

# 霍山石斛托品酮还原酶基因的克隆及其表达分析

林榕燕<sup>1,2,3</sup> 叶秀仙<sup>1,2,3\*</sup> 钟淮钦<sup>1,2,3</sup> 黄敏玲<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>福建省农业科学院作物研究所, 福州 350013; <sup>2</sup>福建省农业科学院花卉研究中心, 福州 350013;

<sup>3</sup>福建省特色花卉工程技术研究中心, 福州 350013)

**摘要** 为了探究托品酮还原酶(tropinone reductase, *TR*)基因在石斛中的功能, 该研究采用RT-PCR结合RACE技术, 以霍山石斛原球茎为材料, 克隆得到霍山石斛*TR-I*基因的cDNA序列, 其在GenBank中的登录号为KY912085。 *TR-I*基因的cDNA长1 043 bp, 包含一个完整的共807 bp的ORF(open reading frame)(79-885), 共编码268个氨基酸。生物信息学分析表明, 该蛋白质可能是一种疏水性稳定蛋白质, 无信号肽, 不含卷曲螺旋结构, 具有14个功能位点、47个潜在磷酸化位点, 其二级结构由螺旋、折叠和卷曲结构组成。系统进化树分析表明, 霍山石斛*TR-I*与铁皮石斛、金钗石斛的亲缘关系较近, 处于同一分支。qPCR结果显示, *TR-I*基因在霍山石斛不同生长期的相对表达量均表现为茎>叶>根, 且茎和叶中*TR-I*的表达量均随着生长期的延长呈现低-高-低的变化趋势; 在不同品种中, 金钗石斛的*TR-I*基因相对表达量最高, 铁皮石斛中最低; 不同浓度茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)处理比较, 100 μmol/L茉莉酸甲酯处理下*TR-I*基因表达量最高, 推测该基因可能参与霍山石斛生物碱的合成途径。

**关键词** 霍山石斛; 托品酮还原酶; 基因克隆; qPCR

## Cloning and Expression Analysis of Tropinone Reductase Gene from *Dendrobium huoshanense*

Lin Rongyan<sup>1,2,3</sup>, Ye Xiuxian<sup>1,2,3\*</sup>, Zhong Huaqin<sup>1,2,3</sup>, Huang Minling<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Crop Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;

<sup>2</sup>Flower Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;

<sup>3</sup>Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou 350013, China)

**Abstract** In this study, the cDNA of tropinone reductase (*TR*) gene was successfully cloned from the protocorm of *Dendrobium huoshanense* by RT-PCR and RACE to explore the function of tropinone reductase, its accession number was KY912085 in GenBank. The full-length of *TR-I* gene was 1 043 bp, containing a 807 bp open reading frame (ORF) encoding 268 amino acids. Bioinformatics analysis showed that the protein might be a stable hydrophobic protein, with 14 functional sites and 47 potential phosphorylation sites and without signal peptide and coil helix. The secondary structure was composed of helixes, sheets and coils. The phylogenetic tree analysis showed that the protein had closest relationship with *TR-I* of *Dendrobium catenatum* and *Dendrobium*

收稿日期: 2017-05-16 接受日期: 2017-07-25

福建省农业科学院作物研究所青年开放基金项目(批准号: 2015QN-4)、福建省省属公益类科研院所专项(批准号: 2015R1026-8)、福建省农业科学院科技创新项目(批准号: 2015CX-1)和福建省农业科学院科技创新团队建设(批准号: 2016PI-39)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0591-87573019, E-mail: huangml618@163.com; Tel: 13559144511, E-mail: yxx7861@163.com

Received: May 16, 2017 Accepted: July 25, 2017

This work was supported by the Youth Open Fund of Crop Research Institute by Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.2015QN-4), the Public Welfare Foundation of Fujian Province (Grant No.2015R1026-8), the Project of Technology Innovation by Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.2015CX-1) and the Development of Technology Innovation by Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.2016PI-39)

\*Corresponding author. Tel: +86-591-87573019, E-mail: huangml618@163.com; Tel: +86-13559144511, E-mail: yxx7861@163.com

网络出版时间: 2017-08-16 16:46:54 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170816.1646.002.html>

*nobile*, at the same branch. qPCR results indicated that the relative expression of *TR-I* gene was stems>leaves>roots in all stages, the expression levels of *TR-I* in stems and leaves appeared the tendency of low-high-low with the prolong of growth. Among the different varieties, the expression level of *Dendrobium nobile* was the highest and *Dendrobium catenatum* the lowest. Under the conditions in different concentrations of methyl jasmonate (MeJA), the highest expression level appeared when the adding concentration was at 100  $\mu\text{mol/L}$ . The results suggested that the gene might be involved in the synthesis of alkaloids in *Dendrobium huoshanense*.

**Keywords** *Dendrobium huoshanense*; tropinone reductase; gene cloning; qPCR

霍山石斛(*Dendrobium huoshanense*)是兰科石斛属多年生草本植物,也是国家重点保护的珍稀药材<sup>[1]</sup>。霍山石斛药用价值高,素有“健康软黄金”的美称<sup>[2]</sup>,是众多保健药品和保健食品的主要来源之一<sup>[3]</sup>,近年来需求量也在不断增加。但是霍山石斛对生长条件要求十分苛刻,野生资源自然分布区域相对狭窄,加上人工的过度采挖,其野生资源已濒临灭绝<sup>[4]</sup>。次生代谢产物是植物正常生长发育过程中非必需的一大类小分子化合物,是植物在环境作用下长期进化的一种表现结果<sup>[5]</sup>。随着研究的不断深入,次生代谢产物在植物生命活动中的重要性也显现出来。植物次生代谢产物不仅具有重要的生物学和生态学意义<sup>[6-7]</sup>,还具有重要的药用价值<sup>[8]</sup>。不少植物的药用有效成分是其次生代谢过程中的产物,如石斛属<sup>[9]</sup>植物中的生物碱、萜类、联苜类;金丝桃属<sup>[10]</sup>植物中的二萜酮类、类黄酮类;间苯三酚和银杏<sup>[11]</sup>植物中的银杏内酯等。近几十年来,科技人员对霍山石斛进行了大量的研究,特别是组织培养技术<sup>[12-13]</sup>、化学成分测定<sup>[14]</sup>、资源鉴定<sup>[15]</sup>等方面,但有关霍山石斛相关基因功能的研究还较少,而基因工程技术能够为植物的改良提供理论依据和物质基础。因此,通过基因工程手段提高次生代谢产物含量具有意义重大。

托品酮还原酶(tropinone reductase, TR)是一种立体专一性依赖NADPH的还原酶<sup>[6]</sup>,是托品酮代谢途径中的分支点,分为TR-I和TR-II两种类型。TR-I将托品酮还原成托品,TR-II催化托品酮生成假托品。TR-I和TR-II是短链脱氢酶家族(short-chain dehydrogenase family, SDR)中的成员<sup>[17]</sup>,目前,TR基因已经从金钗石斛(*Dendrobium nobile*, AFD23287.1)<sup>[18]</sup>、颠茄(*Atropa belladonna*, AFP55030.1)<sup>[19]</sup>、马铃薯(*Solanum tuberosum*, CAC34420.1)<sup>[20]</sup>、三分三(*Anisodus acutangulus*, ACB71202.1)<sup>[21]</sup>和天仙子(*Hyoscyamus niger*, BAA13547.1)<sup>[22]</sup>等多种植物中克隆出来。有研究表明,TR是提高生物碱含量的关键酶,在植物生物碱的生物合成方面

