub> 响应
MBS	CAACTG	1	干旱响应
LTR	CCGAAA	1	低温响应
L-box/LAMP-element/GATA-motif	ATCCACCTAC/CTTTATCA/AAGGATAAGG/GATAGGG	4	部分光响应
Sp1	GGGCGG	1	光响应
CCAAT-box	CAACGG	1	MYBHv1 结合位点
GC-motif	CCCCCG	2	缺氧诱导响应
O2-site	GATGATGTGG	2	参与玉米醇溶蛋白代谢调节

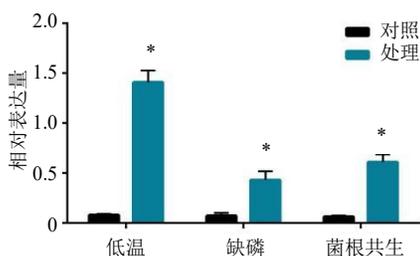
在 C 端末尾均含有一段由 44 个氨基酸(WAPQ-VL-H-AVG-FLTHCGW- NSTLES-GVP-WPM-DQ) 组成的 PSPG 保守结构域, 被认为是 UGT 与糖基供体识别结合位点。UGT 基因种类多样, 作用广泛, 目前对糖基转移酶基因的研究尚不深入。本研究从铁皮

石斛 UGT 基因家族中克隆得到一个 UGT 基因 DoUGT83A1, 其 CDS 全长 1 347 bp, 编码 448 个氨基酸。该基因具有典型的 UDPGT 和 PSPG 保守结构域, 能够与 UDP-糖形成氢键发生直接相互作用, 与底物结合发生糖基化反应。



不同字母标是在  $P < 0.05$  水平上差异显著, 表 3 同。  
There were significant differences between different letter marks at  $P < 0.05$  level, same as table 3.

图 7 *DoUGT83A1* 基因组织特异性表达  
Fig. 7 Tissue specific expression of *DoUGT83A1*



与对照组比较: \* $P < 0.05$ 。  
\* $P < 0.05$  vs control group.

图 8 *DoUGT83A1* 基因在低温、缺磷、菌根共生下表达情况  
Fig. 8 Expression of *DoUGT83A1* under low temperature, phosphorus deficiency and mycorrhizal symbiosis

表 3 低温、缺磷、菌根共生下铁皮石斛多糖含量  
Table 3 Polysaccharide content of *D. officinale* under low temperature, phosphorus deficiency and mycorrhizal symbiosis

组别	多糖/%		
	低温实验	缺磷实验	菌根共生
对照	16.94 ± 1.23 <sup>b</sup>	23.05 ± 1.29 <sup>b</sup>	28.59 ± 1.05 <sup>b</sup>
处理	22.62 ± 1.13 <sup>a</sup>	30.81 ± 0.72 <sup>a</sup>	39.48 ± 0.79 <sup>a</sup>

*DoUGT83A1* 为亲水性不稳定蛋白, 在进化上与金钗石斛、鼓槌石斛、球花石斛 *UGT83A1* 等兰科植物的亲缘关系最近, 表明兰科植物的蛋白序列和结构在进化过程中可能相对保守。此外, *DoUGT83A1* 肽链中含有 41 个磷酸化位点, 其中 31 个 Ser 位点, 由此可以推测该蛋白发生磷酸化时可能以 Ser 磷酸化为主, 从而在多种生物学活动和分子功能方面发挥重要的调控作用。

研究发现, UGT 在植物不同发育时期和不同组

织中的表达也具有时空特性。基因的组织特异性与其功能存在一定联系。例如 *CLSY1-4* 基因在拟南芥花序、胚珠、真叶等组织中呈现明显的组织特异性, 对特定的 *CLSY* 位点突变可改变组织间的表观遗传<sup>[30]</sup>。张岗等<sup>[31]</sup>发现铁皮石斛蔗糖转运蛋白基因 *DoSUT1* 在叶、茎表达量为根组织的 2.783 和 2.150 倍, 该基因可能主要调节铁皮石斛茎中糖转运与贮存。本研究克隆得到的 *DoUGT83A1* 基因在铁皮石斛不同组织器官中表达水平也存在显著差异, 相对表达量为叶 > 茎 > 花 > 根, 说明该基因可能在铁皮石斛叶器官生长发育及体内各器官间糖转运与贮存的过程中发挥重要功能。

