

刘博婷,唐演儿,李琳,等.铁皮石斛酸性蔗糖转化酶基因家族鉴定及低温下表达分析[J].江苏农业科学,2022,50(24):33-42.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.24.005

铁皮石斛酸性蔗糖转化酶基因家族鉴定 及低温下表达分析

刘博婷^{1,2}, 唐演儿¹, 李琳¹, 林一帆¹, 李学诗¹, 于白音^{1,3}, 刘羽佳^{1,2,3}

[1. 韶关学院英东生物与农业学院,广东韶关 512005; 2. 广东省粤北食药资源利用与保护重点实验室(韶关学院),广东韶关 512005;
3. 韶关市石斛工程技术开发中心,广东韶关 512005]

摘要:为了探究 *DcAI* 家族基因的生物学特性及其在逆境响应中的潜在功能,基于已公布的铁皮石斛基因组数据,对铁皮石斛 *DcAI* 基因家族进行鉴定和生物信息学分析,并用 RNA-Seq(转录组测序)技术分析其在低温胁迫下的表达模式。结果表明,*DcAI* 基因家族共有 4 个成员,其中液泡蔗糖转化酶编码基因和细胞壁蔗糖转化酶编码基因各 2 个,在数量上与其他物种间的差异较大,存在基因丢失现象。*DcAIs* 具有相似的内含子/外显子结构,且不均匀地分布在染色体上,其蛋白质结构高度保守,具有酸性蔗糖转化酶特有的氨基酸保守基序。*DcAIs* 启动子含有多种顺式作用元件,涉及光响应、胁迫响应、激素响应、发育调节等多种生理生化过程;*DcAIs* 在铁皮石斛不同组织中的表达丰度不同,具有明显的组织表达特异性;*DcAIs* 在低温胁迫下呈现不同的表达模式,以同工酶形式在不同组织中对低温胁迫采取不同的响应机制,推测 *DcAIs* 可能通过调节自身基因的表达以提高细胞内可溶性多糖含量,从而增强铁皮石斛对低温的耐受能力。研究结果可为 *DcAIs* 基因的利用及铁皮石斛优良种质的分子遗传改良提供参考借鉴。

关键词:铁皮石斛;酸性蔗糖转化酶;基因家族;生物信息学;表达分析;冷胁迫响应

中图分类号:S567.23*9.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)24-0033-10

铁皮石斛(*Dendrobium catenatum* Lindl.)为兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium* Sw.)的多年生草本濒危药用植物,具有益胃生津、滋阴清热之功效,用于预防和治疗热病津伤、胃阴不足、阴虚火旺、目暗不明、筋骨痿软病症等,民间素有“救命仙草”之称。现代药理及成分分析结果表明,石斛多糖是衡量铁皮石斛药用价值的重要有效活性成分,具有提高免疫力、降血糖、降血脂、抗肿瘤、抗疲劳及改善肠道功能等作用^[1]。铁皮石斛多糖的合成、运输、代谢等涉及多个蛋白质或酶基因,而蔗糖则是铁皮石斛光合作用过程主要且直接的产物,是铁皮石斛体内碳水化合物运输的主要形式^[2]。在茎中,从叶

中转运来的蔗糖主要依靠蔗糖合成酶(sucrose synthase, SUS)、蔗糖转化酶(invertase, INV)的作用水解、转化并生成石斛多糖^[3]。在蔗糖的分解过程中,SUS 参与的反应是可逆的且以合成蔗糖为主,而 INV 则是不可逆地将蔗糖分解为葡萄糖、果糖,且在裂解蔗糖的过程中,INV 比 SUS 发挥的作用更重要^[4-5]。

在植物体内,INV 是由 1 个多基因家族编码的蛋白质,根据最适 pH 值、溶解性和亚细胞定位,主要分为细胞质转化酶(cytoplasmic invertase, CINV)、不溶性细胞壁转化酶(cell wall invertase, CWINV)和可溶性液泡转化酶(vacuolar invertase, VINV)3 种类型。其中,CINV 属于中性/碱性转化酶(neutral/alkaline invertase, NINV);CWINV、VINV 属于酸性蔗糖转化酶(acid invertase, AINV),能水解蔗糖和其他 β -果糖类寡糖,因此又被称为 β -呋喃果糖苷酶(β -fructofuranosidase)^[6]。研究发现,AINV 催化蔗糖不可逆地降解形成葡萄糖、果糖,为多糖合成提供碳源,同时调节植物细胞的扩展及贮藏器官碳水化合物的组成,在植物形态建成和生殖发育过程中具有重要作用^[7]。此外,CWINV 还参与蔗糖卸载、信号转导和防御应急反应等重要生命过程^[8];同

收稿日期:2022-02-16

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金(编号:2020A1515011438);国家自然科学基金(编号:32000266);国家级大学生创新创业训练计划(编号:202110576015);广东省普通高校工程技朮中心建设项目(编号:2021GCZX011);韶关市科技计划(编号:200810224537583、210731084530203);韶关学院科研重点项目(编号:SZ2019ZK04)。
作者简介:刘博婷(1981—),女,广东英德人,硕士,讲师,主要从事植物分子分析与基因改良研究。E-mail:81020325@qq.com。
通信作者:刘羽佳,博士,讲师,主要从事植物逆境生理与分子生物学研究。E-mail:liuyuj1713@dingtalk.com。

时, VINV 在植物细胞渗透调节、组织器官分化、激素响应和逆境抵御等过程中发挥了重要作用^[9-10]。自从研究者从胡萝卜 (*Daucus carota*) 中分离出第 1 个 VINV 基因以来^[11], 有关 AINV 基因或基因家族的研究已在番茄 (*Lycopersicon esculentum*)^[12]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[13]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[14]、棉花 (*Gossypium hirsutum* L.)^[15]、柚子 (*Citrus grandis* L.)^[16]、辣椒 (*Capsicum annuum* L.)^[17] 等多种植物中报道。值得注意的是, 不同植物、同种类型 AINV 的氨基酸序列具有高度保守性^[18]。虽然已有 1 条铁皮石斛 VINV 基因 (SAI) 被克隆, 并且研究者已对该基因进行了组织特异性表达分析^[19], 然而, 关于铁皮石斛 AINV 基因家族 (*DcAI*) 的系统研究尚未见报道。本研究基于已公布的铁皮石斛基因组数据, 对 *DcAI* 基因家族成员进行筛选鉴定、生物信息学和组织表达特性分析, 并研究其在低温胁迫下的表达模式及其对多糖含量的影响。研究结果可为今后深入研究 *DcAI* 基因家族成员的生物学功能及其在铁皮石斛多糖合成和逆境响应中的分子调控机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试石斛品种为广东丹霞铁皮石斛, 由韶关市石斛工程技术开发中心提供; 多糖多酚植物 RNA 抽提试剂盒 (B518661-0050) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; cDNA 反转录试剂盒 (RR036A) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 无水乙醇、无水葡萄糖购自国药集团化学试剂有限公司; 三氯甲烷、浓硫酸 (98%)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 饱和酚、异丙醇、苯酚等试剂均购自广州化学试剂厂, 所用试剂均为分析纯。