具有重要的调控作用<sup>[19]</sup>。在茄科等植物中的TR能够催化托品酮,托品酮经TR-I催化后生成托品醇最终生成莨菪碱和东莨菪碱,托品酮经TR-II催化后生成假托品醇最终产物为旋花碱<sup>[23]</sup>。在金钗石斛(*Dendrobium nobile*)次生代谢产物的研究中发现,*DnTR-I*是生物碱合成过程中的关键酶基因,其表达量的增加将有力地促进生物碱的合成和积累<sup>[24]</sup>。因此,本研究采用RT-PCR结合RACE技术克隆得到霍山石斛托品酮还原酶-I(*TR-I*)基因的全长cDNA,并进行了生物信息学分析和定量表达分析,为后续霍山石斛*TR-I*基因的功能验证研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以继代培养50 d的霍山石斛原球茎为材料进行*TR-I*基因的克隆。以继代培养1年的试管苗及移栽培养1年、2年和3年驯化苗的根、茎、叶和继代培养半年的霍山石斛、金钗石斛、铁皮石斛、鼓槌石斛无根试管苗以及不同浓度茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)处理下的霍山石斛原球茎为材料,进行基因的定量表达分析。

### 1.2 方法

1.2.1 霍山石斛原球茎RNA的提取及cDNA第一链的合成 采用通用植物总RNA提取试剂盒(BioTeke公司)进行霍山石斛原球茎总RNA提取,总RNA经1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,经分光光度计检测其纯度。而后直接用于cDNA第一链的合成或置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。保守区扩增以及3' RACE cDNA第一链的合成均使用PrimeScript<sup>TM</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒(TaKaRa公司),采用AP接头作为引物进行逆转录,产物于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 霍山石斛*TR-I*基因保守区引物设计及PCR扩增 从NCBI上下载金钗石斛(*Dendrobium nobile*,

JQ063457.1)、铁皮石斛(*Dendrobium catenatum*, XM\_020847000.1)的*TR-I*基因序列, 根据同源克隆的原则设计基因保守区的上下游引物TR-I-F和TR-I-R(图1下划线所示和表1), 以逆转录的保守区cDNA第一链为模板, 进行PCR扩增。PCR扩增程序为: 94 °C预变性4 min; 94 °C变性45 s, 57 °C退火50 s, 72 °C延伸50 s, 共35个循环; 最后72 °C延伸10 min。PCR扩增产物通过琼脂糖(1%)电泳进行检测。目的片段经回收、连接、克隆和转化后, 阳性克隆子送上海铂尚生物公司完成测序。

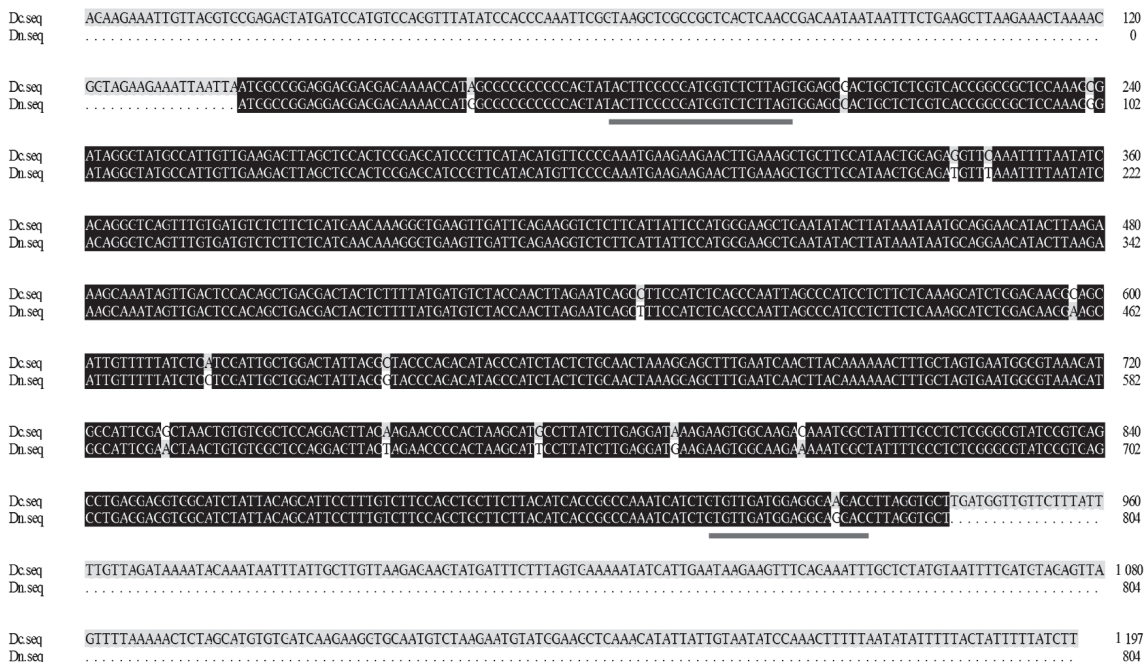
**1.2.3 霍山石斛*TR-I*基因3' RACE引物设计及PCR扩增** 根据*TR-I*基因保守区的测序结果设计两条顺式特异引物TR-I-3'-1和TR-I-3'-2(表1), 以逆转录的保守区cDNA第一链为模板, AUAP为下游引物, 进行第一轮巢式PCR。将第一轮扩增产物进行适当稀释作为第二轮PCR扩增模板, 同样以AUAP为下游引物, 进行第2轮PCR扩增。PCR反应程序除退火温度改为52 °C及72 °C延伸时间改为1 min外, 其余PCR扩增参数和后续步骤同保守区克隆。

**1.2.4 霍山石斛*TR-I*基因5' RACE引物设计及PCR扩增** 根据*TR-I*基因保守区的测序结果设计两条5' RACE的反向特异引物TR-I-5'-1和TR-I-5'-2(表1), 5'

RACE cDNA的逆转录是在cDNA第一链基础上进行纯化和加尾。以加尾产物作为第一轮PCR扩增的模板, AAP为下游引物, 进行巢式PCR。将第一轮扩增产物进行适当稀释作为第二轮PCR扩增模板, AUAP作为下游引物进行第二轮PCR扩增。PCR反应程序除两轮退火温度改为51 °C外, 其余参数及后续步骤同保守区克隆。

**1.2.5 霍山石斛*TR-I*基因全长的拼接及ORF(open reading frame)验证** 所有测序结果经GenBank的Blast验证序列的同源性。将获得的的目的基因的5' RACE序列、ORF验证序列及3' RACE序列采用DNAMAN软件进行拼接, 得到该基因的cDNA全长, 并在ORF外或起始密码子和终止密码子处分别设计一对引物(表1), 用于ORF的扩增。以逆转录的保守区cDNA第一链为模板, 进行PCR反应。PCR反应程序除退火温度改为55 °C和72 °C延伸时间改为1 min外, 其余参数及PCR产物的回收纯化、目的片段连接、转化及测序同保守区克隆。

**1.2.6 生物信息学分析** 参照林榕燕等<sup>[25]</sup>的分析方法, 利用在线ExPASy蛋白质分析软件ProtParam、ProtScale、COIL、SWISS-MODEL对蛋白质进行理化性质分析和卷曲结构、三维结构预测; 利用在线



Dc: 铁皮石斛; Dn: 金钗石斛。

Dc: *Dendrobium catenatum*; Dn: *Dendrobium nobile*.

