

• 农业生物技术 •

基于转录组测序与生物信息学综合分析短葶山麦冬中调控甾体皂苷积累的分子机制

陈莹, 仇明月, 胡若群, 曹佳玉, 梁婉凤, 闫淑君*

福建农林大学风景园林与艺术学院, 福建 福州 350100

陈莹, 仇明月, 胡若群, 曹佳玉, 梁婉凤, 闫淑君. 基于转录组测序与生物信息学综合分析短葶山麦冬中调控甾体皂苷积累的分子机制[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1120-1137.

CHEN Ying, QIU Mingyue, HU Ruqun, CAO Jiayu, LIANG Wanfeng, YAN Shujun. Uncovering the molecular mechanisms behind steroidal saponin accumulation in *Liriope muscari* (Decne.) Bailey through transcriptome sequencing and bioinformatics analysis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1120-1137.

摘 要: 本研究旨在以短葶山麦冬的叶与根为研究对象进行高通量 Illumina 转录组测序, 并结合生物信息学分析参与调控短葶山麦冬主要活性成分甾体皂苷类化合物积累的相关酶基因及关键转录因子, 为研究短葶山麦冬甾体皂苷积累的分子机制提供理论基础。通过转录组测序, 鉴定到 AACT、CAS、DXS 与 DXR 等 31 个参与甾体皂苷类化合物合成的代谢酶, 其中萜类化合物骨架合成阶段有 16 个, 倍半萜和三萜生物合成阶段有 3 个, 甾体化合物合成阶段有 12 个。基因差异表达显示, 在叶与根之间具有 34 条差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 分别编码甾体皂苷合成有关的 15 个代谢酶, 通过基因共表达模式进一步分析, 编码其中 14 个代谢酶的 31 条 DEGs 呈现共表达模式。此外, 还通过共表达分析及 PlantTFDB 的转录因子分析工具预测到 8 个转录因子 GAI、PIF4、PIL6、ERF8、SVP、LHCA4、NF-YB3 和 DOF2.4 可能参与调节 6 个代谢酶 DXS、DXR、HMGR、DHCR7、DHCR24 和 CAS。通过启动子分析预测这些转录因子表明, 其主要调控机制涉及脱落酸响应、干旱诱导胁迫响应及光响应等过程, 特别是脱落酸响应元件(abscisic acid responsive elements, ABRE)与干旱诱导胁迫响应元件(MYB binding site involved in drought-inducibility, MBS)响应途径; 并通过 qRT-PCR 分析这 8 个关键转录因子和代谢酶基因, 结果表明它们在叶与根中差异表达与测序结果一致。

关键词: 短葶山麦冬; 转录组学; 甾体皂苷

资助项目: 福建省自然科学基金(2021J01132); 福建省住房和城乡建设行业科技研究开发项目(2022-K-199)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2021J01132) and the Fujian Provincial Housing and Urban-rural Construction Industry Science and Technology Research and Development Project (2022-K-199).

*Corresponding author. E-mail: fjyansj@tom.com

Received: 2023-07-04; Accepted: 2023-11-30; Published online: 2023-12-06

Uncovering the molecular mechanisms behind steroidal saponin accumulation in *Liriope muscari* (Decne.) Baily through transcriptome sequencing and bioinformatics analysis

CHEN Ying, QIU Mingyue, HU Ruoqun, CAO Jiayu, LIANG Wanfeng, YAN Shujun*

College of Landscape Architecture and Art, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350100, Fujian, China

