



益智不同组织多糖含量及其生物合成途径分析

俞振明, 赵聪慧, 张明泽, 何春梅, 司灿, 曾丹琦, 段俊

引用本文:

俞振明, 赵聪慧, 张明泽, 等. 益智不同组织多糖含量及其生物合成途径分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2021, 29(6): 669–677.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4374>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

de novo转录组学分析华南地区入侵植物五爪金龙代谢特征

Metabolic Characteristics of Invasive Plant *Ipomoea cairica* in South China by de novo Transcriptomics

热带亚热带植物学报. 2016, 24(2): 128–142 <https://doi.org/10.11926/j.issn.1005-3395.2016.02.002>

基于转录组测序的铁皮石斛植物甾醇生物合成相关基因分析

Analysis of Related Genes in Phytosterol Biosynthesis in *Dendrobium officinale* Based on Transcriptome Sequencing Technology

热带亚热带植物学报. 2019, 27(6): 693–701 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4025>

三角梅cDOPA 5GT基因的克隆和光照对其表达的影响

Cloning of Cyclo-DOPA-5-glucosyltransferase Gene from *Bougainvillea glabra* and Effect of Illumination on Its Expression

热带亚热带植物学报. 2021, 29(1): 75–81 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4233>

不同成熟度树葡萄叶片中类黄酮合成转录组基因分析

Transcriptome Analysis of Flavonoid Synthesis Related Genes in Different Maturity Leaves of *Myrciaria cauliflora*

热带亚热带植物学报. 2019, 27(6): 702–712 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4040>

冰菜盐胁迫下的转录组分析

Transcriptome Analysis of *Mesembryanthemum crystallinum* under Salt Stress

热带亚热带植物学报. 2019, 27(3): 279–284 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3972>

向下翻页, 浏览PDF全文

益智不同组织多糖含量及其生物合成途径分析

俞振明, 赵聪慧, 张明泽, 何春梅, 司灿, 曾丹琦, 段俊*

(中国科学院华南植物园, 广东省应用植物学重点实验室, 中国科学院华南农业植物分子分析与遗传改良重点实验室, 广州 510650)

摘要: 为了解益智(*Alpinia oxyphylla*)多糖生物合成途径关键酶功能, 对其茎、叶、果实中的多糖含量及其单糖组成进行了研究, 并采用 Real-Time qPCR 分析了益智多糖生物合成关键酶基因的表达模式。结果表明, 益智多糖含量依次为果实>叶>茎, 主要由葡萄糖、木糖、甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖组成; 利用益智转录组数据共获得 47 690 条 unigenes, 其中 31 892 条在 NR、Swiss-Prot、KEGG、COG、KOG、GO 和 Pfam 数据库获得注释, 其中 208 个 unigenes 参与益智多糖的生物合成, 涉及 15 个酶。表达分析表明, 所筛选的 18 个基因在茎、叶、果实中均有表达, 14 个基因在果实中的表达量最高, 以糖基转移酶基因和 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因的表达量最高, 且其表达模式与不同组织中葡萄糖含量的变化一致。

关键词: 益智; 多糖; 转录组; 糖基转移酶

doi: 10.11926/jtsb.4374

Analysis of Polysaccharide Content and Biosynthesis Pathway in Different Tissues of *Alpinia oxyphylla*

YU Zhenming, ZHAO Conghui, ZHANG Mingze, HE Chunmei, SI Can, ZENG Danqi, DUAN Jun*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, Key Laboratory of South China Agricultural Plant Molecular Analysis and Gene Improvement, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: To understand the key enzyme functions of polysaccharide biosynthesis pathway in *Alpinia oxyphylla*, the polysaccharides contents in stems, leaves and fruits and monosaccharide composition were studied, and the expression pattern of key enzyme genes involved in the biosynthetic pathway of polysaccharide was analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The results showed that the polysaccharides contents in different tissues was in the order of fruit>leaf>stem. The polysaccharide was consist of glucose, xylose, mannose, galactose and arabinose. A total of 47 690 unigenes were obtained from *A. oxyphylla* transcriptome database, of which 31 892 were annotated in NR, Swiss-Prot, KEGG, COG, KOG, GO and Pfam databases. Among them, 208 of unigenes encoding 18 enzymes were involved in the biosynthesis of *A. oxyphylla* polysaccharide. Furthermore, all of 18 selected unigenes were expressed in stems, leaves and fruits, of which 14 unigenes showed the highest expression in fruit. Interestingly, two genes, encoding glycosyltransferase and UDP glucose pyrophosphorylase, exhibited the highest expression, and their expressions were consistent with the glucose content in different tissues of *A. oxyphylla*.