图1 霍山石斛*TR-I*保守区引物设计

Fig.1 Primer designing of conservative regions of *TR-I* in *Dendrobium huoshanense*

表1 霍山石斛*TR-I*基因克隆及荧光定量PCR所用引物Table 1 The primers used in *TR-I* clone and fluorescent quantitation PCR in *Dendrobium huoshanense*

作用 Function	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
Reverse transcription primer	AP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(T)17-3'
Anchored primer	AAP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(G)8-3'
	AUAP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'
For the conserved fragment	TR-I-F	5'-ACT TCG CCG ATG GTC TCT TAG T-3'
	TR-I-R	5'-GGT CCT CCC TCC ATC AAC AC-3'
3' RACE	TR-I-3'-1	5'-CTC TGC AAC TAA AGG AGC TTT GAA TC-3'
	TR-I-3'-2	5'-CCC ACT AAG CAT GCC TTA TCT TGA GG-3'
5' RACE	TR-I-5'-1	5'-CCT CAA GAT AAG GCA TGC TTA GTG GG-3'
	TR-I-5'-2	5'-GAT TCA AAG CTC CTT TAG TTG CAG AG-3'
For the cDNA of ORF	TR-I-ORF-F	5'-AAT GGC CGG AGG AGG TGG AGA AAA CC-3'
	TR-I-ORF-R	5'-GAA CAA TCA TTA AGC ACC TAA GGT CC-3'
For the internal control	18SrRNA-F	5'-CCT GAG AAA CGG CTA CCA CAT-3'
	18SrRNA-R	5'-CAC CAG ACT TGC CCT CCA-3'
For the expression of <i>TR-I</i>	TR-I-RT-F	5'-TTC CAT CTC AGC CAA TTA GCC CAT-3'
	TR-I-RT-R	5'-GAT TCA AAG CTC CTT TAG TTG CAG AG-3'

CBS Prediction Servers蛋白质分析软件中的SignalP、TMHMM、NetPhos对蛋白质进行信号肽、跨膜结构预测和磷酸化位点分析; 利用在线PSORT软件进行亚细胞定位; 利用NCBI的Conserved Domain Search在线软件进行蛋白质保守结构域的预测; 利用PredictProtein对该蛋白质的功能位点和二级结构进行预测; 利用MEGA5.0软件构建系统进化树。

1.2.7 霍山石斛*TR-I*基因定量表达分析 本研究采用SYBR Premix Ex Taq™试剂(TakaRa公司)和ABI7500实时荧光定量PCR仪器(美国ABI公司), 以18SrRNA为内参基因, 检测目的基因*TR-I*在不同品种石斛试管苗、不同时期霍山石斛根、茎、叶及不同浓度茉莉酸甲酯处理2 d条件下原球茎中的相对表达量。具体操作流程参照林玉玲等<sup>[26]</sup>的研究, 每个反应包括3个重复。

## 2 结果

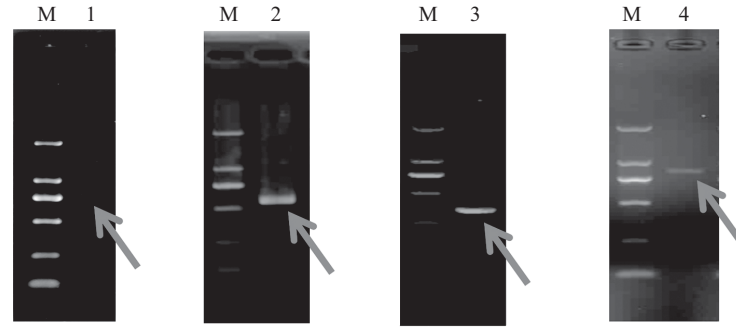
### 2.1 霍山石斛*TR-I*基因cDNA全长序列的获得

采用通用植物总RNA提取试剂盒提取的霍山石斛原球茎总RNA, 质量较好。以总RNA直接逆转录合成的保守区cDNA第一链为模板, 采用相应的引物分别进行*TR-I*保守区的PCR扩增, *TR-I*基因保守区扩增结果得到751 bp的特异性条带, 片段大小均与预期目的条带一致。根据保守区序列设计引物, 进行5'和3'扩增, 经测序后为622 bp和342 bp, 扩增结果得到与

预期目的条带大小一致的特异性条带。将所获得的*TR*基因的3' RACE序列、保守区序列和5' RACE序列分别进行拼接, 得到一条长度为1 043 bp的cDNA全长序列, 而后根据拼接的全长序列设计相应的ORF验证引物, 以霍山石斛原球茎保守区cDNA为模板进行PCR扩增验证, 扩增得到817 bp的特异性条带(图2), 测序结果在GenBank数据库中在线进行Blast比对。结果表明, 所得片段为霍山石斛*TR-I*基因序列。该cDNA全长1 043 bp, 包含78 bp的5' UTR、一个完整的共807 bp的ORF(79-885)以及158 bp的3' UTR(含poly A)。该cDNA序列共编码268个氨基酸, 已登录GenBank, 登录号为KY912085。*TR-I*基因cDNA的核苷酸序列及推导的氨基酸序列见图3, 起始密码子以下划线标注, 终止密码子以星号标注。

### 2.2 霍山石斛*TR-I*基因编码蛋白质的结构与特性分析

利用ProtParam对霍山石斛*TR-I*蛋白质进行理化性质分析发现, 该蛋白质由268个氨基酸组成, 分子量为28 314.34, 理论等电点为6.17, 由20种氨基酸组成, 其中Ala、Gly和Leu所占比重较大, 比例分别为10.8%、10.8%和10.4%, Trp含量最低。负电荷氨基酸残基总数为25, 正电荷的总数为22, 分子式为C<sub>1249</sub>H<sub>1998</sub>N<sub>344</sub>O<sub>383</sub>S<sub>11</sub>, 原子总数为3 985。预测结果还显示, 该蛋白质不稳定系数为37.22, 低于域值40, 是一个稳定蛋白质; 脂肪系数为96.90; 总平均疏



M: DL2000 marker; 1: 保守区扩增产物; 2: 5' RACE扩增产物; 3: 3' RACE扩增产物; 4: ORF扩增产物。箭头所示为目的片段。

M: DL2000 marker; 1: amplified product of conservative region; 2: amplified product of 5' RACE; 3: amplified product of 3' RACE; 4: amplified product of ORF. The arrow shows target fragment.