Abstract: The leaves and roots of *Liriope muscari* (Decne.) Baily were subjected to high-throughput Illumina transcriptome sequencing. Bioinformatics analysis was used to investigate the enzyme genes and key transcription factors involved in regulating the accumulation of steroidal saponins, which are the main active ingredient in *L. muscari*. These analyses aimed to reveal the molecular mechanism behind steroidal saponin accumulation. The sequencing results of *L. muscari* revealed 31 enzymes, including *AACT*, *CAS*, *DXS* and *DXR*, that are involved in the synthesis of steroidal saponins. Among these enzymes, 16 were in the synthesis of terpenoid skeleton, 3 were involved in the synthesis of sesquiterpene and triterpene, and 12 were involved in the synthesis of steroidal compound. Differential gene expression identified 15 metabolic enzymes coded by 34 differentially expressed genes (DEGs) in the leaves and roots, which were associated with steroidal saponin synthesis. Further analysis using gene co-expression patterns showed that 14 metabolic enzymes coded by 31 DEGs were co-expressed. In addition, analysis using gene co-expression analysis and PlantTFDB's transcription factor analysis tool predicted the involvement of 8 transcription factors, including *GAI*, *PIF4*, *PIL6*, *ERF8*, *SVP*, *LHCA4*, *NF-YB3* and *DOF2.4*, in regulating 6 metabolic enzymes such as *DXS*, *DXR*, *HMGR*, *DHCR7*, *DHCR24*, and *CAS*. These eight transcription factors were predicted to play important roles in regulating steroidal saponin accumulation in *L. muscari*. Promoter analysis of these transcription factors indicated that their main regulatory mechanisms involve processes such as abscisic acid response, drought-induction stress response and light response, especially abscisic acid responsive elements (ABRE) response and MYB binding site involved in drought-inducibility (MBS) response pathway. Furthermore, qRT-PCR analysis of these eight key transcription factors demonstrated their specific differences in the leaves and roots.

Keywords: *Liriope muscari* (Decne.) Baily; transcriptome; steroidal saponins

短葶山麦冬是来源于百合科的一种单子叶植物,在我国种质资源丰富,其株型小巧,叶型优美且叶色多样,常作为观赏草深受人们喜爱^[1]。由于其根系发达,且环境适应能力较强,对于一些炎热、干旱的环境具有较强的抵御能

力,常被种植于公园、庭院等^[2]。此外,短葶山麦冬作为药用植物,其药用部位主要为块根,在滋阴润燥方面具有良好的疗效^[3]。其主要药效成分为麦冬皂苷,属于甾体皂苷类化合物,现代药理研究表明,具有抗炎、抗肿瘤和降血

糖等作用^[4-6]。

甾体皂苷是植物中一类重要的次生代谢产物,主要来源于根与根茎部分^[7]。由于具有多种药理活性,常作为甾体药物的前体在临床上广泛应用^[8]。但目前甾体皂苷生物合成及调控的分子机制尚不清楚,解析其分子机制有助于今后提高甾体皂苷产量。虽然甾体皂苷在植物体内的主要生物合成途径已经被解析,但是影响甾体皂苷在植物中积累的转录调控机制尚待解析。其生物合成途径主要涉及 3 条途径,分别是萜类化合物骨架合成、倍半萜和三萜生物合成以及甾体化合物合成^[9]。甲戊羟酸途径(mevalonate, MVA)与 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸途径(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)是萜类化合物骨架合成的启动部分,在萜类化合物、类固醇类化合物以及其他次生代谢产物合成中十分常见,而在甾体皂苷合成中 MVA 途径发挥主导作用^[10]。二者各自以乙酰辅酶 A (acetyl-CoA)与甘油醛 3-磷酸酯(D-glyceraldehyde 3-phosphate)为底物生成相同的中间产物异戊烯焦磷酸((isopentenyl pyrophosphate, IPP);随后,在倍半萜与三萜生物合成途径中经过法尼基二磷酸法尼基转移酶(farnesyl-diphosphate farnesyltransferase, FDFT1)、角鲨烯单加氧酶(squalene monooxygenase, SQLE)和环阿屯醇合酶(cycloartenol synthase, CAS)催化合成甾体化合物前体环阿屯醇;最后,在甾体化合物合成途径中,由一系列氧化酶、甲基转移酶和细胞色素 P450 酶等催化生成不同的甾醇,最终通过糖基转移酶合成甾体皂苷。因此,对短葶山麦冬根和叶中甾体皂苷差异积累的转录调控机制解析将有助于阐明短葶山麦冬中甾体皂苷积累的分子机制。