Key words: *Alpinia oxyphylla*; Polysaccharide; Transcriptome; Glycosyltransferase

益智(*Alpinia oxyphylla*)为姜科(Zingiberaceae)多年生草本植物, 是一味药食同源的植物, 其干燥成熟

果实可入药, 主产于广东、广西、海南等地, 与槟榔(*Areca catechu*)、砂仁(*Amomum villosum*)、巴戟天

收稿日期: 2021-01-04

接受日期: 2021-03-04

基金项目: 广东省重点领域研发计划(2020B020221001); 国家自然科学基金项目(32000257)资助

This work was supported by the Project for Key Research and Development in Guangdong (Grant No. 2020B020221001), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 32000257).

作者简介: 俞振明(1988~), 男, 博士, 主要从事药用植物次生代谢调控研究。E-mail: zhenming311@scbg.ac.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: duanj@scib.ac.cn

(*Morinda officinalis*)并称为我国“四大南药”。中医认为益智味辛、性温,在《神农本草经》、《本草纲目》等经典专著中均有记载,具有暖肾固精缩尿,温脾止泻摄唾的功效^[1]。长期以来,益智野生资源日趋减少,作为保健品和中成药的主要原料不断被采挖,还广泛用于休闲食品(如蜜饯、凉果等)制作,优质益智种质培育是益智产业健康发展的关键内容。但在实际生产过程中,益智品种培育滞后,优良种质不断退化,严重阻碍了益智品质的提升^[2]。因此,为提升益智品质,亟需开展益智有效成分合成途径及调控机制的研究,进而指导益智优良品种选育和科学生产。

益智营养丰富,主要含有倍半萜类和二苯基庚烷类挥发油、黄酮和多糖等活性物质^[3-5],然而有关其多糖的研究尚不多见。多糖是益智仁中的一类重要活性成分,具有抗氧化、调节人体免疫、抑制肿瘤生长等多种功效^[6-8]。按照多糖中单糖的组成,可分为均一性多糖和不均一性多糖^[9-10]。在多糖的结构特征、理化性质及构效关系的研究中,单糖组成分析是基础性和关键性的环节。尽管不同来源的多糖结构复杂,但都是由常见的单糖重复单元组成,它们的生物合成途径相对一致,一般包括核苷酸糖合成与转运,以及由糖基转移酶参与的多糖链的起始、延伸、聚合与终止^[11-13]。作为影响益智品质的关键成分,目前研究主要集中在益智果实的营养成分、化学成分、药理活性等方面^[3-5,14],而对于活性物质的生物合成途径及其代谢关键酶基因的报道鲜少。因此,厘清益智多糖生物合成途径将对益智品质生产提供理论依据,也为深入挖掘多糖生物合成途径的关键基因奠定基础。

鉴于此,本研究以益智为研究材料,基于转录组测序数据,从分子水平上推断益智多糖的生物合成途径,重点挖掘参与益智多糖生物合成途径中的关键酶基因,及其在益智茎、叶和果实中的差异表达情况,为益智品质遗传工程改良和良种选育提供理论参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

益智(*Alpinia oxyphylla*)采集自广东农垦热带农业研究院种植基地,于2020年6月采收,分开茎、叶和果实,用液氮速冻后,置于-80℃冰箱保存备用,用于多糖生物合成途径关键酶基因的组织表达分析。以上材料由广东农垦热带农业研究院梁秋玲

提供。

1.2 多糖含量测定

将益智的茎、叶和果实分别洗净、晾干,105℃杀青2h,80℃烘干。取适量样品粉碎后过50目筛,装入自封袋并标记信息,贮存于干燥器中。参照Yu等^[15]的方法测定多糖含量,精确称量样品0.25g,经石油醚80℃回流2h脱脂后,回收石油醚,残渣挥干溶剂加入50mL蒸馏水,置沸水浴中提取4h,冷却至室温后过滤,滤液转移至50mL容量瓶中,定容,即为多糖待测液。精确量取100μg/mL的葡萄糖标准溶液0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL,分别加入10mL具塞试管中,用蒸馏水补足至2mL,混匀后加入新鲜配制的5%重蒸苯酚溶液1mL,涡旋振荡混匀,缓慢加入98.04%浓硫酸5mL,盖上玻璃塞,涡旋振荡混匀后,置于沸水浴中反应20min。反应结束冷却至室温,测定488nm处的吸光值,以吸光值为横坐标,葡萄糖含量为纵坐标,绘制葡萄糖标准曲线($y=198.55x+1.23$, $R^2=0.9993$)。精确量取0.2mL多糖待测液,置于10mL具塞试管中,用蒸馏水补足至2mL,按照绘制葡萄糖标准曲线的方法,测定488nm处的吸光值,从标准曲线上得出待测液中葡萄糖含量,计算益智多糖含量。