图2 霍山石斛TR-I基因的克隆

Fig.2 Cloning of TR-I gene in *Dendrobium huoshanense*

```

1      TGTAAAGCTGGCCGCTCACTCAACCGACAAATAAATTTCTGAAGCTTAAGAACTAAAA
61     GCCAGAAGAAATTAATTAATGGCCGGAGGAGGTGGAGAAACCAATGGCCGGCCGCGCAGT
21     M A G G G G E N H G A A A S
121    ATACTTGGCCGATGGTCTCTTAGTGGAGCCACTGCTCTCGTACGCGGGCTCCAAAGGG
41     I L R R W S L S G A T A L V T G G S K G
181    ATAGGGTATGCCATTGTTGAAGAGTTAGCTGCACCTGGAGCATCCGTTACATAGTTCC
61     I G Y A I V E E L A A L G A S V H T C S
241    CGAAATGAAGAAAGAACTGAAAGCTGCTTGCATAAGTGGAGAGTTAAATTTAATATC
81     R N E E E L E S C L H K W R G L N F N I
301    ACAGGCTCAGTCTGTGATGCTCTTCTCATGAACAAAGGTTGAAGTTCATTGAGAAAGTTC
101    T G S V C D V S S H E Q R V K L I E K V
361    TCTTCATTATCCATGGGAAGCTGAATATACTTAATAAATGACGGAACATCTTAAGA
121    S S L F H G K L N I L I N N A G T Y L R
421    AAGCAAATAGTTGACTCCAGCTGAGGACTACTTTTATGATGCTACCAACTTAGAA
141    K Q I V D S T A E D Y S F M M S T N L E
481    TCACTTTCTATCTCAGGAAATTAAGCCATCCCTCTCTCAAAGCATCTGGAGAAGTAGC
161    S A P H L S Q L A H P L L K A S G E G S
541    ATTGTTTTATCTCTCGATTGCTGCACTAGTGGCTACCCAGACATAGCCATCTACTCT
181    I V F I S S I A G L V G Y P D I A I Y S
601    CCAACTAAAGGACCTTGAATCAACTACAAAACCTTTGCTAGTCAATGGGTAAAGAT
201    A T K G A L N Q L T K N F A S E W G K D
661    GCATTCAGCTAAGTCTGTGGCTCCAGGATTAACAAGACCCACTAAGCATGCCATTAT
221    G I R A N C V A P G V T R T P L S M P Y
721    CTTGAGGATAAAGAGTGGCAAAAATATGGCTATTTGGCTCGGGCGTATCGGTGAG
241    L E D K E V A K N M A I L P L G R I G E
781    CCTGAGGAGTGGCATCTATACAGCAATCTTTGTCTCCAGCTGCTCTTACATCAAC
261    P B E V A S I T A F L C L P A A S Y I T
841    GGCCAAATCATCTGTGTGATGGAGGGAGGACCTTAGTGTCTTAATGATGTTCTTATT
281    G Q I I C V D G R T L G A *
901    TTGTTAGATAAAATACAAATAATTTGTCTCTTGAGAGAAACATTTCTCTATGACTT
961    GTTGAAGCTGTTTACTGAAAATATCATTGAATAAGAGCTTCAGAAAATTTCTCTAA
1.021  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图3 霍山石斛TR-I基因cDNA的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.3 The complete cDNA sequence of TR-I and its predicted amino acid sequence in *Dendrobium huoshanense*

水指数(GRAVY)为0.103, 表明它是一个疏水蛋白质。利用ProtScale对蛋白质的亲水性和疏水性进行预测, 结果表明, 在第159个氨基酸表现为疏水性最强, 为2.256; 在第55个氨基酸表现为亲水性最强, 为-2.300, 并且疏水氨基酸的数量大于亲水氨基酸的数量, 所以推断TR-I为疏水性蛋白质, 其结果与ProtParam软件中预测的一致。

利用TMHMM工具对霍山石斛TR-I的跨膜结构进行预测, 结果表明, TR-I的跨膜螺旋氨基酸期望值为3.051 23, 远小于18, 因此该蛋白质不可能是一个跨膜蛋白。利用COILS对霍山石斛TR-I进行蛋白质卷曲螺旋预测, 结果显示, 霍山石斛TR-I不能形成卷曲螺旋结构。运用SignalP 4.1 Server对霍山石斛TR-I的信号肽进行预测, 结果显示, 霍山石斛TR-I不

含有信号肽。运用PSORT软件对霍山石斛TR-I的亚细胞定位进行预测, 结果表明, 霍山石斛TR-I定位于细胞质的可能性最大, 为65.0%。其次是叶绿体类囊体膜, 可能性为28.0%。定位于叶绿体基质和叶绿体类囊体空间的可能性较低, 均为20.0%。由此可以推测, 该蛋白质主要在细胞质中参与代谢活动。

蛋白质磷酸化是蛋白质翻译后修饰的重要内容之一, 其对蛋白质活力和功能有着重要的调节和控制作用<sup>[27]</sup>。利用NetPhos 3.1 Server预测霍山石斛TR-I潜在磷酸化位点, 结果表明, 在多肽链中可能发生磷酸化的有丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)和酪氨酸(Tyr), 其中以丝氨酸磷酸化位点最多, 有26个, 预测的最高分达到0.994, 在第20位氨基酸处; 其次是苏氨酸, 达到14个磷酸化位点, 预测的最高分达

到0.870, 在第29位氨基酸处; 酪氨酸的磷酸化位点有7个, 在第37、112、125、167、173、214、252位氨基酸处, 第125位氨基酸处预测的分最高, 达到0.841。

通过PredictProtein在线软件对霍山石斛TR-I蛋白质功能位点进行预测与分析。结果表明, 该蛋白质含一个N-糖基化位点, 位于73-76位氨基酸段; 一个A激酶磷酸化位点, 位于17-20位氨基酸段; 5个酪蛋白激酶II磷酸化位点, 分别位于54-57、77-80、82-85、120-123、131-134位氨基酸段; 6个N-肉豆蔻酰化作用位点, 分别位于4-9、10-15、30-35、69-74、195-200、255-260位氨基酸段; 一个短链脱氢酶/还原酶家族信号位点, 位于160-188位氨基酸段。

通过NCBI-CDS在线软件分析霍山石斛TR-I的保守结构域, 结果发现, 该蛋白质属于SDR超级家族, 即短链脱氢酶/还原酶家族, 其氨基酸序列中存在典型的短链脱氢酶(TR-SDR-c)特征性结构域, 含有一个结构上保守的Rossmann折叠结构和NAD(P)结合区域。

利用PredictProtein对霍山石斛TR-I的二级结构进行分析, 结果发现, TR-I的结构由螺旋、折叠和卷曲组成。在整个蛋白质中, 螺旋结构和卷曲结构所占比例较大, 分别为50.37%和33.96%, 而折叠结构只占15.67%。利用SWISSMODEL对霍山石斛TR-I的三维结构进行预测, 从模型可以看出该蛋白质的主要结构元件是螺旋、折叠和卷曲(图4)。

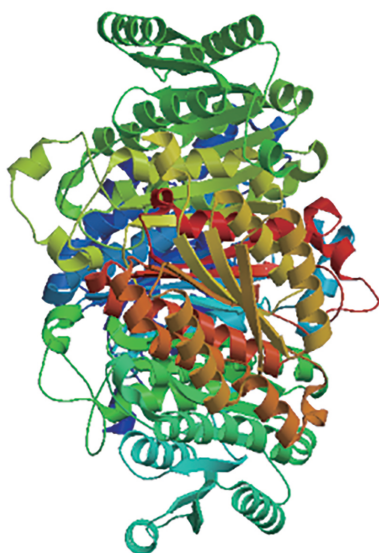


图4 霍山石斛TR-I蛋白三维结构预测

Fig.4 Prediction of three-dimensional structure of TR-I in *Dendrobium huoshanense*