目前在铁皮石斛功能基因的相关研究中, 参与多糖代谢和运输的基因包括尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-Glucose Pyrophosphorylase, UG Pase)、纤维素合成酶样 A6 (cellulose synthase-like A, *DoCSLA6*)、蔗糖转运蛋白 (sucrose transporter, *DoSUT1*)、GDP 甘露糖焦磷酸化酶 (GDP-mannose pyrophosphorylase, *DoGMP1*)、*DoSWEET* 蛋白 (sugars will be eventually exported transporters, *DoSWEET1*)、碱性/中性转化酶己糖转运蛋白 [(alkaline/neutral invertase, *DoNI2*)、(hexose transporter, *DoHT1*)]、可溶性酸性转化酶 (soluble acid invertase, *SAI*)<sup>[32]</sup>。

*UGT* 基因作为多糖合成途径下游关键酶基因, 在植物生长发育、次生代谢产物修饰及非生物胁迫响应中发挥着重要调控作用。大豆中催化类黄酮糖基化的糖基转移酶基因, 能够促进大豆根系生长<sup>[33]</sup>。水稻 *OsSQD2.2* 催化芹菜素发生糖基化, 超表达后具有增加叶片中次生代谢产物含量, 降低水稻生物量、结实率<sup>[34]</sup>。本研究中通过分析 *DoUGT83A1* 基因在不同胁迫条件下的表达情况, 更好地理解铁皮石斛 *DoUGT83A1* 基因在非生物胁迫中的作用。*DoUGT83A1* 的启动子序列被证明含有响应多种非生物胁迫源 (如光、温度、干旱等) 的反应, 以及多种激素响应相关的顺式作用元件, 表明 *DoUGT83A1* 基因可能参与对一系列胁迫源的响应。越来越多的 *UGT* 基因已被证明具有抗寒功能, 包括 *AhUGT83A1-like*、*CsUGT91Q2*、*NtUGT90* 等<sup>[9-10,35]</sup>。本研究中发现 *DoUGT83A1* 受低温、缺磷诱导、菌根共生上调表达, 提示该基因在抵御非生物胁迫和菌根共生过程中可能发挥重要调控作用, 与前人研究相符。随着气候变化逐渐