1.3 单糖组成分析

益智多糖中的单糖组成采用酸水解法^[16]确定。精确量取4mL多糖待测液,加入2mol/mL三氟乙酸6mL,110℃连续水解8h,60℃浓缩至干,加入2mL甲醇,再次蒸干除去多余的三氟乙酸,加入2mL蒸馏水溶解,过0.22μm亲水性滤膜,得多糖水溶液。精确量取0.4mL多糖水溶液,加入0.3mol/mL的NaOH溶液和0.5mol/mL的PMP(1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮, M70800, 购自Sigma-Aldrich)甲醇溶液各0.4mL,混匀,于70℃水浴反应100min。反应结束冷却至室温,加入0.3mol/mL的HCl溶液0.5mL,混匀,加入2mL三氯甲烷洗涤,5000×g室温离心,保留上层,弃下层三氯甲烷,重复3次,过0.22μm有机滤膜,备用。

精确量取10μL多糖水溶液,注入高效液相色谱仪,测定。色谱柱为Ultimate®XB-C₁₈(4.6mm×250mm,5μm)。流动相为乙腈(34998, 购自Sigma-Aldrich)和KH₂PO₄缓冲液(0.1mol/mL, pH 6.8)=16:84,柱温:30℃,波长:210nm,流速:1mL/min。

以对照品保留时间确定单糖, 用峰面积归一化法计算各单糖的含量。

1.4 转录组测序数据分析

下载益智转录组测序数据(NCBI 登陆号: PRJNA 559252), 剔除转录组数据中含有接头和低质量的 reads, 获得 clean reads。采用 Trinity 软件进行益智转录本组装和拼接, 采用 Swiss-Prot、COG、GO、KEGG、KOG、Pfam 和 NR 数据库进行 unigenes 功能注释, 并对已注释的 unigenes 进行 GO 分类和富集分析、KEGG 代谢通路富集分析。根据注释信息, 分析益智多糖生物合成途径, 挖掘多糖生物合成的关键酶基因。

1.5 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成

采用多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒(0416-50, 购自北京华越洋生物科技有限公司)分别提取益智茎、叶和果实的总 RNA^[17], 用超微量紫外可见分光光度计(Nano DropTM 2000c, Thermo Scientific 公司)测定总 RNA 的质量和浓度。按照反转录酶 M-MLV 试剂盒(M1701, 购自 Promega 公司)进行反转录合成 cDNA, 所得的 cDNA 用于多糖生物合成途径关键酶基因的组织表达分析。

1.6 关键酶基因的表达分析

根据多糖生物合成途径关键酶基因序列信息, 利用 Primer Premier 5.0 设计荧光定量 PCR 引物(表 1)。选择益智延伸因子 1- α (elongation factor 1-alpha, *EF-1 α*)为内参基因, 将茎、叶、果实 cDNA 的质量浓度定量为 200 ng/ μ L。荧光定量 PCR 仪为 Roche Light Cycler 480, 操作按照 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒(北京诺禾致源生物科技有限公司)说明书进行。反应体系总体积为 10 μ L: 包括 SYBR Green PCR Master Mix 5 μ L, 上、下游引物各 0.4 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 3.2 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 共 40 个循环。每反应均 3 次生物学重复。利用 2^{- $\Delta\Delta$ CT}法^[18]计算基因的相对表达量, 显著性分析采用 SPSS 软件的新复极差法(Duncan's 新复极差法), 绘图采用 Excel 软件。

2 结果和分析

2.1 多糖含量和单糖组成

采用苯酚-硫酸法比较了益智茎、叶和果实中的多糖含量, 结果表明果实 > 叶 > 茎, 果实多糖含量是茎的 3.21 倍、叶的 2.22 倍, 且均达显著差异($P < 0.05$)(表 2)。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