### 2.3 霍山石斛TR-I基因编码蛋白质的序列比对与进化分析

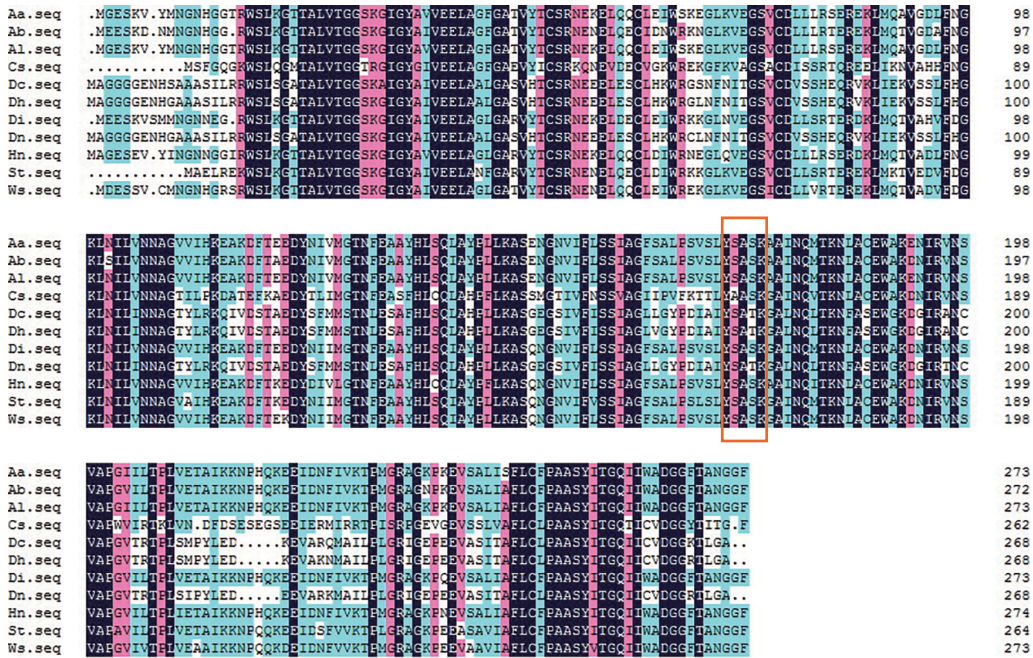
从NCBI数据库中下载10种不同物种的TR-I氨基酸序列, 分别为三分三、颠茄、铃铛子(*Anisodus luridus*, AGL76989.1)、旋花(*Calystegia sepium*, CAD20555.1)、曼陀罗(*Datura innoxia*, AIN39992.1)、铁皮石斛(*Dendrobium catenatum*, XP\_020702659.1)、金钗石斛、天仙子、马铃薯以及睡茄(*Withania somnifera*, AGY46257.1), 利用DNANAN软件对包括霍山石斛(*Dendrobium huoshanense*, KY912085)在内的11种植物进行序列多重比对分析。用不同颜色深浅背景来表示其一致性的高低, 颜色越深一致性越高, 一致性最高的地方可能存在着重要功能结构域。分析结果表明, 不同植物的TR-I之间具有较高的一致性, 其一致性达到78.43%。同时发现, 霍山石斛TR-I的功能结构域氨基酸组成与其他植物几乎一致, 即都含有YxxxK保守结构域(图5方框所示)。

采用MEGA5.0软件构建TR-I的系统进化树, 进化树中数字代表bootstrap值, 重复检测1 000次。从进化树结果可以看出, 序列被分为2个大的分支, 茄科等8个产莨菪碱物种为一个分支, 其他包括霍山石斛在内的6种非产莨菪碱物种为另一分支, 该分支中又可分为2大类, 分别为单子叶和双子叶植物。霍山石斛TR-I首先与铁皮石斛、金钗石斛处于同一分支, 它们的亲缘关系最近, 其次是与菠萝的亲缘关系(图6)。

### 2.4 霍山石斛TR-I基因定量表达分析

为了研究托品酮还原酶基因在霍山石斛中的时空表达差异, 我们分别提取了霍山石斛不同生长阶段苗的根、茎、叶的RNA, 逆转录得到cDNA, 利用荧光定量PCR分析基因的相对表达量。在溶解曲线和扩增曲线满足实验要求的前提下, 以18S rRNA为内参基因, 检测TR-I基因的表达水平, 其相对表达量见图7。TR-I基因在不同时期霍山石斛不同组织中的相对表达量均表现为茎>叶>根; 且茎和叶中TR-I的表达量均随着霍山石斛的生长呈现先上升后下降的变化趋势, 二年驯化苗茎和叶中的表达水平最高。运用SPSS软件分析发现, 不同时期不同组织间的相对表达量均具有显著性差异。

利用qPCR技术检测TR-I在霍山石斛、金钗石斛、铁皮石斛和鼓槌石斛试管苗中的表达情况(图8)。结果显示, TR-I基因在不同石斛品种中的相对表达量大小依次为金钗石斛、霍山石斛、鼓槌石斛和



Aa: 三分三; Ab: 颠茄; Al: 铃铛子; Cs: 旋花; Dc: 铁皮石斛; Dh: 霍山石斛; Di: 曼陀罗; Dn: 金钗石斛; Hn: 天仙子; St: 马铃薯; Ws: 睡茄。

Aa: *Anisodus acutangulus*; Ab: *Atropa belladonna*; Al: *Anisodus luridus*; Cs: *Calystegia sepium*; Dc: *Dendrobium catenatum*; Dh: *Dendrobium huoshanense*; Di: *Datura innoxia*; Dn: *Dendrobium nobile*; Hn: *Hyoscyamus niger*; St: *Solanum tuberosum*; Ws: *Withania somnifera*.

图5 霍山石斛TR-I氨基酸序列与其他植物多重比对

Fig.5 Multiple alignment of the amino acid sequence of TR-I among *Dendrobium huoshanense* and other plants

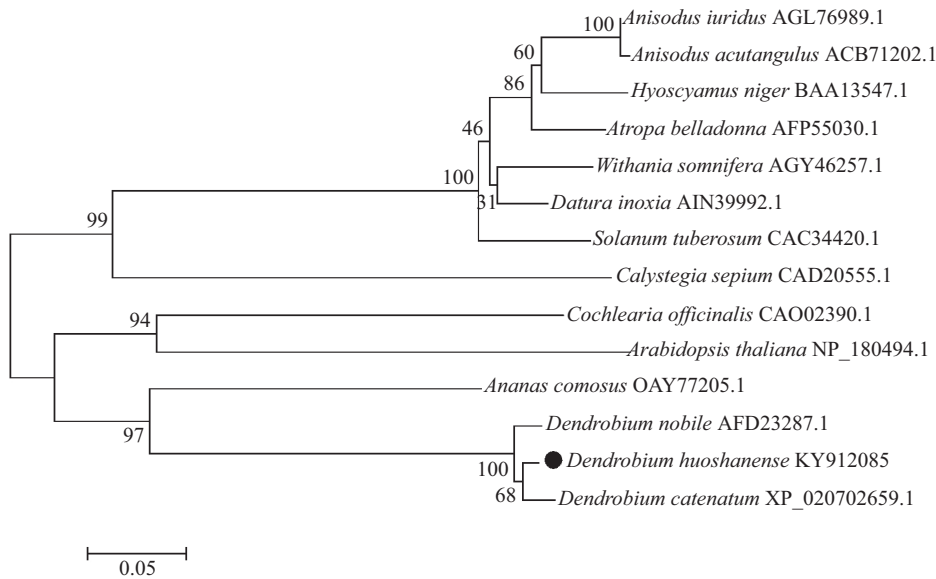


图6 霍山石斛与其他植物TR-I系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of TR-I with *Dendrobium huoshanense* and other plants

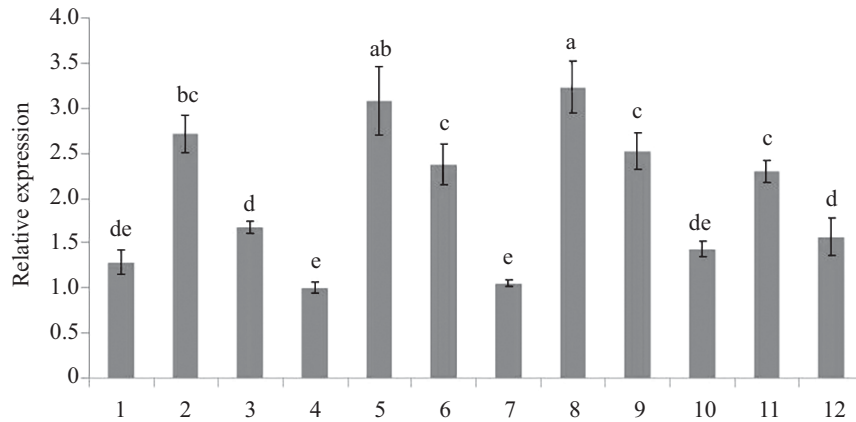
铁皮石斛, 且各品种间的相对表达量存在显著差异。

选择未添加茉莉酸甲酯的霍山石斛原球茎为对照, 分析TR-I基因的相对表达量, 结果见图9。由图可知, 在各个茉莉酸甲酯处理下都能检测到TR-I基因的表达, 其中在100 μmol/L茉莉酸甲酯处理下表达量最高, 在无茉莉酸甲酯处理下表达量最低, 且

随茉莉酸甲酯添加浓度的升高, TR-I基因的表达量呈先升高后降低的趋势, 茉莉酸甲酯各浓度对基因表达量的影响存在显著差异。

### 3 讨论

TR基因作为提高托品烷生物碱含量的关键酶

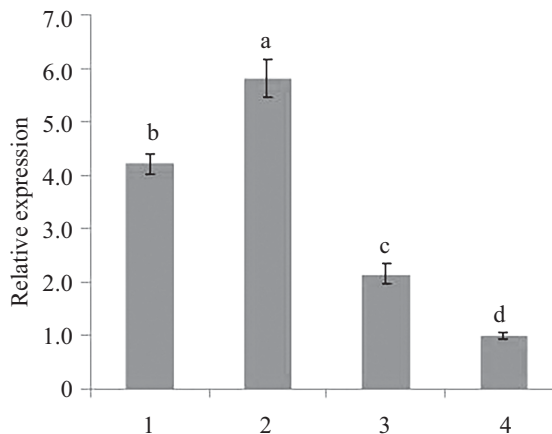


1: 一年试管苗根; 2: 一年试管苗茎; 3: 一年试管苗叶; 4: 一年驯化苗根; 5: 一年驯化苗茎; 6: 一年驯化苗叶; 7: 二年驯化苗根; 8: 二年驯化苗茎; 9: 二年驯化苗叶; 10: 三年驯化苗根; 11: 三年驯化苗茎; 12: 三年驯化苗叶。不同字母表示差异具有显著性( $P < 0.05$ ,  $n=3$ )。

1: roots of one year test-tube plantlet; 2: stems of one year test-tube plantlet; 3: leaves of one year test-tube plantlet; 4: roots of one year domesticated plants; 5: stems of one year domesticated plants; 6: leaves of one year domesticated plants; 7: roots of two years domesticated plants; 8: stems of two years domesticated plants; 9: leaves of two years domesticated plants; 10: roots of three years domesticated plants; 11: stems of three years domesticated plants; 12: leaves of three years domesticated plants. The different letters showed significant differences ( $P < 0.05$ ,  $n=3$ ).

图7 霍山石斛不同时期不同组织中TR-I基因的相对表达量

Fig.7 Expression levels of TR-I in different stages and tissues of *Dendrobium huoshanense*

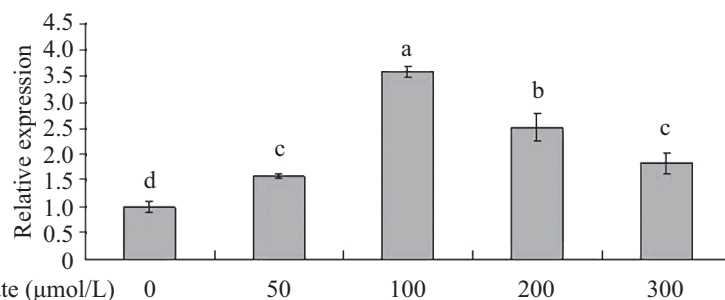


1: 霍山石斛; 2: 金钗石斛; 3: 鼓槌石斛; 4: 铁皮石斛。不同字母表示显著性差异( $P < 0.05$ ,  $n=3$ )。

1: *Dendrobium huoshanense*; 2: *Dendrobium nobile*; 3: *Dendrobium chrysotoxum*; 4: *Dendrobium catenatum*. The different letters showed significant differences ( $P < 0.05$ ,  $n=3$ ).

图8 不同品种石斛中TR-I基因的相对表达量

Fig.8 Expression levels of TR-I in different *Dendrobium* cultivars



不同字母表示差异具有显著性( $P < 0.05$ ,  $n=3$ )。

The different letters showed significant differences ( $P < 0.05$ ,  $n=3$ ).

图9 霍山石斛不同浓度茉莉酸甲酯处理的TR-I基因定量表达分析