1.2 植物材料处理

试验于 2020—2021 年在广东省韶关市韶关学院英东生物与农业学院分子生物学与基因工程研究室进行。对铁皮石斛蒴果进行表面消毒后, 将其种子播种于培养基中, 于室温 (25 ± 2) °C、光照时间 16 h/d 无菌培养约 6 个月后, 选取生长状态良好且一致的幼苗进行 4 °C 低温胁迫处理, 以正常生长的植株为对照, 分别在处理 0、1、3、6、9、12、24、48 h 后采集铁皮石斛叶、茎和根样品, 经液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱中保存备用。每个样品设 3 次生物学重复。

1.3 基因家族筛选与鉴定

在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中下载铁皮石斛全基因组蛋白编码序列^[20], 线下构建本地数据库进行 BLAST。同时, 从拟南芥基因组数据库网站 (<https://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥酸性转化酶基因家族蛋白作为种子序列, 进行 BLASTp 同源比对 (阈值设置为 1×10^{-10}), 初步获得 *DcAI* 家族候选基因。用 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)、NCBI - CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 在线网站对候选基因蛋白编码序列进行验证, 获得同时具备 Glyco_hydro_32N (PF00251) 和 Glyco_hydro_32C (PF08244) 的基因家族成员。

1.4 生物信息学分析

通过 GSDS 2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 在线工具分析 *DcAIs* 基因结构域, 结合铁皮石斛基因组数据信息, 用 WPS 绘制内含子/外显子结构及其在染色体上的分布位置。用 Plant CARE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) 在线预测 *DcAIs* 起始密码子上游 2 000 bp 区域的顺式作用元件, 对结果筛选和归类后再用 TBtools 软件进行可视化^[21]。用 Expasy 在线网站 (<http://www.expasy.org>) 预测并分析蛋白序列的基本特性; 用 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 在线预测编码蛋白的潜在基序 (motif), 并用 TBtools 进行可视化处理。用 Geneious 软件进行氨基酸的多序列比对, 并通过 Prosite (<https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/mydomains/>) 在线工具完成蛋白质结构域位置分析; 用 SWISS - MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)、SPLIT 4.0 SERVER (<http://split.pmfst.hr/split/4/>) 在线网站对蛋白序列进行高级结构的预测分析; 用 MEGAX 11 软件中的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 绘制系统发育进化树。

1.5 基因组织表达分析

为了分析 *DcAI* 家族基因在铁皮石斛不同组织中的表达情况, 从 NCBI 数据库中下载获得未经任何处理的 8 个铁皮石斛组织的差异表达数据^[22], 分别是花蕾 (flower buds, FB)、花柱 (column)、唇瓣 (lip)、萼片 (sepal)、叶 (leaf)、茎 (stem)、白根 (white root, WR) 和绿根尖 (green root tip, GRT)。基因表达量用 FPKM (fragments per kilobase per million mapped reads) 表示, 使用 R 语言的 heatmap 包绘制

基因数字表达谱图。

1.6 冷胁迫基因的表达分析

为了分析 *DcAI* 基因家族在冷胁迫下的表达情况,使用多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒分别抽提于 4 ℃ 处理 0、1、3、6、9、12、24 h 铁皮石斛组培苗的叶、茎和根组织 RNA,并构建 RNA 文库,送至深圳华大基因科技有限公司完成高通量测序 (Illumina HiSeq™ 2500/Miseq™)。移除测序所得原始测序序列中的接头和低质量的 raw reads,以保证信息分析质量,最终得到 clean reads;利用 Qubit 2.0 将测序 clean reads 数据与铁皮石斛基因组参考序列进行比对;使用 Cufflinks 进行组装从而获得转录组数据。基因表达量以 FPKM 表示,用 GraphPad Prism 8 软件进行数据处理、分析和绘图。

1.7 多糖含量测定分析

为分析冷胁迫对铁皮石斛多糖含量的影响,利用水提醇沉法分别制备 4 ℃ 处理 0、24、48 h 后的铁皮石斛组培苗叶组织多糖提取液,使用苯酚-硫酸法测定 483 nm 波长处的最大吸光度,以无水葡萄糖为对照品,每个样品设 6 次重复,计算得出上述样品中的多糖含量,使用 GraphPad Prism 8 软件进行数

据处理、分析和绘图。

2 结果与分析

2.1 *DcAI* 基因家族的鉴定与分析

利用生物信息学方法筛选和验证,在铁皮石斛基因组数据库中共鉴定到 4 个 *DcAI* 基因家族成员 (表 1),其中 LOC110114607、LOC110096097 属于 *VINV*, LOC110096666、LOC110102702 属于 *CWINV*。*DcAIs* 基因组的差异较大,长度介于 3 345 ~ 13 803 bp 之间,但编码序列 (CDS) 差异不大,长度在 1 725 ~ 1 983 bp 之间,编码氨基酸长度为 574 ~ 660 个,蛋白质的分子量在 65.84 ~ 72.72 ku 之间。理论等电点 pI 介于 5.54 ~ 9.21 之间,其中 LOC110096666 编码的蛋白等电点大于 7.0,其余成员的等电点均小于 7.0,为弱酸性蛋白。蛋白亲水性平均系数介于 -0.507 ~ -0.165 之间,均小于 0,为亲水性蛋白。蛋白不稳定系数在 35.55 ~ 41.59 之间,仅 LOC110102702 编码的蛋白不稳定系数大于 40,为不稳定蛋白;其余成员的蛋白不稳定系数均小于 40,为稳定蛋白。