植物体内次生代谢产物的积累不仅受生物合成途径中关键酶的影响,转录因子对其积累

的调控作用也至关重要。目前对于药用植物的次生代谢物生物合成相关基因的调控研究大多是基于转录水平来完成的^[11]。转录因子可以通过上调或下调某些关键酶的基因表达水平,从而调控生物合成途径的代谢走向,进而影响生物活性化合物的产生^[12]。不同类型的转录因子在植物次生代谢的调控机制不同,甾体皂苷合成主要与萜类化合物合成以及植物甾醇合成途径有关^[13]。目前研究显示,参与调控萜类化合物合成及植物甾醇类化合物合成的转录因子家族主要有 MYB、NAC、WRKY 和 bZIP 等^[14-16]。但在短葶山麦冬中,调控甾体皂苷积累的转录因子尚未解析。此外,转录因子的启动子区域含有多种顺式响应元件,可以根据它的顺式元件深入分析其调控机制。在不同的非生物胁迫条件下,转录因子启动子部位的顺式元件可以响应各种环境以调控植物次生代谢物质的积累。因此,研究转录因子的转录调控功能以及其启动子顺式元件有助于进一步阐明短葶山麦冬中调控甾体皂苷积累的分子机制。

本研究采用高通量测序技术首次以短葶山麦冬的叶与根作为研究材料,并结合生物信息学的工具与方法对短葶山麦冬进行转录组学研究,挖掘甾体皂苷合成的关键酶基因,分析调控甾体皂苷积累的关键转录因子的转录调控功能以及其启动子顺式元件,初步解析短葶山麦冬甾体皂苷积累的分子机制,为后续短葶山麦冬的深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

试验样品取自福建省泉州市洛江区罗溪镇植物培养示范基地的一年生苗(东经: 118°60'63.90", 北纬: 25°21'15.00"), 于 2021 年 3 月底从基地获取短葶山麦冬样品的叶和块根

各 3 份, 叶片材料取靠近株丛内侧健康叶, 根取饱满块根部分, 编号分别为 L1、L2、L3 和 R1、R2、R3, 经过清洗、干燥后立即在液氮中冷冻并储存于 -80°C 冰箱保存备用(图 1)。

1.2 RNA 提取、基因文库的构建及高通量测序

使用 TRIzol 试剂盒分别提取山麦冬样品中叶和根的总 RNA, 检测合格后, 经磁珠富集 mRNA, 随后打断 mRNA 成短片段, 并以 mRNA 为模板, 合成 cDNA, 经纯化、末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 最后经 PCR 扩增得到最终的基因文库。库检合格后, 通过 Illumina HiSeq™ 进行高通量测序, 基因文库的构建及高通量测序由北京诺禾致源科技有限公司完成。

1.3 质量控制与转录本的拼接和组装

为保证信息分析的准确性, 将测序得到的 raw reads 进行过滤纯化, 去除带接头、低质量以及无法辨别碱基信息含量高于 10% 的 reads, 得到 clean reads。采用 Trinity 对 clean reads 进行拼接, 再使用 Corset 对转录本进行层次聚类, 得到最终所需的单基因(unigene)。

1.4 Unigene 功能注释和分类

将得到的 unigene 通过 BLAST 与 Nr、Nt、

Pfam、KOG/COG、Swiss-prot、KEGG、GO 七大数据库进行比对与注释, 获得较为全面的基因功能信息。

1.5 山麦冬甾体皂苷类化合物合成相关基因的挖掘

结合 KEGG 注释结果和数据库中已知的基因信息, 利用本地 BLAST 进行检索比对, 将获得的 unigene 比对到 NCBI, 筛选出确定的 unigene 序列, 继而得到该 unigene 的蛋白功能注释信息, 从而确定本转录组数据库中与山麦冬甾体皂苷类化合物合成相关的基因。

1.6 山麦冬甾体皂苷类化合物合成差异基因的筛选

将组装好的转录本作为参考数据库, 用每千个碱基的转录每百万映射读取的片段数 (fragments per kilobase million, FPKM) 法计算测定每个样本的基因表达水平。以 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 2$ 、显著性 $P\text{-value} < 0.05$ 为筛选条件, 在短葶山麦冬叶和根组织中筛选出差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), $|\log_2(\text{fold change})|$ 值越大, 则表明差异表达越显著。