Fig.9 Analysis of the TR-I gene expression in different concentrations of methyl jasmonate in *Dendrobium huoshanense*

基因而倍受关注,目前已从天仙子<sup>[22]</sup>、三分三<sup>[28]</sup>、颠茄<sup>[29]</sup>等植物中分离克隆。在对颠茄<sup>[29]</sup>中*TR-I*基因进行研究发现,其作为托品烷生物碱合成途径中间分支处的一个控制点酶,过量表达*TR-I*基因能够极大地促进代谢流向莨菪碱和东莨菪碱方向,从而显著地提高总托品烷生物碱的产量。用发根农杆菌C58C1介导遗传转化*TR-I*基因,获得了三分三转基因毛状根。结果显示,与对照组比较,转基因毛状根莨菪碱提高了87%,东莨菪碱提高至原来的8倍,说明*TR-I*基因对提高三分三总莨菪碱含量方面起到了积极作用<sup>[30]</sup>。然而,只有在茄科植物或其相近物种中,*TR*基因才具有托品酮催化活性。唯一例外的是,在非产莨菪碱物种中,辣根植物中的托品酮还原酶对托品酮具有催化活性<sup>[31]</sup>,但要低于其他环酮类物质,而拟南芥<sup>[31]</sup>托品酮还原酶却对托品酮无催化活性。因此,有研究者推测,在非茄科植物的进化演变过程中,相比于托品酮,*TR*基因有其特异性底物<sup>[32]</sup>,例如推测金钗石斛*DnTR-I*可能参与了石斛碱的生物合成<sup>[18]</sup>。

本研究将获得的霍山石斛*TR-I*基因编码蛋白质序列用Blast进行蛋白质相似性检索,发现该序列与铁皮石斛和金钗石斛的相似性最高,达到了97%,与其他植物在氨基酸序列也有较高的同源性。利用软件对霍山石斛*TR-I*蛋白质进行生物信息学分析发现,该蛋白质属于疏水性的稳定蛋白质,不含信号肽结构,属于短链脱氢酶/还原酶家族,这与强玮<sup>[29]</sup>对颠茄*TR-I*的研究和Wei等<sup>[33]</sup>对曼陀罗*TR-I*的研究结果类似。在重要功能结构域方面,霍山石斛*TR-I*拥有与其他植物几乎一致的氨基酸组成,即YxxxK保守结构域。晶体结构和定点突变实验证明,YxxxK位点为短链脱氢酶家族所必不可少的<sup>[34]</sup>。进化树分析结果表明,产莨菪碱物种组成一个分支,非产莨菪碱物种组成一个分支,霍山石斛*TR-I*蛋白质则处在非产莨菪碱物种这一分支,这基本上代表了它在经典分类上的地位。本研究获得的霍山石斛*TR-I*基因的序列信息以及结构分析,可为后期通过分子生物学手段调节*TR-I*的基因表达,进而为研究*TR-I*基因在石斛中的功能奠定基础。

为了解*TR-I*基因在霍山石斛中的功能,本研究分析了该基因在不同条件下的表达差异。在分析霍山石斛*TR-I*基因的时空表达模式时发现,其在茎中的相对表达量最高,叶中次之,根中最少,各组织间

的表达量存在明显差异,且茎和叶中*TR-I*的表达量均随着生长期的延长呈先上升后下降的变化趋势。而在对三分三*TR-I*基因的研究中发现,该基因在不同的组织中表达水平都比较低,并且表达没有明显的区别<sup>[30]</sup>; *TR-I*基因在颠茄成熟叶中表达水平较高,花苞和须根也有少量表达,其他部位表达量微弱<sup>[29]</sup>;在金钗石斛研究中,*DnTR-I*基因在叶中表达最高,茎中次之,根中表达最低<sup>[18]</sup>。不同植物*TR-I*基因在不同组织中存在差异,这可能是由于该基因在不同的物种中所起的作用不同导致的。在不同品种药用石斛比较中发现,*TR-I*基因在金钗石斛中的相对表达量显著高于其他3种石斛,结合金蓉鸾等<sup>[35]</sup>、王再花等<sup>[36]</sup>、陈乃东等<sup>[37]</sup>的研究发现,金钗石斛中所含的总生物碱量要比霍山石斛、铁皮石斛和鼓槌石斛高,推测*TR-I*基因与总生物碱含量变化存在一定联系,可能与总生物碱的合成相关。

近年来,茉莉酸甲酯作为诱导子的应用越来越广泛,因为它不仅能够促进植物次生代谢产物的积累,也可以影响植物次生代谢途径中关键酶基因的表达<sup>[38]</sup>。用茉莉酸甲酯诱导刺激植物,能够强烈地促进植物生物碱的积累<sup>[39-40]</sup>。为了探讨*TR-I*在霍山石斛中是否与生物碱合成途径相关,我们检测了不同浓度茉莉酸甲酯处理条件下基因的表达变化。结果显示,随茉莉酸甲酯添加浓度的升高,*TR-I*基因的表达量呈先上升后下降的变化趋势,当浓度高于100 μmol/L时,其表达量下降,这可能是由于茉莉酸甲酯诱导刺激了基因的某些特殊的应答机制。本研究中添加茉莉酸甲酯处理的基因表达量均高于未添加茉莉酸甲酯的对照组,说明*TR-I*基因能够有效响应茉莉酸甲酯的诱导调控。结合茉莉酸甲酯在生物碱合成中的作用,推测*TR-I*基因可能参与到生物碱的合成途径。因此,霍山石斛*TR-I*基因的克隆与表达分析将有助于后续通过双向电泳、酵母双杂交、转基因等技术对霍山石斛*TR-I*进行功能验证,也为石斛次生代谢产物合成的进一步研究奠定基础。

## 参考文献 (References)

- 1 任杰,王军,丁增成,胡吉如,杨正清,傅松玲. 霍山石斛生产质量管理规范研究. 农学报(Ren Jie, Wang Jun, Ding Zengcheng, Hu Jiru, Yang Zhengqing, Fu Songling. Study on good agricultural practice (GAP) for *Dendrobium huoshanense*. Journal of Agriculture) 2014; 4(6): 72-6.
- 2 李滨,陈锋,王新生,张炜玲,戴亚峰,欧阳臻. 霍山石斛安全性评价研究. 食品研究与开发(Li Bin, Chen Feng, Wang

- Xinsheng, Zhang Weiling, Dai Yafeng, Ouyang Zhen. Study on toxicological security of *Dendrobium huoshanense*. Food Research and Development) 2014; 35(12): 85-91.
- 3 Zha XQ, Luo JP, Luo SZ. Structure identification of a new immunostimulating polysaccharide from the stems of *Dendrobium huoshanense*. Carbohydr Polym 2007; 69: 86-93.
- 4 Bi ZM, Wang ZT, Xu LS. Chemical constituents of *Dendrobium monili* forme. Acta Bot Sin 2004; 46(1): 124.
- 5 李彦, 周晓东, 楼浙辉, 肖相元. 植物次生代谢产物及影响其积累的因素研究综述. 江西林业科技(Li Yan, Zhou Xiaodong, Lou Zhehui, Xiao Xiangyuan. Review of plant secondary metabolites and the factors that influence its accumulation. Jiangxi Forestry Science and Technology) 2012; 3: 54-60.
- 6 Hartmann T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry 2007; 68(22): 2831-46.
- 7 孙立影, 于志晶, 李海云, 李俊波, 刘洪章, 林秀峰, 等. 植物次生代谢物研究进展. 吉林农业科学(Sun Liying, Yu Zhijing, Li Haiyun, Li Junbo, Liu Hongzhang, Lin Xiufeng, et al. Advances in secondary metabolites of medicinal plant. Journal of Jilin Agricultural Sciences) 2009; 34(4): 4-10.