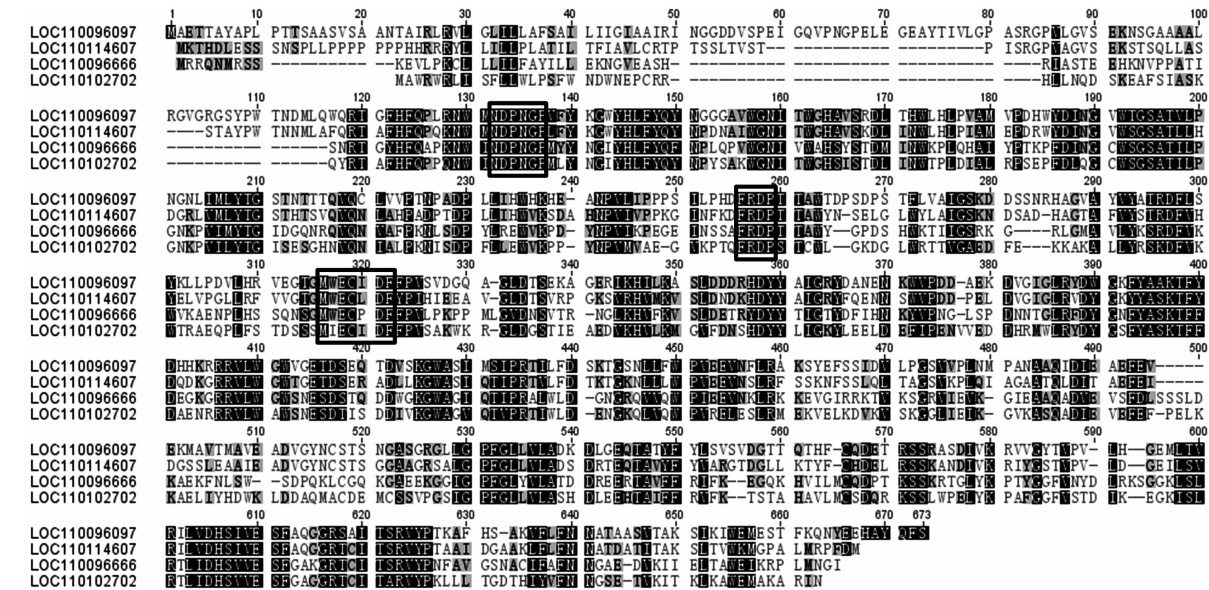
表 1 铁皮石斛 *DcAI* 基因家族成员的鉴定及氨基酸特性预测结果

基因类型	基因 ID	基因组位置	基因组大小 (bp)	编码区大小 (bp)	外显子数 (个)	氨基酸长度 (个)	氨基酸分子量 (ku)	等电点 (pI)	蛋白质亲水性 (GRAVY)	不稳定系数
液泡蔗糖转化酶基因	LOC110114607	NW_021318595.1 (1 956 881 ~ 1 962 407)	5 527	1 887	7	628	69.82	6.09	-0.184	38.33
	LOC110096097	NW_021319083.1 (32 625 897 ~ 32 631 500)	5 604	1 983	5 ~ 6	660	72.72	5.54	-0.165	35.55
细胞壁蔗糖转化酶基因	LOC110096666	NW_021319983.1 (747 779 ~ 761 581)	13 803	1 758	5	585	66.38	9.21	-0.507	35.81
	LOC110102702	NW_021318620.1 (149 827 ~ 153 171)	3 345	1 725	5 ~ 7	574	65.84	5.85	-0.339	41.59

2.2 *DcAI* 基因家族编码蛋白结构特性及保守基序分析

氨基酸序列多重比对结果显示,*DcAI* 基因家族编码蛋白成员在 N 端均具有 AI 催化位点特有的 DNPNG、FRDP、WECPD 保守基序 (图 1);两两相比一致性介于 40.11% ~ 63.54% 之间 (表 2),其中 LOC110114607 与 LOC110096097、LOC110096666 与 LOC110102702 的一致性高于 50%,其余成员间两两相比的一致性均低于 50%。同时,系统发育进化分析结果显示,LOC110114607 与 LOC110096097 编

码的蛋白序列位于同一分支,而 LOC110096666 与 LOC110102702 编码的蛋白序列同位于另一分支 (图 2 - A),表明 *DcAIs* 在进化上分为 2 种类型。MEME 分析结果表明,*DcAIs* 蛋白结构高度保守 (图 3),它们具有非常相似的保守基序和数目 (表 3)。此外,*DcAIs* 负责蔗糖转化功能的糖基水解酶结构域 (Glyco_hydro_32) 的位置极为相似 (图 2 - B),Glyco_hydro_32N 均处于 50 ~ 445 aa 范围内,均介于 372 ~ 640 aa 之间。



黑色方框分别表示 DNPNG、FRDP 和 WECPD 保守基序

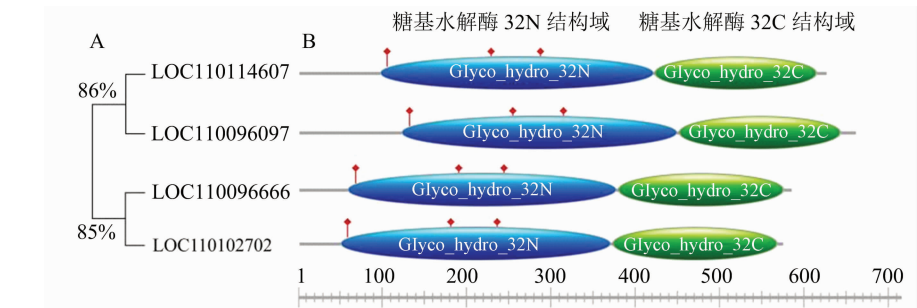
图1 铁皮石斛*DcAl*基因家族氨基酸序列多重比对分析

氨基酸序列	一致性 (%)		
	LOC110114607	LOC110096097	LOC110096666
LOC110096097	63.54		
LOC110096666	45.40	42.65	
LOC110102702	42.07	40.11	54.36

2.3 *DcAl* 基因家族蛋白性质及高级结构预测分析

DcAl 基因家族编码蛋白的多肽链中均富含亲

水性氨基酸,且数量多于疏水性氨基酸,属于亲水性蛋白(图 4 - A)。蛋白的二级结构预测结果显示,*DcAl*s 蛋白包括 Helix (α 、 π 和 3_{10} 螺旋)、Beta - strand 构象延伸链、无规则卷曲 (other), 分别约占 1.96% ~ 4.27%、29.83% ~ 37.45%、60.59% ~ 66.21% (图 4 - B)。另外,本研究对 *DcAl*s 蛋白的三级结构进行了同源建模,图 4 - C 结果表明,LOC110114607、LOC110096097 与端棘草 6 - 果糖基转移酶的蛋白同源性较高,三级结构一致性分别达