基因 Gene	序列编号 Unigene ID	上游引物 Forward primer (5'-3')	下游引物 Reverse primer (5'-3')
<i>EF-1α</i>	c92154.graph_c0	GTCGTGTTGAGACTGGAATGT	TGGTGCATCTCTACGGATTTG
<i>sacA</i>	c70823.graph_c0	TTCTGCCATGATGAGCTAAGG	GATCGAGTGATCCACCACTATTC
<i>scrK</i>	c80641.graph_c0	GGGTGGAACAATGGGTACAT	GACAAAGCCCTCCACAAGTA
<i>SS</i>	c64270.graph_c0	CTCCAAGGCACGTACTTGAT	CTTTCTCCGCATGGCTACTT
<i>HK</i>	c95926.graph_c0	GCGAGTCGTAACCTGCCTAA	GAGGAGGAGGAGATTGGAAATG
<i>MPI</i>	c73719.graph_c0	TTTCAGGCACACCGATAAGG	TAAGCCAGAGATGGCGATTG
<i>PMM</i>	c71757.graph_c0	TGCCGCAAGATCTTCATACC	GATCCCAGGCAGCAAAGTAA
<i>GMP</i>	c94431.graph_c0	CGACATCTTCAATGGTCAGGAG	CTTTGCCGACCTTCCGTATT
<i>PGM</i>	c77958.graph_c0	GGTTCACCAAATGTGCCATAAG	AGGATATAGTTCGTGGGCATTG
<i>GPI</i>	c24107.graph_c0	GATCCCAGCAAGTGTGTCTTATT	TGGCATCAGCAGCTCTTATT
<i>UGP</i>	c75380.graph_c0	TCCAGACTCCGACTGATGAA	GCTTCTTCGTGACCTCCATATC
<i>UGDH</i>	c74542.graph_c0	GCACCGATGCAGCATATCTTA	GTTGATCTCCCGCTTTGATTG
<i>AXS</i>	c98768.graph_c0	TTGTGCCAGTGCCTAGTATG	GCAGAGACAGGGTCTTGATATG
<i>UGE</i>	c91002.graph_c0	TTCCAGTTGGTCCACAAGTAG	CTCGTGATTTGGCTGTGATTG
<i>UAE</i>	c54506.graph_c0	GCCGAAGTCTATAGTATCCTTC	GCCACTCAGATGCAATTTCTG
<i>GT</i>	c85406.graph_c0	CATCTCGCCCAITCTTCTACTT	ATTACCACTGCCTTCCCATAC
<i>GT</i>	c58247.graph_c0	GCGGATCAGGAACTGGTAAT	CAATCGTCGCCGTTTACTTTT
<i>GT</i>	c96947.graph_c0	ACCCTGTCTCTTCCAGTATAG	CCCAACGTCTCCAACATTCT
<i>GT</i>	c83168.graph_c0	CGGTAGATGAACAGGAGGATTT	CTTCAACTCTTGGAGAGAGAG

利用柱前衍生化-HPLC 法检测益智多糖中的单糖含量, 结果表明, 益智不同组织中多糖的组成类似, 主要由葡萄糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖和甘露糖组成, 以葡萄糖为主。果实中葡萄糖含量为 70.04 mg/g, 占 79.72%, 是茎的 7.72 倍、叶的 4.46 倍, 表明益智多糖是以葡萄糖为主构成的杂多糖。

2.2 转录组数据功能注释

益智转录组数据经 Trinity 软件组装和拼接后, 共

获得 23.88 Gb Clean Data, 包含 47 690 条 unigenes。用 BLAST 软件将 unigenes 序列在 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KOG、Pfam、KEGG 数据库中进行比对, 有 31 892 条 unigenes 获得功能注释, 占总序列的 66.87%, 说明益智转录组测序数据相对可靠。

基于 COG 数据库注释结果, 10 069 条 unigenes 被注释, 涉及 26 个 COG 分类, 其中注释最多的 5 个分类为“翻译、核糖体结构与生物起源”、“一般功能基因”、“转录后修饰、蛋白翻转及伴随蛋白”、“碳水化合物运输及代谢”和“信号转导机制”(表 3)。

表 2 益智多糖和单糖含量

Table 2 Contents of polysaccharide and monosaccharides in *Alpinia oxyphylla*

	多糖 (mg/g) Polysaccharide	葡萄糖 (mg/g) Glucose	木糖 (mg/g) Xylose	半乳糖 (mg/g) Galactose	阿拉伯糖 (mg/g) Arabinose	甘露糖 (mg/g) Mannose
茎 Stem	27.36 ±2.14c	9.07 ±1.47c	5.18 ±0.22b	6.83 ±0.55b	4.64 ±0.74b	1.64 ±0.07b
叶 Leaf	39.58 ±1.08b	15.69 ±1.19b	6.26 ±0.75a	8.95 ±1.12a	6.89 ±0.67a	1.79 ±0.11b
果实 Fruit	87.89 ±3.62a	70.04 ±4.29a	6.51 ±0.56a	4.57 ±0.43c	4.21 ±0.38b	2.56 ±0.14a

同列数据后不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Data followed different letters within column indicate significant difference at 0.05 level.