- 8 卢衍, 常凯, 郑月, 许宏宣, 杨春贤. 长春花萜类生物碱的分子生物学与代谢工程研究. 安徽农业科学(Lu Yan, Chang Kai, Zheng Yue, Xu Hongxuan, Yang Chunxian. Molecular biology and metabolic engineering of the indole pathway in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Journal of Anhui Agricultural Sciences) 2012; 40(16): 8793-6.
- 9 郁美娟, 孟庆华, 黄德音, 赵亚平. 石斛属植物有效成分及药理作用研究. 中成药(Yu Meijuan, Meng Qinghua, Huang Deyin, Zhao Yaping. Advances in studies on effective constituents and pharmacologic action from plants of *Dendrobium* Sw.. Chinese Traditional Patent Medicine) 2003; 25(11): 918-21.
- 10 宋馨, 祝建, 吕洪飞. 金丝桃属植物研究进展. 西北植物学报(Song Xin, Zhu Jian, Lü Hongfei. Advances in *Hypericum* researches. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica) 2005; 25(4): 844-9.
- 11 王彦红, 兰天野, 陈婷, 刘平, 林丽丽. 银杏内酯B对高糖诱导人晶状体上皮细胞凋亡的影响. 国际眼科杂志(Wang Yanhong, Lan Tianye, Chen Ting, Liu Ping, Lin Lili. Effect of ginkgolide B on high glucose-induced human lens epithelial cell apoptosis. International Journal of Ophthalmology) 2016; 16(7): 1242-4.
- 12 Wang Y, Luo JP, Zha XQ. Protocorm-like body formation and plant regeneration of *Dendrobium huoshanense*, an endangered medicinal plant. Acta Horticulture 2006; 725(1): 379-84.
- 13 Lee PL, Chen JT. Plant regeneration via callus culture and subsequent *in vitro* flowering of *Dendrobium huoshanense*. Acta Physiol Plant 2014; 36(10): 2619-25.
- 14 Fan HH, Li TC, Guan L, Li ZP, Guo N, Cai YP, et al. Effects of exogenous nitric oxide on antioxidation and DNA methylation of *Dendrobium huoshanense* grown under drought stress. Plant Cell Tissue Organ Cult 2012; 109(2): 307-14.
- 15 李向东, 成彦武, 周海燕, 张斯杰, 孙大学, 赵润怀, 等. 霍山石斛的种源鉴定及种植产业发展现状考察报告. 中国现代中药(Li Xiangdong, Cheng Yanwu, Zhou Haiyan, Zhang Sijie, Sun Daxue, Zhao Runhui, et al. Provenance identification and current situation of plantation industry of *Dendrobium huoshanense*. Modern Chinese Medicine) 2015; 6: 525-58.
- 16 Cheng XF, Chen W, Zhou ZH, Liu JJ, Wang HZ. Functional characterization of a novel tropinone reductase-like gene in *Dendrobium nobile* Lindl. J Plant Physiol 2013; 170(10): 958-64.
- 17 彭静叶, 彭梅芳. 反义托品酮还原酶II基因对三分三的遗传转化及生物碱含量测定. 安徽农业科学(Peng Jingye, Peng Meifang. Genetic transformation of antisense tropinone reductase II gene into *Anisodus acutangulus* and alkaloid content determination. Journal of Anhui Agricultural Sciences) 2011; 39(12): 6968-70.
- 18 Chen W, Cheng XF, Zhou ZH, Liu JJ, Wang HZ. Molecular cloning and characterization of a tropinone reductase from *Dendrobium nobile* Lindl. Mol Bio Rep 2013; 40(2): 1145-54.
- 19 成瑜, 杨春贤, 王贵君, 李郑娜, 杨颖舫, 冯国庆, 等. 颠茄PMT·TR-I和H6H基因植物高效表达载体的构建. 安徽农业科学(Cheng Yu, Yang Chunxian, Wang Guijun, Li Zhengna, Yang Yinfang, Feng Guoqing, et al. Construction of plant expression vectors of PMT, TR-I and H6H. Journal of Anhui Agricultural Sciences) 2010; 38(14): 7211-3.
- 20 Keiner R, Kaiser H, Nakajima K, Hashimoto T, Dräger B. Molecular cloning, expression and characterization of tropinone reductase II, an enzyme of the SDR family in *Solanum tuberosum* (L.). Plant Mol Biol 2002; 48(3): 299-308.
- 21 Guo Y, Li L, Cui L, Luo X, Liu C, Xiao J, et al. Enhancing the production of tropane alkaloids in transgenic *Anisodus acutangulus* hairy root cultures by over-expressing tropinone reductase. Mol Biosyst 2012; 8(11): 2883-90.
- 22 Rocha P, Stenzel O, Parr A, Wslton N, Christou P, Drager B, et al. Functional expression of tropinone reductase i (tri) and hyoscyamine-6 beta-hydroxylase (H6h) from *Hyoscyamus niger* in *Nicotiana tabacum*. Plant Sci 2002; 162(6): 905-13.
- 23 Sangwan RS, Kushwaha AK, Sangwan NS, Tripathi S. Molecular cloning and catalytic characterization of a recombinant tropine biosynthetic tropinone reductase from *Withania coagulans* leaf. Gene 2013; 516(2): 238-47.