1.7 差异基因的共表达分析

为了研究基因的共表达模式, 通过相关系

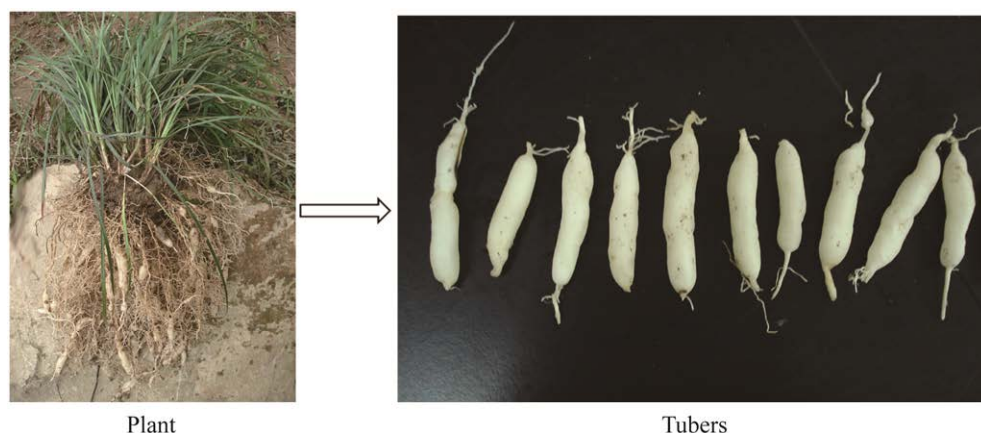


图 1 短葶山麦冬原植物与块根
Figure 1 *Liriope muscari* (Decne.) Baily plant and tubers.

数(Pearson 相关系数)来确定基因之间的共表达关系。根据差异酶基因的 FPKM 值构建共表达关系,用阈值($COR>0.9$, $P<0.01$)筛选甾体皂苷类合成途径中共表达的差异酶基因进行网络分析,并用 Cytoscape 软件构建基因共表达网络。

1.8 差异基因的转录因子预测

为了进一步探究转录因子与甾体皂苷合成代谢酶之间的调控关系,首先筛选出与代谢酶基因共表达的转录因子基因(Pearson 相关系数: $COR>0.98$, $P<0.01$),然后使用 PlantTFDB 网站(<http://planttfdb.gao-lab.org/>)转录因子分析工具预测转录因子与其共表达代谢酶之间的转录调控关系,并用 Cytoscape 软件构建转录调控网络图。

1.9 转录因子的启动子顺式元件分析

为了验证预测到的转录因子在各种胁迫反应中可能的调控机制,在 Phytozome 数据库(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)下载对应转录因子上游 2 000 bp 的序列,再使用 PlantCARE (<http://bioinformatics.Psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行基因启动子序列的顺式元件分析,最后使用 TBtools 进行可视化作图。

1.10 实时荧光定量 PCR 验证

使用引物设计软件 primer 5.0 设计的特异

性引物进行荧光定量 PCR 分析。实时荧光定量 PCR 扩增在以下热循环条件中进行,以 *TUB* 基因为内参基因,根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算差异代谢酶基因和转录因子基因的相对表达量,并对每个基因进行 3 次生物学重复。数据结果以平均值标准差表示,采用 SPSS 20 软件进行方差分析。引物序列见表 1。

2 结果与分析

2.1 山麦冬转录组的测序与组装

基于高通量测序结果,本次山麦冬块根与叶共获得 46.48 Gb 碱基序列。去除接头污染、未知碱基信息含量高于 10%以及低质量 reads;其中,块根和叶的 Q20 均大于 96.40%,且 Q30 均大于 90.70%,GC 含量均在 48.70%以上,碱基错误率为 0.02%,表明该样品的整个文库质量较高(表 2)。

2.2 基因功能注释

将组装得到的 unigene 与 Nr、Nt、Pfam、KOG、Swiss-prot、KEGG、GO 七大数据库进行比对,获得山麦冬不同部位各样品转录本基因的功能注释信息,共有 176 460 个基因成功得到注释,占总基因数的 60.55%。其中,在 Nr