表 3 所有序列 COG 分类和统计

Table 3 COG classification and statistics of all unigenes

编号 No.	功能分类 Functional classification	数量 Quantity	%
A	RNA 加工与修饰 RNA processing and modification	6	0.05
B	染色质结构与动力学 Chromatin structure and dynamics	18	0.16
C	能源产生和转换 Energy production and conversion	566	5.01
D	细胞周期控制、细胞分裂、染色质分配 Cell cycle control, cell division, chromatin partitioning	140	1.24
E	氨基酸转运与代谢 Amino acid transport and metabolism	646	5.72
F	核苷酸转运与代谢 Nucleotide transport and metabolism	222	1.97
G	碳水化合物运输及代谢 Carbohydrate transport and metabolism	1 017	9.01
H	辅酶转运与代谢 Coenzyme transport and metabolism	426	3.77
I	脂质转运与代谢 Lipid transport and metabolism	698	6.18
J	翻译、核糖体结构与生物起源 Translation, ribosomal structure and biogenesis	1 204	10.66
K	转录 Transcription	511	4.52
L	复制、重组和修复 Replication, recombination and repair	333	2.94
M	细胞壁/细胞膜/膜生物起源 Cell wall/membrane/envelope biogenesis	523	4.63
N	细胞运动 Cell motility	59	0.52
O	转录后修饰、蛋白翻转及伴随蛋白 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	1 035	9.16
P	无机离子的转运与代谢 Inorganic ion transport and metabolism	510	4.52
Q	次生代谢物合成、转运和分解 Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	553	4.90
R	一般功能基因 General function prediction only	1 182	10.47
S	未知功能 Function unknown	258	2.28
T	信号转导机制 Signal transduction mechanisms	909	8.05
U	胞内运输、分泌和小泡转运 Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	45	0.40
V	防御机制 Defense mechanisms	327	2.90
W	细胞外结构 Extracellular structures	19	0.17
X	运动体: 原噬菌体、转座子 Mobilome: prophages, transposons	34	0.30
Y	核结构 Nuclear structure	0	0
Z	细胞骨架 Cytoskeleton	53	0.47

基于 GO 数据库, 将 17 699 个 unigene 注释为生物过程、细胞组分、分子功能 3 类, 分别有 9 680、8 304 和 8 562 个 unigene。基于 KEGG 数据库(表 4), 12 524 条序列获得注释, 共映射到 129 条途径, 5 个主要途径分别为核糖体、碳素代谢、氨基酸生物合成、内质网蛋白质的加工、植物激素的信号转导, 分别有 833、468、406、382 和 366 个 unigene。

2.3 多糖合成途径相关基因鉴定

益智多糖主要由葡萄糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖等单糖组成, 并以葡萄糖为主(表 2)。本研究挖掘得到果糖和甘露糖代谢(ko00051)、淀粉和蔗糖代谢(ko00500)、半乳糖代谢(ko00052)、磷酸戊糖途径(ko00030)、戊糖、氨基糖和核苷酸糖代谢(ko00520)等 5 条多糖相关代谢途径, 共有 897 个 unigenes 参与, 其中 208 个 unigenes 编码 18 个关键酶(包括核苷酸糖合成酶、糖基转移酶和多糖合成调

节酶), 据此推断益智多糖的生物合成途径。由光合作用生成的蔗糖在蔗糖合成酶(SS)作用下催化生成果糖和第一类核苷酸糖 UDP-葡萄糖。UDP-葡萄糖也可通过 β -呋喃果糖苷酶(sacA)、果糖激酶(scrK)、磷酸葡萄糖变位酶(PGM)及 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(UGP)连续催化而得。蔗糖在 SS、己糖激酶(HK)、甘露糖-6-磷酸异构酶(MPI)、磷酸甘露糖变位酶(PMM)和甘露糖焦磷酸化酶(GMP)果糖激酶(scrK)的共同作用下产生第二类核苷酸糖 GDP-甘露糖。UDP-葡萄糖能在 UDP-葡萄糖-差向异构酶(UGE)的作用下生成第三类核苷酸糖 UDP-半乳糖。UDP-葡萄糖还能在 UDP-葡萄糖脱氢酶(UGDH)、UDP-芹菜糖/木糖合酶(AXS)的催化下形成第四类核苷酸糖 UDP-木糖, 并在 UDP-阿拉伯糖差向异构酶(UAE)的催化下形成第五类核苷酸糖 UDP-阿拉伯糖。这些核苷酸糖在后续糖基转移酶的作用下, 进而合成益智多糖(图 1)。

表 4 KEGG 分类(前 20 个)

Table 4 KEGG classification of top 20

编号 No.	KEGG 编号 KEGG ID	途径 Pathway	Unigene
1	ko03010	核糖体 Ribosome	833
2	ko01200	碳水化合物代谢 Carbon metabolism	468
3	ko01230	氨基酸合成 Biosynthesis of amino acids	406
4	ko04141	内质网蛋白加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	382
5	ko04075	植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction	366
6	ko00500	淀粉与蔗糖合成 Starch and sucrose metabolism	300
7	ko04144	内吞作用 Endocytosis	288
8	ko04626	植物-病原菌互作 Plant-pathogen interaction	277
9	ko00190	氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	271
10	ko03040	剪接体 Spliceosome	268
11	ko03013	RNA 转运 RNA transport	264
12	ko00010	糖酵解/糖异生途径 Glycolysis / Gluconeogenesis	223
13	ko00230	嘌呤代谢 Purine metabolism	207
14	ko00940	苯丙素生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	206
15	ko00520	氨基糖和核苷酸糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	187
16	ko00620	丙酮酸代谢 Pyruvate metabolism	175
17	ko03015	mRNA 监测途径 mRNA surveillance pathway	174
18	ko04120	泛素介导的蛋白水解 Ubiquitin mediated proteolysis	174
19	ko03018	RNA 降解 RNA degradation	165
20	ko00240	嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	163