- 24 朱胜男. 信号分子对金钗石斛组培苗次生代谢产物积累的影响. 杭州师范大学(硕士论文)(Zhu Shengnan. Effect of signaling molecules on secondary metabolites in tissue culture of *Dendrobium nobile*. Hangzhou Normal University), 2011.
- 25 林榕燕, 赖钟雄. 霍山石斛HMGR基因的克隆及其定量表达分析. 热带作物学报(Lin Rongyan, Lai Zhongxiong. Cloning and qpcr analysis of HMGR gene from *Dendrobium huoshanense*. Chinese Journal of Tropical Crops) 2014; 35(10): 1975-83.
- 26 林玉玲, 赖钟雄. 龙眼胚性愈伤组织Cu/Zn-SOD分子伴侣基因CCS的克隆及其在体胚发生过程中的表达分析. 应用与环境生物学报(Lin Yuling, Lai Zhongxiong. Cloning of copper chaperone for superoxide dismutase gene CCS from embryogenic callus of *Dimocarpus longan* Lour. and its expression analysis during somatic embryogenesis. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology) 2012; 18(3): 351-8.
- 27 梁前进, 王鹏程, 白燕荣. 蛋白质磷酸化修饰研究进展. 科技导报(Liang Qianjin, Wang Pengcheng, Bai Yanrong. Summarization on the progress in protein phosphorylation. Science & Technology Review) 2012; 30(31): 73-9.
- 28 Liao P, Chen JB, Kai GY, Li L, Jiang YX, Yan XM, et al. Molecular cloning and characterization of two tropinone reductases in *Anisodus acutangulus* and enhancement of tropane alkaloid production in aatri-transformed hairy roots. Biotechnol Appl Bioc 2009; 54(3): 177-86.

- 29 强 玮. 颠茄TRI基因的克隆、功能验证及超量表达对颠茄托品烷生物碱合成的影响. 西南大学(硕士论文)(Qiang Wei. Cloning and characterization of tropinone reductase i from *Atropa Belladonna* and its overexpression for enhancing the tropane alkaloids production in *Atropa belladonna*. Southwest University), 2012.
- 30 李 礼. 三分三托品烷生物碱代谢工程. 上海师范大学(硕士论文)(Li Li. Tropane alkaloids metabolism engineering of *Anisodus acutangulus*. Shanghai Normal University), 2009.
- 31 Brock A, Brandt W, Drager B. The functional divergence of short-chain dehydrogenases involved in tropinone reduction. *Plant J* 2008; 54(3): 388-401.
- 32 Nakajima K, Oshita Y, Yamada Y, Hashimoto T. Insight into the molecular evolution of two tropinone reductases. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999; 63(10): 1819-22.
- 33 Wei Q, Ke X, Zhang QZ, Zeng JL, Huang YS, Yang CX, *et al.* Functional characterisation of a tropine-forming reductase gene from *Brugmansia arborea*, a woody plant species producing tropane alkaloids. *Phytochemistry* 2016; 127: 12-22.
- 34 Reinhardt N, Fischer J, Coppi R, Blum E, Brandt W, Draeger B. Substrate flexibility and reaction specificity of tropinone reductase-like short-chain dehydrogenases. *Bioorg Chem* 2014; 52(54): 37-49.
- 35 金蓉鸾, 孙继军, 张远名. 11种石斛的总生物碱的测定. 南京药学院学报 (Jin Rongluan, Sun Jijun, Zhang Yuanming. The Determination of total alkaloids in 11 species of dendrobium. *Journal of Nanjing College of Pharmacy*) 1981; 1: 9-13.
- 36 王再花, 李 杰, 章金辉, 朱根发, 梁翠玲, 叶庆生. 石斛属植物多糖与生物碱含量的比较研究. 中国农学通报(Wang Zaihua, Li Jie, Zhang Jinhui, Zhu Genfa, Liang Cuiling, Ye Qingsheng. Comparison of polysaccharide and alkaloid contents in dendrobium. *Chinese Agricultural Science Bulletin*) 2015; 31(24): 242-6.
- 37 陈乃东, 高 峰, 林 欣, 金 晖. 不同种源霍山石斛生物碱比较研究. 中药材(Chen Naidong, Gao Feng, Lin Xin, Jin Hui. Comparative study on alkaloids of tissue-culture seedling and wild plant of *Dendrobium huoshanense*. *Jornal of Chinese Medicinal Materials*) 2014; 6: 953-6.
- 38 Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 2005; 23(4): 283-333.
- 39 Cho HY, Rhee HS, Yoon SY, Park JM. Differential induction of protein expression and benzophenanthridine alkaloid accumulation in *eschscholtzia californica* suspension cultures by methyl jasmonate and yeast extract. *J Microbiol Biotechn* 2008; 18(2): 255-62.
- 40 林榕燕. 霍山石斛离体培养物生物碱合成的生理与分子机制研究. 福建农林大学(硕士论文)(Lin Rongyan. Studies on the physiological and molecular mechanism of alkaloid synthesis of *in vitro* cultures in *Dendrobium huoshanense*. *Fujian Agriculture and Forestry University*), 2014.