红色箭头表示 DNPNG、FRDP 和 WECPD 保守基序

图2 铁皮石斛*DcAl*基因家族系统进化树(A)和蛋白结构域(B)分析

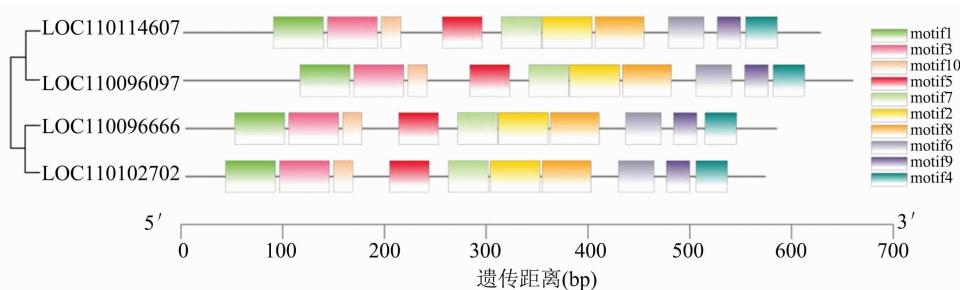


图3 铁皮石斛*DcAl*基因家族保守基序分布

表 3 铁皮石斛 *DcAI* 基因家族基序的保守氨基酸序列信息

基序	保守氨基酸序列	宽度	<i>E</i> 值
1	QRTAFHFQPKNWMNDPNGPLFYKGWYHLFYQYNPDNAIWGNITWGHAVS	50	1.1×10^{-79}
2	LRFDYGNFYASKTFFDECKGRRVLWGSNESDSTQDDWKGKGAGIQTIPR	50	2.4×10^{-57}
3	INWLHLPIAMEPDRWYDINGVWGSATLLHDGRLVMLYTGSTHTSVQVQN	50	4.7×10^{-44}
4	GEILSVRILVDHSIVESFAQGGRTCTISRVP	32	2.0×10^{-37}
5	HAGVAYVYATRDFLSYKLLPDVLHRVEGTGMWECIDFFPV	40	1.3×10^{-25}
6	YNCSTSGGAAGRSALGPFGLLVLADSDRTEQTAVYF	36	2.9×10^{-23}
7	KHILKASLDDDRHDYYAIGRYDANENKWVPDDAEKDVIGIG	40	1.3×10^{-20}
8	LWLDGNGRQVVQWPIEEVNKLRLKEVGIRRKTVKSGRVIEVKGIEAAQA	49	2.2×10^{-12}
9	LMCQDPTKSSKRTGLYKPTYGGFV	24	2.2×10^{-11}
10	PKNLSDPYLREWVKPDYNPV	20	1.2×10^{-9}

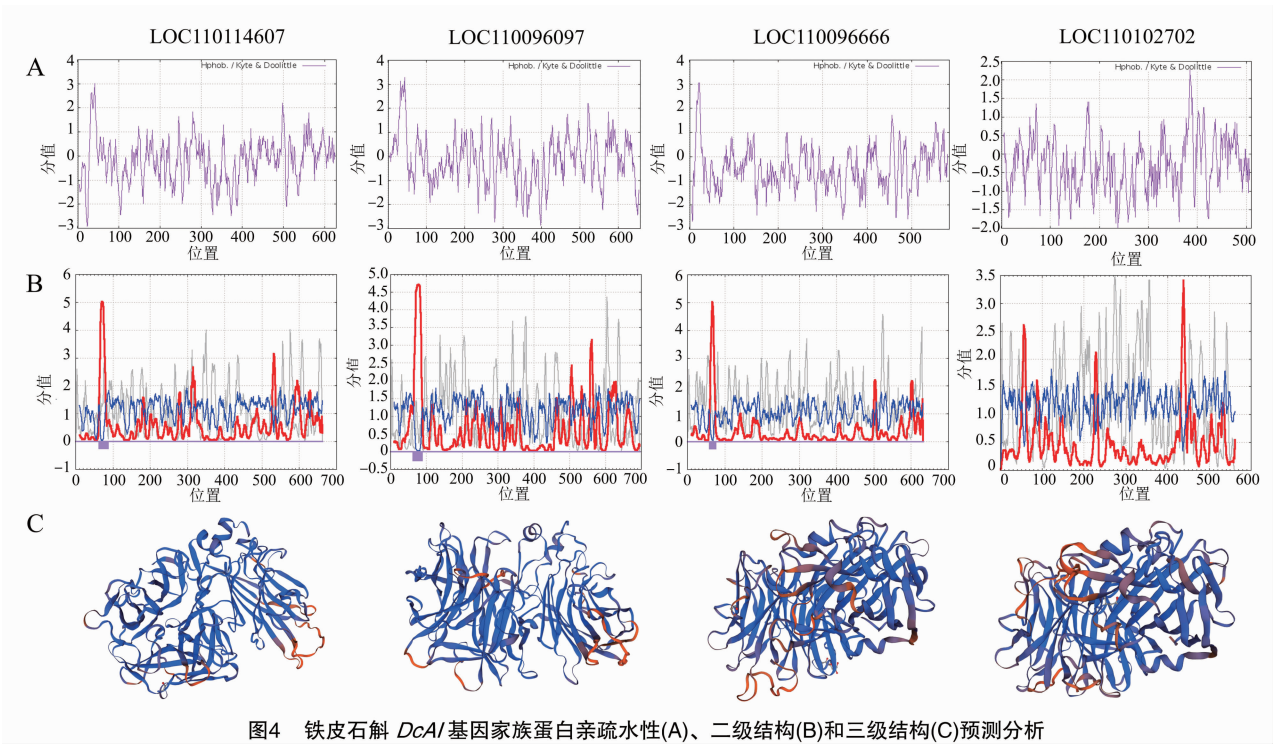


图4 铁皮石斛 *DcAI* 基因家族蛋白亲疏水性(A)、二级结构(B)和三级结构(C)预测分析

到 63.03%、59.51%；LOC110096666 与植物 CWINV 特异性蛋白抑制剂复合物的三级结构更为相近，一致性为 57.58%；而 LOC110102702 与拟南芥 CWINV 的三级结构一致性高达 53.69%。

2.4 *DcAI* 家族成员基因结构及染色体定位分析

DcAIs 基因结构较为保守,其外显子数介于 5 ~ 7 个之间,且基因间内含子序列长度差异较大(图 5)。除 LOC110096666 仅含有 5 个外显子外,其余 *DcAI* 家族成员均含有 6 ~ 7 个外显子,且第 2 个外显子仅由 9 个核苷酸构成,编码天冬氨酸、脯氨酸和天冬酰胺(DPN),进一步证实 AI 基因结构具有高度

保守性。另外,4 个 *DcAI* 基因家族成员中的 LOC110096097、LOC110102702 可转录出 2 种 mRNA,进而编码 2 种同源蛋白,而其余成员均只转录 1 种 mRNA,编码 1 种蛋白质。此外,本研究对 *DcAI* 基因家族成员在染色体骨架上的分布进行了定位(图 6)显示,*DcAIs* 在染色体上的分布并不均匀,其中 LOC110114607、LOC110102702 位于 NW_021318595.1 ~ NW_021318620.1 区域,LOC110096097、LOC110096666 位于 NW_021319083.1 ~ NW_021319983.1 区域,其余染色体区域均不含 *DcAI* 家族基因。