表 1 qRT-PCR 实验所用引物列表

Table 1 The primers used for qRT-PCR analysis

Gene	Gene ID	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>CAS</i>	Cluster-24987.64706	TTGCCGAATGGTTTATCT	AATACTGTCTCCGTAAGC
<i>DHCR24</i>	Cluster-24987.62838	TGTGTCTGTGATAGTATT	AATGAAGGTGTTATGATG
<i>DXS</i>	Cluster-24987.76982	TATACACTGGCTCAATGCTA	GGAGAGGCTTGCTTAGAT
<i>HMGR</i>	Cluster-24987.91060	TCACATACCACTGACTTC	GACATCATTAGCATCTCTG
<i>GAI</i>	Cluster-24987.209392	GATGAAGAATAGAGTATAGAGTT	GCATATCCACAGTTACAG
<i>DOF2.4</i>	Cluster-52215.0	AACAACGGTAACAACAAC	ACTGAACTGAGGCATATC
<i>PIF4</i>	Cluster-24987.88916	AGAGGAGAAGAAGAGATAGA	AAGTTGGAGTTGAAGTGA
<i>SVP</i>	Cluster-24987.110418	ATCATCTTCTCGGCTACT	CATCCTGTGCTTCTCAAT
<i>TUB</i>	Cluster-24987.108659	TCAACTAATGTGGAATCA	TGGTCAATGTATCAACTT

数据库注释到的基因最多，有 151 581 个，占所有基因的 52.01%，其次分别是 GO、PFAM、SwissProt 数据库，分别有 115 264、114 483、114 187 个，占总基因数的 39.55%、39.28%、39.18%，而在 KOG 数据库中注释到的基因数目最少，仅有 45 351 个，占比为 15.56% (图 2A)。

进一步分析山麦冬转录组的 Nr 数据库注释分布，基因同源物种分布如图 2B 所示，油棕物种的基因同源性最高，有 43 270 条，占比

28.7%；其次是海枣物种，有 37 715 条，占比 25.0%，而小果野蕉、葡萄、莲藕分别占 9.1%、3.5%、3.2%。

2.3 Unigene 的 KEGG 分析

将山麦冬 unigene 与 KEGG 数据库比对，分析山麦冬的 unigene 可能参与或涉及的代谢途径。结果发现，有 61 205 条 unigenes 被注释到 5 个类群中，包括细胞过程(cellular processes)、环境信息处理(environmental information processing)、

表 2 短葶山麦冬根与叶的转录组数据

Table 2 Transcriptome data of the roots and leaves of *Liriope muscari* (Decne.) Bailly

Sample	Raw reads	Clean reads	Clean bases (Gb)	Error (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	G+C content (%)
L1	51 938 224	51 133 004	7.67	0.02	96.47	90.83	48.78
L2	56 686 812	54 663 590	8.20	0.02	96.44	90.77	48.88
L3	59 943 194	57 663 032	8.65	0.02	96.42	90.74	48.91
R1	47 380 770	46 548 894	6.98	0.02	97.85	93.87	49.34
R2	55 010 324	54 302 348	8.15	0.02	97.87	93.91	49.43
R3	46 382 218	45 502 646	6.83	0.02	97.71	93.58	48.99