2.4 关键酶基因的表达

为明确多糖生物合成途径中关键酶基因的表达特性, 以延伸因子 *EF-1 α* 作为内参基因, 对 18 个关键酶基因在茎、叶、果实中的表达情况进行 Real-time qPCR 检测, 结果表明, 18 个基因在茎、叶、

果实中均有表达, 且绝大多数基因(14/18)在果实中的表达量最高。参与葡萄糖代谢的 c64270.graph_c0 (编码蔗糖合成酶 SS)、c77958.graph_c0 (编码磷酸葡萄糖变位酶 PGM)、c75380.graph_c0 (编码 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶 UGP)和 4 个编码糖基转移酶的基

南和广东的特色道地药用资源^[21]。多糖是益智中的一类重要活性成分,益智多糖具有抗氧化、抗肿瘤、增强机体免疫等作用^[6-8]。本研究结果表明,益智茎、叶和果实中均含有多糖,以果实中多糖含量最高,达 87.89 mg/g,表明果实是多糖的主要积累部位。牛晴等^[22]的研究表明,益智果仁中总糖含量高于叶,叶高于茎,与本研究结果相似。海南五指山、澄迈、屯昌、广东雷州半岛、广西南宁和安徽亳州的益智果实中的多糖含量为 80.3~86.2 mg/g^[23],表明不同来源的益智果实中多糖含量差异不大。此外,对益智叶和茎多糖进行研究不仅有利于其新资源的开发利用^[24],对促进益智产业的良性发展也具有重要意义。

虽然植物多糖已被广泛发现,但仍有大部分植物多糖被证实本身不具有生物活性或只有很弱的生物活性。这是由于植物多糖结构与其生物活性紧密相关,可以通过化学修饰改变原有结构,进而增强部分多糖的生物活性^[25]。多糖是一种聚合糖高分子碳水化合物,而单糖是多糖的基础组成部分,由不同单糖通过糖苷键连接、缩合、失水形成多糖^[12-13]。对于益智多糖结构的研究,单糖组成是最基本的研究对象。通过 PMP 柱前衍生-HPLC 法分析表明,益智果实中多糖由葡萄糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖和甘露糖组成,以葡萄糖含量最高(表 1)。赵祥升等^[26]报道益智果实的多糖主要由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖和甘露糖组成。Shi 等^[10]报道益智果实多糖由葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸和甘露糖组成。Han 等^[27]报道益智果实多糖以葡萄糖为主要单糖,与本研究的结果相似。目前益智多糖的分子结构已有报道,而益智多糖的生物合成途径却少有研究,因此,开展益智多糖合成途径的分析具有重要意义。

通过对益智转录组数据进行功能注释,获得了 47 690 条 unigenes,其中 31 892 条在 NR、Swiss-Prot、KEGG、COG、KOG、GO 和 Pfam 数据库获得注释。通过基因 GO 分类,主要有生物过程、细胞组分和分子功能等 3 大功能,其中代谢过程、催化活性过程和细胞过程等 3 个子分类注释的基因数量较多。基于 KEGG 数据库,挖掘得到果糖和甘露糖代谢(ko00051)、淀粉和蔗糖代谢(ko00500)、半乳糖代谢(ko00052)、磷酸戊糖途径(ko00030)、戊糖、氨基糖和核苷酸糖代谢(ko00520)等 5 条多糖相关代谢途径,共有 897 个 unigenes 参与,其中 208 个 unigenes

编码 18 个关键酶,编码糖基转移酶(GT)的 unigene 最多,其次是蔗糖合成酶(SS)。根据挖掘得到的多糖合成途径关键酶,结合其他植物中多糖生物合成途径的相关报道^[11-13,28-29],推断出益智多糖的生物合成途径,这为深入开展益智品质形成机理提供了丰富的数据资源。

多糖生物合成途径中的 18 个关键酶基因在益智茎、叶、果实中的表达存在差异,具有组织特异性,总体而言在果实中的表达量比茎、叶中高,推测多糖代谢物在果实中的合成量比其他组织中高。本研究结果表明,参与益智多糖中葡萄糖代谢的基因,如蔗糖合成酶基因、磷酸葡萄糖变位酶基因、UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因和糖基转移酶基因均在果实中的表达量最高,尤其是糖基转移酶基因(c85406.graph_c0)与 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因(c75380.graph_c0),这与益智不同组织中葡萄糖含量变化较为一致,推测为调控益智多糖生物合成的关键基因。UDP-葡萄糖焦磷酸化酶是植物多糖合成过程中的关键限速酶,负责调控多糖合成的起始步骤^[30]。糖基转移酶广泛存在于生物界,在糖基化反应中发挥重要作用,催化活性糖基从糖基供体转移到糖基受体,进而催化糖苷键的形成,最终合成糖链^[28-29,31]。这些为今后探究 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶和糖基转移酶在益智多糖代谢途径中的功能奠定了基础。通过比较益智不同组织中的多糖含量,并基于转录组测序数据分析益智多糖的生物合成途径,从分子水平上揭示益智多糖生物合成途径及其关键酶的分子机制,将有助于开发和利用益智资源。