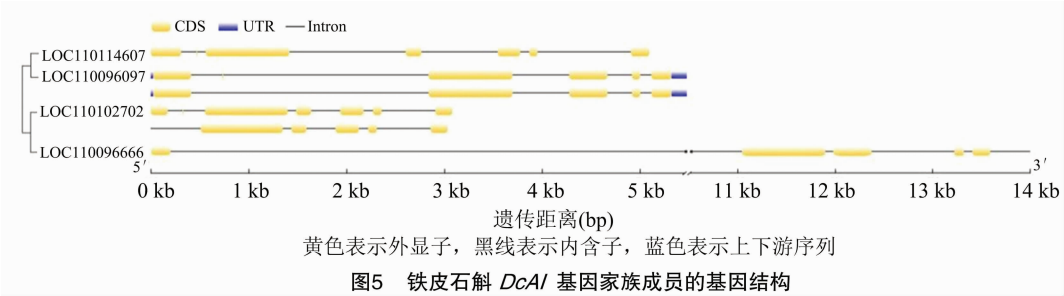


图5 铁皮石斛 *DcAI* 基因家族成员的基因结构

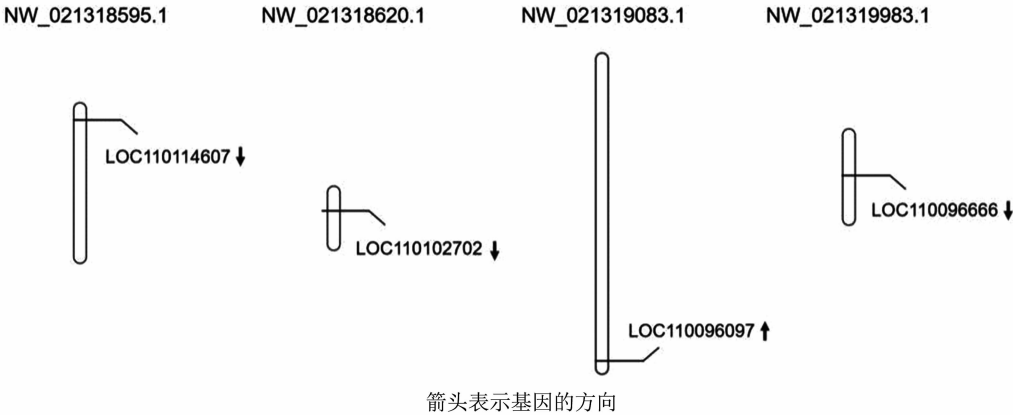


图6 铁皮石斛 *DcAI* 基因家族染色体分布及扩增模式

2.5 *DcAI* 基因家族系统进化关系分析

为了解 *DcAI* 基因家族在进化上的位置和亲缘关系,本研究选取同为单子叶的水稻以及双子叶植物拟南芥、柚子共计 27 个 AINV 进行比较和分析。图 7 显示,植物 AINV 分为细胞壁蔗糖转化酶 (CWINV) 和液泡蔗糖转化酶 (VINV) 2 个亚群,其中 CWINV 亚群共有 19 个成员,包括 2 个 *DcAI* 家族成员 (LOC110096666、LOC110102702)、7 个水稻 AINV、6 个拟南芥 AINV 和 4 个蜜柚 AINV;而 VINV 亚群仅有 8 个成员,且包含 *DcAIs* (LOC110114607 和 LOC110096097)、水稻、拟南芥和蜜柚各 2 个 AINV,说明 VINV 具有高度的保守性,其功能相近或相同。此外,系统发育进化树由若干分支构成,分支之间的聚类关系越近,其发挥的功能也更为相似。CWINV 和 VINV 2 个亚群中的分支均由同为单子叶植物的铁皮石斛 AINV 和水稻 AINV 聚为 1 类,以及同为双子叶植物的拟南芥 AINV 和柚子 AINV 聚类在一起构成;2 个亚群分别包含来自铁皮石斛、水稻、拟南芥和蜜柚的 AINV,表明植物 AINV 在单子叶植物、双子叶植物分化之前就已经发生并执行重要的生物学功能。

2.6 *DcAI* 基因家族启动子顺式作用元件预测分析

为了探究 *DcAI* 基因家族的表达及分子调控机

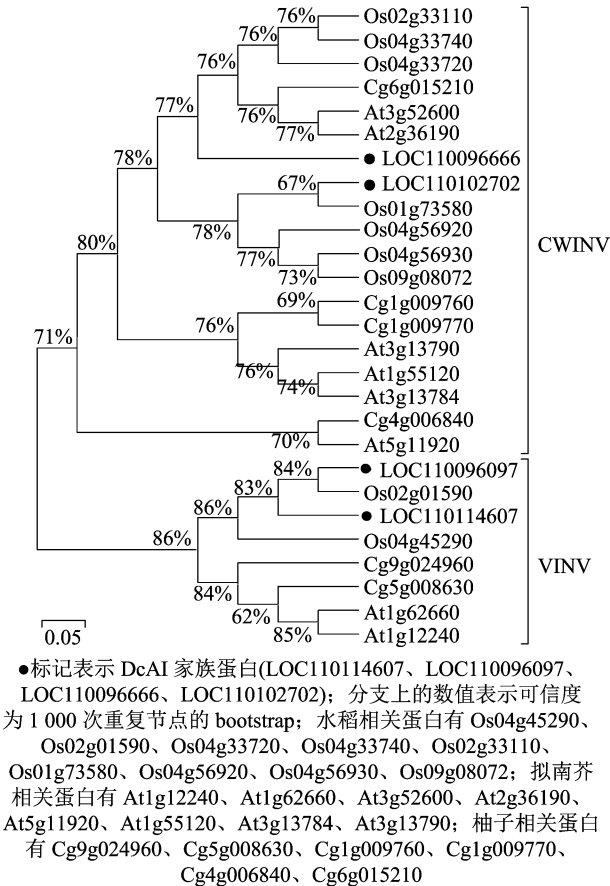
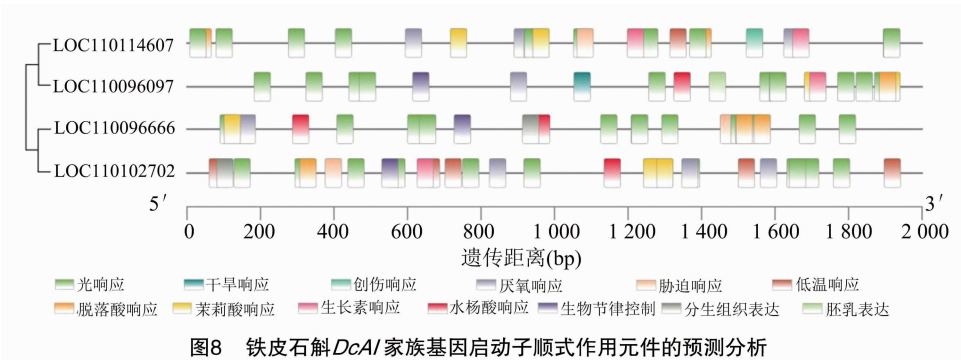