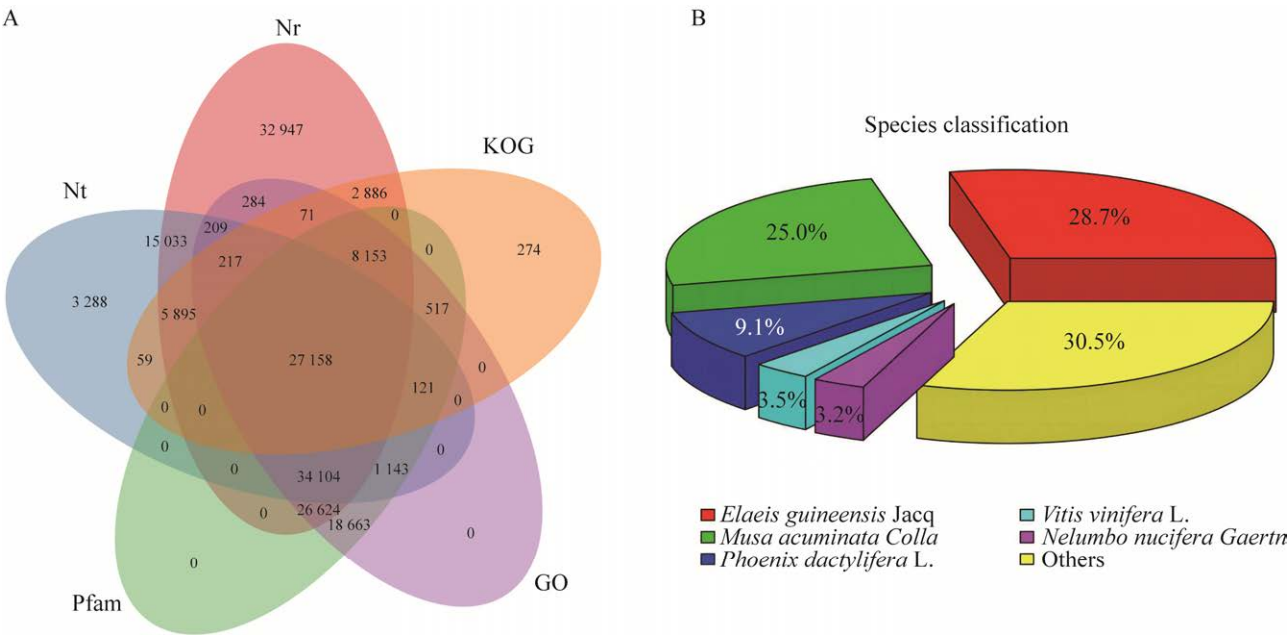


图 2 基因功能注释图 A: 5 个不同数据库的 unigene 注释韦恩图. B: 短葶山麦冬的 Nr 数据库物种注释分布

Figure 2 Gene function annotation diagrams. A: Unigene annotated Venn diagrams for 5 different databases. B: Distribution of species annotations in the Nr database of *Liriope muscari* (Decne.) Bailly.

遗传信息处理(genetic information processing)、代谢(metabolism)、有机系统(organismal systems),共参与了 19 个亚类的 136 条代谢途径。其中代谢作用类群所占比例最大,共有 27 194 条(44.43%),主要集中在碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism, 5 775 条);在遗传信息处理中主要集中在翻译(translation, 5 806 条);而在有机系统中主要集中在环境适应(environmental adaptation, 1 986 条);在环境信息处理中主要集中在信号传导(signal transduction, 1 644 条);在细胞过程中主要集中在运输和分解代谢(transport and catabolism, 2 771 条),见表 3。

2.4 山麦冬甾体皂苷生物合成相关基因分析

通过 KEGG 代谢通路进行进一步分析,发现与山麦冬甾体皂苷类生物合成相关的代谢通路主要有 3 条,分别是:萜类化合物骨架(terpenoid

backbone), 编号 Ko00900, 相关基因 396 条;倍半萜和三萜生物合成(sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis), 编号 Ko00909, 相关基因 72 条;甾体化合物合成(steroid biosynthesis), 编号 Ko00100, 相关基因 214 条。

为了进一步阐明甾体皂苷生物合成途径和相关酶基因的表达情况,本研究筛选出参与甾体皂苷生物合成的 31 个代谢酶(表 4)。其中,萜类化合物骨架合成阶段有 16 个,包括 AACT、HMGS、HMGR、MVK、MVD、MCT、MCS、HDS、HDR、DXS、DXR、CMK、PMK、IDI、GPPS 和 FPS;倍半萜和三萜生物合成阶段有 3 个,包括 FDFT1、SQLE、CAS;甾体化合物合成阶段有 12 个,包括 SMT1、SMO1、CPII、CYP51、TM7SF2、EBP、SMT2、SMO2、SC5DL、DHCR7、DHCR24 和 CYP710A (图 3)。

表 3 Unigene 的 KEGG 功能分类

Table 3 KEGG function classification of unigene

Group	Pathway	Number of unigene
Cellular processes	Transport and catabolism	2 771
Environmental information processing	Membrane transport	310
	Signal transduction	1 644
Genetic information processing	Translation	5 806
	Transcription	2 708
	Replication and repair	1 228
	Folding, sorting and degradation	4 742
Metabolism	Overview	3 989
	Nucleotide metabolism	1 785
	Metabolism of terpenoids and polyketides	1 258
	Metabolism of other amino acids	1 565
	Metabolism of cofactors and vitamins	1 750
	Lipid metabolism	2 679
	Glycan biosynthesis and metabolism	1 104
	Energy metabolism	2 650
	Carbohydrate metabolism	5 775
	Biosynthesis of other secondary metabolites	1 552
	Amino acid metabolism	3 087
	Environmental adaptation	1 986
Organismal systems		