参考文献

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China, Volume II [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 291.
国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 第二部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 291.
- [2] YAN X X, WANG M Y, WANG J R, et al. Breeding of new *Alpinia oxyphylla* variety 'Qiongzong No. 1' [J]. J Chin Mat Med, 2019, 42(6): 1211-1214. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2019.06.001.
晏小霞, 王茂媛, 王建荣, 等. 益智新品种'琼中 1 号'的选育研究 [J]. 中药材, 2019, 42(6): 1211-1214. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2019.06.001.
- [3] SUI J N, LI F C, GUO Y X, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and quality markers of *Alpinia*

- oxyphylla* [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(10): 2120–2126. doi: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.10.035.
- 随家宁, 李芳婵, 郭勇秀, 等. 益智仁化学成分、药理作用及质量标志物研究进展 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(10): 2120–2126. doi: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.10.035.
- [4] CHEN P, WANG P P, JIAO Z Z, et al. Research advance in chemical constituents in fruits of *Alpinia oxyphylla* and their pharmacological activities [J]. Drugs Clinic, 2013, 28(4): 617–623. doi: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.04.039.
- 陈萍, 王培培, 焦泽沼, 等. 益智仁的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 617–623. doi: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.04.039.
- [5] ZHANG J Q, WANG Y, CHEN F, et al. Progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Alpinia oxyphylla* fructus [J]. Nat Prod Res Dev, 2013, 25(2): 280–287. doi: 10.16333/j.1001-6880.2013.02.009.
- 张俊清, 王勇, 陈峰, 等. 益智的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(2): 280–287. doi: 10.16333/j.1001-6880.2013.02.009.
- [6] ZHENG Y, LI Y, WANG W D, et al. Optimization *Alpinia oxyphylla* polysaccharides extraction by Box-Behnken design and its antioxidant activities [J]. Food Ferment Ind, 2013, 39(8): 245–249. doi: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2013.08.007.
- 郑义, 李勇, 王卫东, 等. Box-Behnken 设计优化益智仁多糖的提取及其抗氧化活性 [J]. 食品发酵与工业, 2013, 39(8): 245–249. doi: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2013.08.007.
- [7] SHI W T, ZHONG J, ZHANG Q, et al. Structural characterization and antineuroinflammatory activity of a novel heteropolysaccharide obtained from the fruits of *Alpinia oxyphylla* [J]. Carbohydr Polym, 2020, 229: 115405. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115405.
- [8] YANG X, YANG Y H, CHEN H R C, et al. Extraction, isolation, immunoregulatory activity, and characterization of *Alpinia oxyphylla* fructus polysaccharides [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 155: 927–937. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.051.
- [9] LI C, WANG L X. Chemoenzymatic methods for the synthesis of glycoproteins [J]. Chem Rev, 2018, 118(17): 8359–8413. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00238.
- [10] SHI L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 92: 37–48. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.100.
- [11] DOBLIN M S, PETTOLINO F, BACIC A. Plant cell walls: The skeleton of the plant world [J]. Funct Plant Biol, 2010, 37(5): 357–381. doi: 10.1071/FP09279.
- [12] MEENTS M J, WATANABE Y, SAMUELS A L. The cell biology of secondary cell wall biosynthesis [J]. Ann Bot, 2018, 121(6): 1107–1125. doi: 10.1093/aob/mcy005.
- [13] SCHEIBLE W R, PAULY M. Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: Novel players and insights [J]. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7(3): 285–295. doi: 10.1016/j.pbi.2004.03.006.
- [14] LI X T, PANG Y X, YANG Q, et al. Analysis on the resources and current situation of exploitation and utilization of four southern herbal medicines [J]. Mod Chin Med, 2015, 17(2): 99–104. doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.2015.2.003.
- 李小婷, 庞玉新, 杨全, 等. 四大南药资源开发利用现状分析 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(2): 99–104. doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.2015.2.003.
- [15] YU Z M, HE C M, 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: 43–54. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.07.021.
- [16] YU Z M, YANG Z Y, TEIXEIRA DA SILVA J A, et al. Influence of low temperature on physiology and bioactivity of postharvest *Dendrobium officinale* stems [J]. Postharv Biol Technol, 2019, 148: 97–106. doi: 10.1016/j.postharvbio.2018.10.014.
- [17] ZHAO C H, YU Z M, HE C M, et al. Comparison of several total RNA extraction methods from flowers of *Dendrobium officinale* [J]. J Trop Subtrop Bot, 2020, 28(5): 479–486. doi: 10.11926/jtsb.4202.
- 赵聪慧, 俞振明, 何春梅, 等. 铁皮石斛花总 RNA 提取方法的比较研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2020, 28(5): 479–486. doi: 10.11926/jtsb.4202.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [19] WANG H X, HU Y M, JIA Q, et al. Evaluation of antioxidant and antiproliferation activities of 10 kinds of Guangdong medicinal and edible plant [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(8): 307–312. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050135.
- 万红霞, 胡玉玫, 贾强, 等. 10种广东药食两用植物的抗氧化和抗增殖活性评价 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(8): 307–312. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050135.
- [20] ZHANG Q, ZHENG Y L, HU X J, et al. Ethnopharmacological uses, phytochemistry, biological activities, and therapeutic applications of *Alpinia oxyphylla* Miquel: A review [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 224: 149–168. doi: 10.1016/j.jep.2018.05.002.
- [21] YAN X X, REN B L, WANG M Y, et al. Present situation and development strategy of *Alpinia oxyphylla* [J]. China J Chin Mat Med, 2019,