图7 铁皮石斛 *DcAI* 基因家族与其他物种酸性蔗糖转化酶的蛋白系统发育进化分析

制,对 *DcAl*s 基因起始密码子上游 2 000 bp 启动子序列进行预测分析(图 8)。Place CARE 分析结果显示,*DcAl*s 基因启动子区域均含有多种顺式作用元件,主要涉及光响应、胁迫响应、激素响应、代谢调

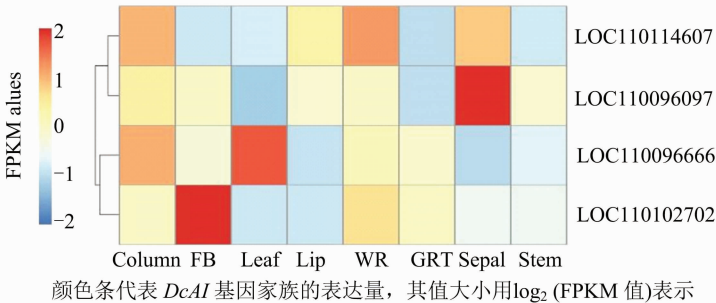
节相关、发育调节相关等生理生化过程,推测 *DcAl*s 可能受多种因素调节参与调控铁皮石斛生长发育、逆境响应、激素诱导和信号转导等一系列过程,在铁皮石斛整个生命进程中发挥着重要作用。



2.7 *DcAl* 基因家族的组织表达特性分析

组织表达分析结果显示,*DcAl* 基因家族成员在铁皮石斛不同组织器官中的相对表达量存在明显差异(图 9)。LOC110114607 在铁皮石斛花柱、萼片和白根中具有较高的表达量,LOC110096666 在花

柱、叶中的表达量最高,而 LOC110096097、LOC110102702 的表达量则分别在花器官的萼片、花蕾中最高。由此可见,*DcAl* 基因家族成员具有明显的组织表达特异性,推测它们在铁皮石斛形态建成、生殖发育等多个生命进程中发挥着重要作用。



2.8 *DcAl* 基因家族在低温处理下的表达情况分析

顺式作用元件预测结果表明,*DcAl*s 基因启动子区域包含大数与逆境胁迫响应相关的元件,其中不乏低温胁迫响应元件(表 4)。对 *DcAl* 基因家族在低温处理下的表达水平及模式进行分析,结果显示,4 个 *DcAl*s 基因的表达模式不尽相同,其中 LOC110114607、LOC110096097 基因在叶、茎、根不

同组织中的表达量随处理时间的增加均呈现正态分布趋势,并在低温处理 6 ~ 9 h 时达到峰值,之后逐渐趋于平缓,表明低温能够诱导这 2 个基因的高效表达(图 10)。LOC110096666、LOC110102702 基因的表达模式基本一致,随着处理时间的增加,在叶、茎中的表达量整体呈下调趋势,在低温处理 12 ~ 24 h 时逐渐恢复至未处理时的表达水平;而在

表 4 铁皮石斛 *DcAl* 基因家族启动子顺式作用元件的预测分析

序号	冷胁迫响应元件名称	所含元件数(个)			
		LOC110114607	LOC110096097	LOC110096666	LOC110102702
1	MYCCONSUSAT	5	6	4	7
2	CBFHV	1	—	2	—
3	CRTDREHVCBF2	—	—	1	—
4	LTRE1HVBTL49	1	—	—	—
5	LTRECOREATCOR15	2	—	3	—

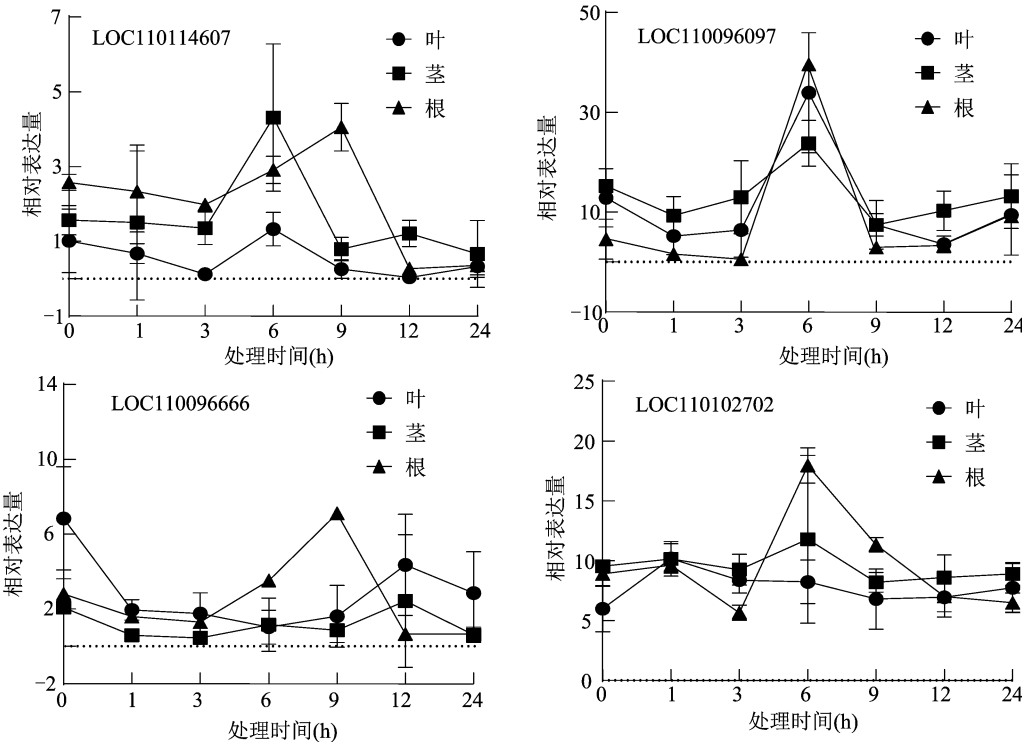
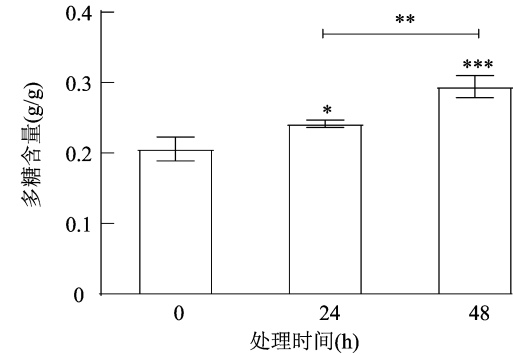