表 4 山麦冬甾体皂苷类化合物合成相关代谢酶基因

Table 4 Genes for metabolic enzymes related to the synthesis of steroidal saponins in *Liriope muscari* (Decne.) Baily

No.	Name	Abbreviations	Ko number	Number of unigene
1	Acetyl-CoA C-acetyltransferase	<i>AACT</i>	Ko00626	29
2	Cycloartenol synthase	<i>CAS</i>	Ko01853	28
3	Cycloeucalenol cycloisomerase	<i>CPII</i>	Ko08246	7
4	Sterol 14 alpha-demethylase	<i>CYP51</i>	Ko05917	2
5	Sterol 22-desaturase	<i>CYP710A</i>	Ko09832	3
6	Delta 24-sterol reductase	<i>DHCR24</i>	Ko09828	8
7	7-dehydrocholesterol reductase	<i>DHCR7</i>	Ko00213	17
8	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase	<i>DXR</i>	Ko00099	22
9	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	<i>DXS</i>	Ko01662	24
10	Cholestenol delta-isomerase	<i>EBP</i>	Ko01824	7
11	Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase	<i>FDFT1</i>	Ko00801	31
12	Farnesyl diphosphate synthase	<i>FPS</i>	Ko00787	7
13	(E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	<i>HDS</i>	Ko03526	25
14	Geranylgeranyl diphosphate synthase	<i>GGPS</i>	Ko13789	3
15	Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase	<i>HMGR</i>	Ko00021	11
16	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	<i>HMGS</i>	Ko01641	12
17	Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase	<i>IDI</i>	Ko01823	14
18	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase	<i>MCT</i>	Ko00991	6
19	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	<i>CMK</i>	Ko00919	2
20	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	<i>MCS</i>	Ko01770	28
21	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate reductase	<i>HDR</i>	Ko03527	5
22	Phosphomevalonate kinase	<i>PMK</i>	Ko00938	13
23	Diphosphomevalonate decarboxylase	<i>MVD</i>	Ko01597	10
24	Mevalonate kinase	<i>MVK</i>	Ko00869	5
25	Delta7-sterol 5-desaturase	<i>SC5DL</i>	Ko00227	4
26	Plant 4,4-dimethylsterol C-4alpha-methyl-monooxygenase	<i>SMO1</i>	Ko14423	9
27	Plant 4alpha-monomethylsterol monooxygenase	<i>SMO2</i>	Ko14424	6
28	Sterol 24-C-methyltransferase	<i>SMT1</i>	Ko00559	17
29	24-methylenesterol C-methyltransferase	<i>SMT2</i>	Ko08242	4
30	Squalene monooxygenase	<i>SQLE</i>	Ko00511	24
31	Delta14-sterol reductase	<i>TM7SF2</i>	Ko00222	5

2.5 山麦冬甾体皂苷生物合成差异表达基因分析

通过分析短葶山麦冬叶和根的甾体皂苷类化合物合成途径相关的差异基因, 共有 34 条 DEGs; 其中, 萜类化合物骨架合成途径中有 3 条下调的 DEGs, 11 条上调的 DEGs; 倍半萜和三萜生物合成途径中有 1 条上调的 DEGs; 甾体化合物

合成途径中有 4 条下调的 DEGs, 15 条上调 DEGs。这些差异基因共涉及到甾体皂苷类化合物合成的 15 个代谢酶(图 4), 推测这些代谢酶在短葶山麦冬叶与根的甾体皂苷生物合成过程中发挥了一定的作用, 具有重要的挖掘价值。根据基因表达分析发现, 34 条代谢酶基因中有 27 条代谢酶基因在叶中表达而在根中不表达;