- 44(9): 1960–1964. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20190301.006.
- 晏小霞, 任保兰, 王茂媛, 等. 益智产业现状及发展对策 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9): 1960–1964. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20190301.006.
- [22] NIU Q, LIU P H, CAO M, et al. Analysis and evaluation of nutritional components in different parts of *Alpinia oxyphylla* Miq. [J]. Food Res Dev, 2018, 39(17): 160–167. doi: 10.3969/j.issn.1005-6521.2018.17.029.
- 牛晴, 刘平怀, 曹猛, 等. 益智不同部位营养成分与质量评价 [J]. 食品研究与开发, 2018, 39(17): 160–167. doi: 10.3969/j.issn.1005-6521.2018.17.029.
- [23] WU D L, JIN C S, MA K, et al. Quantitative determination of the polysaccharide content in fructus *Alpinia oxyphylla* [J]. Anhui Med Pharm J, 2007, 11(3): 218–219. doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2007.03.015.
- 吴德玲, 金传山, 马凯, 等. 益智仁中多糖的含量测定 [J]. 安徽医药, 2007, 11(3): 218–219. doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2007.03.015.
- [24] GAO B M, WEI N, WANG Y, et al. Present situation and analysis of comprehensive utilization of waste of *Alpinia oxyphylla* [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 2015, 26(6): 1473–1475. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2015.06.079.
- 高炳淼, 魏娜, 王勇, 等. 南药益智废弃物综合利用现状与分析 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(6): 1473–1475. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2015.06.079.
- [25] BIAN L, CHEN H G, ZHOU X. Recent advances in understanding the antitumor activity of polysaccharides from plants [J]. Food Sci, 2020, 41(7): 275–282. doi: 10.7506/spkx1002-6630-20190330-392.
- 边亮, 陈华国, 周欣. 植物多糖的抗肿瘤活性研究进展 [J]. 食品科学, 2020, 41(7): 275–282. doi: 10.7506/spkx1002-6630-20190330-392.
- [26] ZHAO X S, DONG N, FENG J D, et al. Determination of polysaccharides content in *Alpinia oxyphylla* [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2013, 30(10): 1070–1074. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2015.06.079.
- 赵祥升, 董娜, 冯锦东, 等. 益智多糖含量测定 [J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(10): 1070–1074. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2015.06.079.
- [27] HAN Y, WU J, LIU Y S, et al. Therapeutic effect and mechanism of polysaccharide from *Alpinia oxyphylla* fructus on urinary incontinence [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 128: 804–413. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.193.
- [28] ZHONG R Q, CUI D T, YE Z H. Secondary cell wall biosynthesis [J]. New Phytol, 2019, 221(4): 1703–1723. doi: 10.1111/nph.15537.
- [29] TYAGI A, NIGAM D, AMITHA MITHRA S V, et al. Genome-wide discovery of tissue-specific miRNAs in clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba*) indicates their association with galactomannan biosynthesis [J]. Plant Biotechnol J, 2018, 16(6): 1241–1257. doi: 10.1111/pbi.12866.
- [30] DECKER D, ÖBERG C, KLECZKOWSKI L A. Identification and characterization of inhibitors of UDP-glucose and UDP-sugar pyrophosphorylases for *in vivo* studies [J]. Plant J, 2017, 90(6): 1093–1107. doi: 10.1111/tpj.13531.
- [31] FAIK A, HELD M. Review: Plant cell wall biochemical omics: The high-throughput biochemistry for polysaccharide biosynthesis [J]. Plant Sci, 2019, 286: 49–56. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.04.025.