加剧, 全球生态环境正面临严峻挑战。铁皮石斛 *DoUGT83A1* 基因的克隆和分析对研究植物响应非生物胁迫与菌根共生的具体机制具有重要意义, 有利于阐明 *DoUGT83A1* 在抵御非生物胁迫和菌根共生途径中的功能和分子机制, 为进一步定向优化铁皮石斛药材品质奠定基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 邵旭升. 铁皮石斛发酵乳的制备及风味解析研究 [D]. 杭州: 浙江科技学院, 2023.
- [2] 胡杨, 赵勉, 邱雨轩, 等. 药食同源中药铁皮石斛的研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(1): 94-108.
- [3] Chen T T, Liu F F, Xiao D W, *et al.* The *Arabidopsis* UDP-glycosyltransferase75B1, conjugates abscisic acid and affects plant response to abiotic stresses [J]. *Plant Mol Biol*, 2020, 102(4/5): 389-401.
- [4] 祝小雅, 刘焯, 闫蕴韬, 等. 水稻 UGT 基因家族及成员 SS4 的生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 2021, 5: 1-11.
- [5] 董定霄. 番茄糖基转移酶 UGT43 和 UGT73C1 基因参与干旱、盐胁迫耐性的功能研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2022.
- [6] 童婧, 杨德盈, 张倩, 等. 人参皂苷生物合成相关的尿苷二磷酸依赖的糖基转移酶研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(9): 3202-3216.
- [7] 于安东, 刘琳, 龙瑞才, 等. 植物 UDP-糖基转移酶 (UGT) 的功能及应用前景 [J]. 植物生理学报, 2022, 58(4): 631-642.
- [8] 顾榕. 灵芝 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶的酶学性质研究及其过表达对灵芝多糖合成的影响 [D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [9] Leng C Y, Hou M Y, Xing Y M, *et al.* Perspective and challenges of mycorrhizal symbiosis in orchid medicinal plants [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(2), 172-179.
- [10] 陈娜, 胡东青, 潘丽娟, 等. 花生中 UDP-葡萄糖基转移酶基因的克隆及在非生物胁迫下的表达研究 [J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(3): 308-315.
- [11] 佟岩, 黄荟, 王辉, 等. 铁皮石斛多糖合成相关基因在不同组织及低温胁迫下的表达分析 [J]. 西部林业科学, 2021, 50(3): 20-27.
- [12] 刘荣, 李兵杰, 王智焯. 植物响应缺磷胁迫的分子机制研究进展 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2024, 50(3): 455-468.
- [13] Meng Q, Zhang W Q, Hu X, *et al.* Two ADP-glucose pyrophosphorylase subunits, OsAGPL1 and OsAGPS1, modulate phosphorus homeostasis in rice [J]. *Plant J*, 2020, 104(5): 1269-1284.
- [14] 李亚萍, 金福来, 黄宗贵, 等. 铁皮石斛糖苷水解酶 GH3 基因家族鉴定及表达模式分析 [J]. 浙江农业学报, 2024, 36(4): 790-799.
- [15] Wang R Y, Liu X Q, Zhu H Q, *et al.* Transcription factors GmERF1 and GmWRKY6 synergistically regulate low phosphorus tolerance in soybean [J]. *Plant Physiol*, 2023, 192(2): 1099-1114.
- [16] Paz-Ares J, Puga M I, Rojas-Triana M, *et al.* Plant adaptation to low phosphorus availability: Core signaling, crosstalks, and applied implications [J]. *Mol Plant*, 2022, 15(1): 104-124.
- [17] 孙海, 梁浩, 张亚玉. 药用植物根形态建成低磷响应策略及其分子机制 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(24): 6573-6580.
- [18] 吴昫纾, 蔡柏岩. 丛枝菌根真菌介导植物磷元素吸收机理的研究进展 [J]. 山东农业科学, 2022, 54(8): 137-143.
- [19] 高明含, 李丽丽, 杨洪一, 等. 菌根真菌促进植物氮磷吸收的研究进展 [J]. 黑龙江农业科学, 2023(10): 126-131.
- [20] 陈晓梅, 闫浩利, 王春兰, 等. 菌根真菌 *Mycena* sp. 对铁皮石斛生长和多糖化学性质的影响 [J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46(7): 872-879.
- [21] 胡灵晓, 俞春英, 江建铭. 不同生物菌剂对铁皮石斛生长的影响 [J]. 浙江农业科学, 2022, 63(8): 1712-1714.
- [22] 朱波. 内生真菌提高铁皮石斛品质及其分子机制研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2017.
- [23] Wu Z G, Jiang W, Chen S L, *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: 1653.
- [24] Liu J L, Chen J D, Xie K, *et al.* A mycorrhiza-specific H<sup>+</sup>-ATPase is essential for arbuscule development and symbiotic phosphate and nitrogen uptake [J]. *Plant Cell Environ*, 2020, 43(4): 1069-1083.
- [25] Ji A J, Jia J, Xu Z C, *et al.* Transcriptome-guided mining of genes involved in crocin biosynthesis [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 518.
- [26] Zhang Y, Ji A J, Xu Z C, *et al.* The AP2/ERF transcription factor SmERF128 positively regulates diterpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Plant Mol Biol*, 2019, 100(1/2): 83-93.
- [27] 黎馥瑜, 谢纯珠, 詹亭, 等. 广东金钱草糖基转移酶基因 DsUGT11 的克隆和功能分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2023, 15: 1-10.
- [28] 齐书艺, 王璐暖, 何贝轩, 等. 红花黄酮生物合成途径糖基转移酶基因 CtUGT25 的功能研究 [J]. 药学学报,

- 2024, 59(6): 1854-1863.
- [29] 周洛兵, 申甲一, 曾碧容, 等. 女贞叶中一条糖基转移酶的基因克隆、生物信息学分析及原核表达 [J]. 化学与生物工程, 2024, 41(4): 31-39.
- [30] Zhou M, Coruh C, Xu G H, *et al.* The CLASSY family controls tissue-specific DNA methylation patterns in *Arabidopsis* [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 244.
- [31] 张岗, 刘阿萍, 邵庆庆, 等. 铁皮石斛蔗糖转运蛋白基因的分离和表达分析 [J]. 中草药, 2016, 47(20): 3688-3695.
- [32] 吕楠, 安红强, 裴薇, 等. 铁皮石斛尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因的克隆与分析 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(7): 1215-1219.
- [33] Yin Q G, Shen G A, Chang Z Z, *et al.* Involvement of three putative glucosyltransferases from the UGT72 family in flavonol glucoside/rhamnoside biosynthesis in *Lotus japonicus* seeds [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(3): 597-612.
- [34] Zhan X Q, Shen Q W, Wang X M, *et al.* The sulfoquinovosyltransferase-like enzyme SQD2.2 is involved in flavonoid glycosylation, regulating sugar metabolism and seed setting in rice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4685.
- [35] Yang Q, Zhang Y C, Qu X L, *et al.* Genome-wide analysis of UDP-glycosyltransferases family and identification of *UGT* genes involved in abiotic stress and flavonol biosynthesis in *Nicotiana tabacum* [J]. *BMC Plant Biol*, 2023, 23(1): 204.

[责任编辑 时圣明]