图10 铁皮石斛 *DcAl* 家族基因冷胁迫下的相对表达水平

根组织中则不同,表达量随处理时间的增加呈先升后降的趋势,并在低温处理 6~9 h 时达到最高,提示这 2 个基因在不同组织中对低温胁迫可能采取不同的响应机制。

此外,多糖含量测定结果(图 11)显示,与在正常温度下生长的植株相比,铁皮石斛在低温处理后的多糖含量显著升高,低温处理 24、48 h 的多糖含量分别比未处理的植株提高 3.6%、8.8%,推测 *DcAl*s 基因通过调节自身表达,提高了 AINV 蛋白的活性及稳定性,以增加细胞内可溶性多糖含量,从而在低温胁迫响应过程发挥重要作用。



*、**、*** 分别表示在 0.05、0.01、0.000 1 水平差异显著
图11 冷胁迫处理前后铁皮石斛多糖含量的变化情况

3 讨论与结论

在植物中,蔗糖是光合作用产生的主要贮能物

质,其合成与代谢速率对植物体的生长发育及生物产量均至关重要^[23]。AINV 是植物体内与蔗糖代谢密切相关的关键酶,能够催化蔗糖不可逆地降解形成葡萄糖、果糖,为多糖的合成提供碳源,其活性直接影响植物生长发育全过程的生物量形成和糖分积累^[4,10]。近年来,研究者已经发现并鉴定了多种植物中具有功能的 VINV 基因,它们对于光合产物的转运和积累有重要影响,在植物生长发育、信号转导和逆境抵御过程中起着重要作用^[14,24]。但是目前有关铁皮石斛 *DcAl* 基因家族成员数量及其在逆境胁迫下的表达分析尚无报道。本研究基于已公布的铁皮石斛全基因组数据^[20],利用生物信息学技术共鉴定到 4 个具备 Glyco_hydro_32 结构域的 *DcAl* 基因家族成员,它们均为亲水性蛋白,其氨基酸序列高度保守,具有 AI 催化位点特有的 DNPNG、FRDP 和 WECPD 保守基序^[15,25],符合植物 AINV 基因家族蛋白结构特征。*DcAl*s 基因组长度差异较大,可能是由外显子/内含子数量不同导致的,其中 LOC110114607、LOC110102702 具有 AINV 典型的基因结构,即 7 个外显子、6 个内含子^[26],而 LOC110096097 含有 6 个外显子,LOC110096666 仅有 5 个外显子,推测这 2 个基因可能存在外显子丢失的现象,且与柚子、辣椒、西瓜和甜瓜等物种类似,*DcAl* 基因家族成员不均匀地分布在染色

体上^[16-17,26]。

以往的研究发现,拟南芥 *AINV* 基因家族由 8 个成员组成,其中包括 2 个 *VINV* 和 6 个 *CWINV*^[9];水稻 *AINV* 基因家族包含 9 个成员,其中 2 个为 *VINV*,7 个为 *CWINV*^[14];柚子 *AINV* 基因家族有 6 个成员,包括 2 个 *VINV*、4 个 *CWINV*^[16]。本研究通过与拟南芥、水稻和柚子 *AINV* 基因家族构建蛋白系统进化树,分析 *DcAI* 基因家族蛋白的进化分类关系,结果显示,*DcAI* 基因家族蛋白分布于 2 个亚群,其中 2 个 *DcAIs* 成员 (LOC110114607、LOC110096097) 与同为单子叶植物的水稻 (Os04g45290、Os02g01590) 以及双子叶植物的拟南芥 (At1g12240、At1g62660) 和柚子 (Cg9g024960、Cg5g008630) 均属于 *VINV* 类群,在数量上一致,表明植物 *VINV* 在进化上高度保守,具有相同或相近的生物学功能;而另 2 个 *DcAIs* 成员 (LOC110096666、LOC110102702) 以及拟南芥、水稻和柚子的其他 *AINV* 基因家族蛋白均属于 *CWINV* 类群,推测植物 *AI* 基因在单、双子叶植物分化之前就已经存在。与 *VINV* 亚群不同,*CWINV* 亚群中仅有 2 个 *DcAIs*,数量上与其他物种相差较大,可能是由于铁皮石斛作为药用和观赏性植物,在整个发育过程中并不像水稻、柚子、番茄、西瓜和甜瓜等作物,最终形成以碳源为主、含糖量很高的果实,导致铁皮石斛进化过程中发生 *CWINV* 基因的丢失情况。

AINV 基因家族蛋白作为蔗糖代谢调控的关键酶,在不同物种中的基因数目是不同的,且在不同发育阶段和不同组织器官中的表达具有时间、空间差异,对植物的形态建成和生长发育起着重要作用^[7,27]。拟南芥 *AtCWINV4* 在花中特异性表达,能够促进花蜜的产生^[28];甜高粱 *VINV* 基因 (*SAI-1*) 在茎秆中特异表达,该酶活性与蔗糖的积累呈明显负相关^[29];枸杞 *VINV* 基因 (*LbSAI*) 在叶片、根组织中表达水平偏低,而在花、果柄中的表达量较高,能够促进果实中糖分的积累^[30]。本研究结果与上述研究结论基本一致,*DcAI* 基因家族在铁皮石斛不同组织中的表达丰度不同,存在特异性表达情况,*DcAIs* 基因在花器官的不同组织中具有较高表达水平,LOC110114607、LOC110096666 的表达量分别在根、叶中最高,在其他组织部位中的表达水平也存在明显差异。另外,*DcAIs* 启动子中存在多个与发育调节相关的顺式作用元件,提示 *DcAIs* 在铁皮石斛形态建成、生殖发育等生命进程中发挥重要作用。

此外,植物 *AINV* 作为一个古老而保守的基因家族,除了在糖代谢过程中起到转运、卸载和裂解蔗糖的作用,能加速蔗糖的分解和多糖的积累,为多糖合成提供碳源,在植物信号转导和非生物胁迫响应方面也发挥重要功能^[10,31]。已有研究发现,玉米受干旱胁迫时子房中 *AINV* 基因表达量下调,补充蔗糖后 *ZmCWIN2*、*ZmVIN2* 基因表达量得以恢复^[32];高温能够降低玉米籽粒 *VINV* 活性,阻碍蔗糖水解,导致胚乳淀粉合成量下降^[33]。在低温胁迫下,辣椒 *CaCWINO1*、*CaVINO1* 和 *CaVINO2* 基因的表达量明显提高^[17]。本研究发现,*DcAI* 基因家族在低温处理下表现出不同的表达模式,LOC110114607、LOC110096097 在叶、茎、根不同组织中均随处理时间的增加呈现正态分布的表达趋势;LOC110096666、LOC110102702 随处理时间的增加,在叶、茎中的表达水平呈现先下调后上升的趋势,而在根中则呈先升后降的表达趋势,推测 *DcAIs* 作为功能基因编码不同类型的同工酶,以不同亚型在不同组织中对低温胁迫采取不同的响应机制。值得一提的是,铁皮石斛多糖含量在低温处理后显著升高,提示 *DcAIs* 可能通过调节自身基因表达,提高 *AINV* 蛋白活性,从而提升细胞内可溶性多糖含量,增加细胞内渗透压,降低植株组织含水量,进而提高铁皮石斛的耐低温能力,但具体是哪些基因调控 *DcAIs* 表达的分子机制尚不清楚。因此,*DcAI* 基因家族可作为深入研究铁皮石斛多糖合成代谢及逆境胁迫响应机制的候选基因,为铁皮石斛的遗传改良研究提供理论基础,对培育高产、优质、抗逆的药用铁皮石斛优良品种具有重要意义,该研究也是笔者所在课题组今后的重点研究方向。

参考文献:

- [1] 孙乐,陈晓梅,吴崇明,等. 铁皮石斛多糖药理活性研究进展[J]. 药学学报,2020,55(10):2322-2329.
- [2] 李清,李标,郭顺星. 兰科石斛属植物分子生物学研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(15):2753-2761.
- [3] Li M J, Chen T X, Gao T, et al. UDP - glucose pyrophosphorylase influences polysaccharide synthesis, cell wall components, and hyphal branching in *Ganoderma lucidum* via regulation of the balance between glucose - 1 - phosphate and UDP - glucose[J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 82:251-263.
- [4] Barratt D H P, Derbyshire P, Findlay K, et al. Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(31): 13124-13129.

- [5] 杨 骏, 孟衡玲, 杨生超, 等. 铁皮石斛可溶性糖含量与蔗糖代谢酶活性的相关性研究[J]. 西部林业科学, 2012, 41(2): 62–67.
- [6] Ruan Y L, Ye J, Yang Y J, et al. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat[J]. Molecular Plant, 2010, 3(6): 942–955.
- [7] Sergeeva L I, Keurentjes J J B, Bentsink L, et al. Vacuolar invertase regulates elongation of *Arabidopsis thaliana* roots as revealed by QTL and mutant analysis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(8): 2994–2999.
- [8] 赵杰堂. 蔗糖转化酶在高等植物生长发育及胁迫响应中的功能研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2016, 24(3): 352–358.
- [9] Verhaest M, Lammens W, le Roy K, et al. X-ray diffraction structure of a cell-wall invertase from *Arabidopsis thaliana* [J]. Acta Crystallographica (Section D: Biological Crystallography), 2006, 62(12): 1555–1563.
- [10] Radha J, Singh S P, Singh A, et al. Soluble acid invertase (SAI) activity and gene expression controlling sugar composition in sugarcane[J]. Sugar Technology, 2017, 19(6): 669–674.
- [11] Unger C, Hardegger M, Lienhard S, et al. cDNA cloning of carrot (*Daucus carota*) soluble acid beta-fructofuranosidases and comparison with the cell wall isoenzyme [J]. Plant Physiology, 1994, 104(4): 1351–1357.
- [12] Klann E, Yelle S, Bennett A B. Tomato fruit acid invertase complementary DNA[J]. Plant Physiology, 1992, 99(1): 351–353.
- [13] Schwebel – Dugué N, El Mili N, Krivitzky M, et al. *Arabidopsis* gene and cDNA encoding cell-wall invertase [J]. Plant Physiology, 1994, 104(2): 809–810.
- [14] Ji X M, van den Ende W, van Laere A, et al. Structure, evolution, and expression of the two invertase gene families of rice[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2005, 60(5): 615–634.
- [15] 韩玉慧, 陈 琴, 张 会, 等. 棉花蔗糖转化酶基因家族的生物信息学分析[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(11): 15–30.
- [16] 邓舒雅, 麦贻婷, 陈惠萍, 等. 无籽蜜柚蔗糖合成酶(SUS)和蔗糖转化酶(INV)基因家族生物信息学及表达分析[J]. 植物生理学报, 2018, 54(10): 1576–1586.
- [17] 魏华伟, 柴松琳, 胡克玲, 等. 辣椒酸性蔗糖转化酶基因家族鉴定及表达[J]. 分子植物育种, 2019, 17(15): 4900–4907.
- [18] Ruan Y L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling[J]. Annual Review of Plant Biology, 2014, 65(1): 33–67.
- [19] 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.
- [20] Zhang G Q, Xu Q, Bian C, et al. The *Dendrobium catenatum* Lindl. genome sequence provides insights into polysaccharide synthase, floral development and adaptive evolution[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 19029.
- [21] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194–1202.
- [22] Zhang G Q, Liu K W, Li Z, et al. The *Apostasia* genome and the evolution of orchids[J]. Nature, 2017, 549(7672): 379–383.
- [23] Zhang B C, Tolstikov V, Turnbull C, et al. Divergent metabolome and proteome suggest functional independence of dual phloem transport systems in cucurbits [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(30): 13532–13537.
- [24] 赵建华, 李浩霞, 尹 跃, 等. 枸杞酸性转化酶基因的克隆与表达[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1140–1148.
- [25] Lammens W, le Roy K, van Laere A, et al. Crystal structures of *Arabidopsis thaliana* cell-wall invertase mutants in complex with sucrose[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 377(2): 378–385.
- [26] 熊思亦, 张聪聪, 马荣雪, 等. 西瓜、甜瓜蔗糖转化酶基因家族鉴定及表达分析[J/OL]. 分子植物育种. (2021–05–08) [2021–11–20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210508.1524.016.html>.
- [27] Liu Y, Dun B Q, Zhao X N, et al. Correlation analysis between the key enzymes activities and sugar content in sweet sorghum (*Sorghum Bicolor* L. Moench) stems at physiological maturity stage [J]. Australian Journal of Crop Science, 2013, 7(1): 84–92.
- [28] Ruhlmann J M, Kram B W, Carter C J. Cell wall invertase 4 is required for nectar production in *Arabidopsis* [J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(2): 395–404.
- [29] Liu Y, Nie Y D, Han F X, et al. Allelic variation of a soluble acid invertase gene (*SAI-1*) and development of a functional marker in sweet sorghum [*Sorghum Bicolor* (L.) Moench] [J]. Molecular Breeding, 2014, 33(3): 721–730.
- [30] 王丽娟, 赵 辉, 王彦才, 等. 枸杞酸性转化酶基因的克隆及组织表达分析[J]. 北方园艺, 2014(1): 86–90.
- [31] Li R J, Hou Z Q, Zou H, et al. Inactivation kinetics, structural, and morphological modification of mango soluble acid invertase by high pressure processing combined with mild temperatures [J]. Food Research International, 2018, 105: 845–852.
- [32] McLaughlin J E, Boyer J S. Sugar-responsive gene expression, invertase activity, and senescence in aborting maize ovaries at low water potentials[J]. Annals of Botany, 2004, 94(5): 675–689.
- [33] Cheikh N, Jones R J. Heat stress effects on sink activity of developing maize kernels grown *in vitro* [J]. Plant Physiology, 2006, 95(1): 59–66.