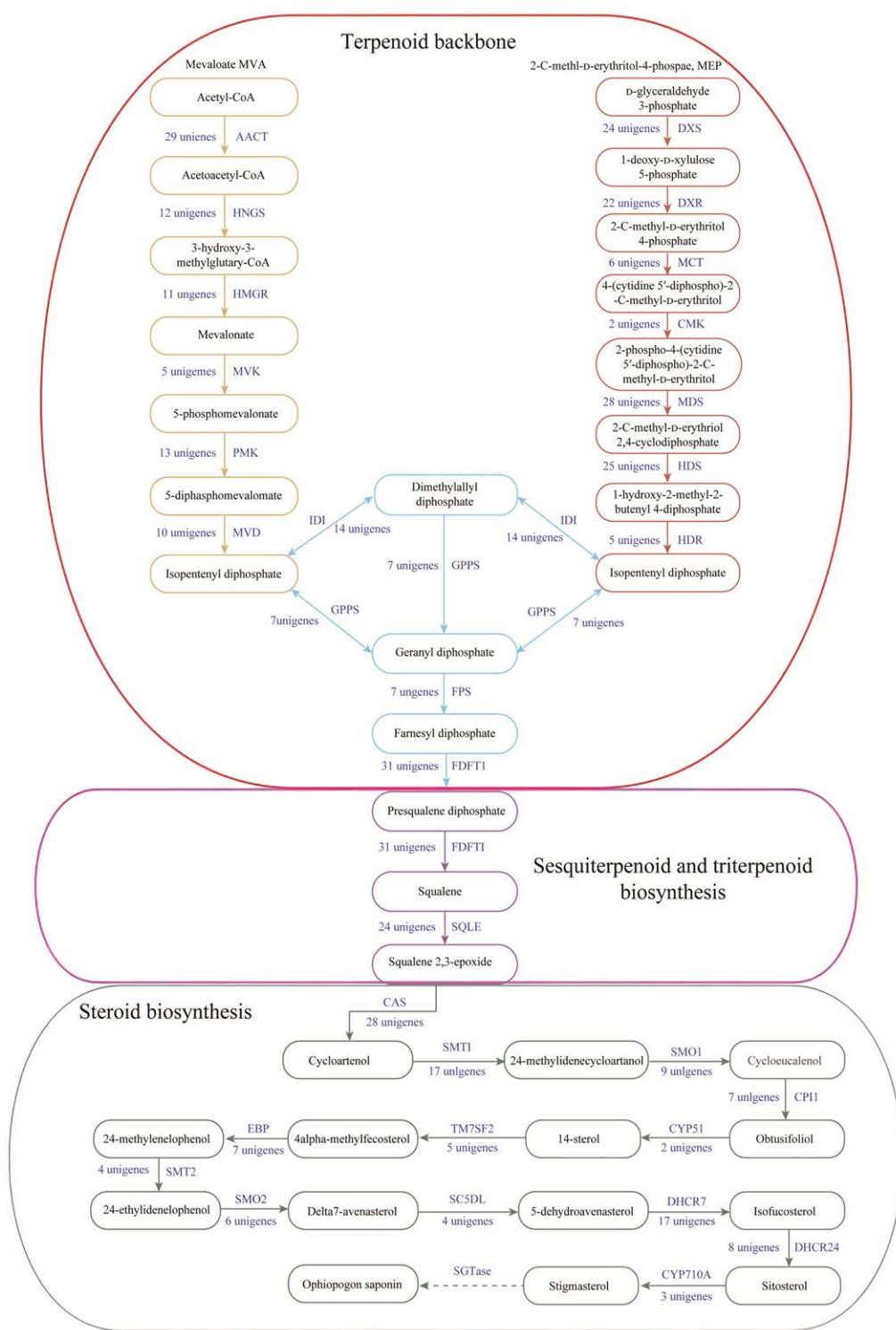


图3 山麦冬甾体皂苷类物质合成途径 蓝色文字表示通路中代谢酶及 unigene 数量, 实线箭头表示已识别的酶反应, 虚线表示未识别的酶反应

Figure 3 Synthetic pathway of steroidal saponins from *Liriope muscari* (Decne.) Bailly. The blue text indicates the number of key enzymes and unigenes in the pathway, the solid arrow indicates the identified enzyme reaction, and the dotted line indicates the unrecognized enzyme reaction.

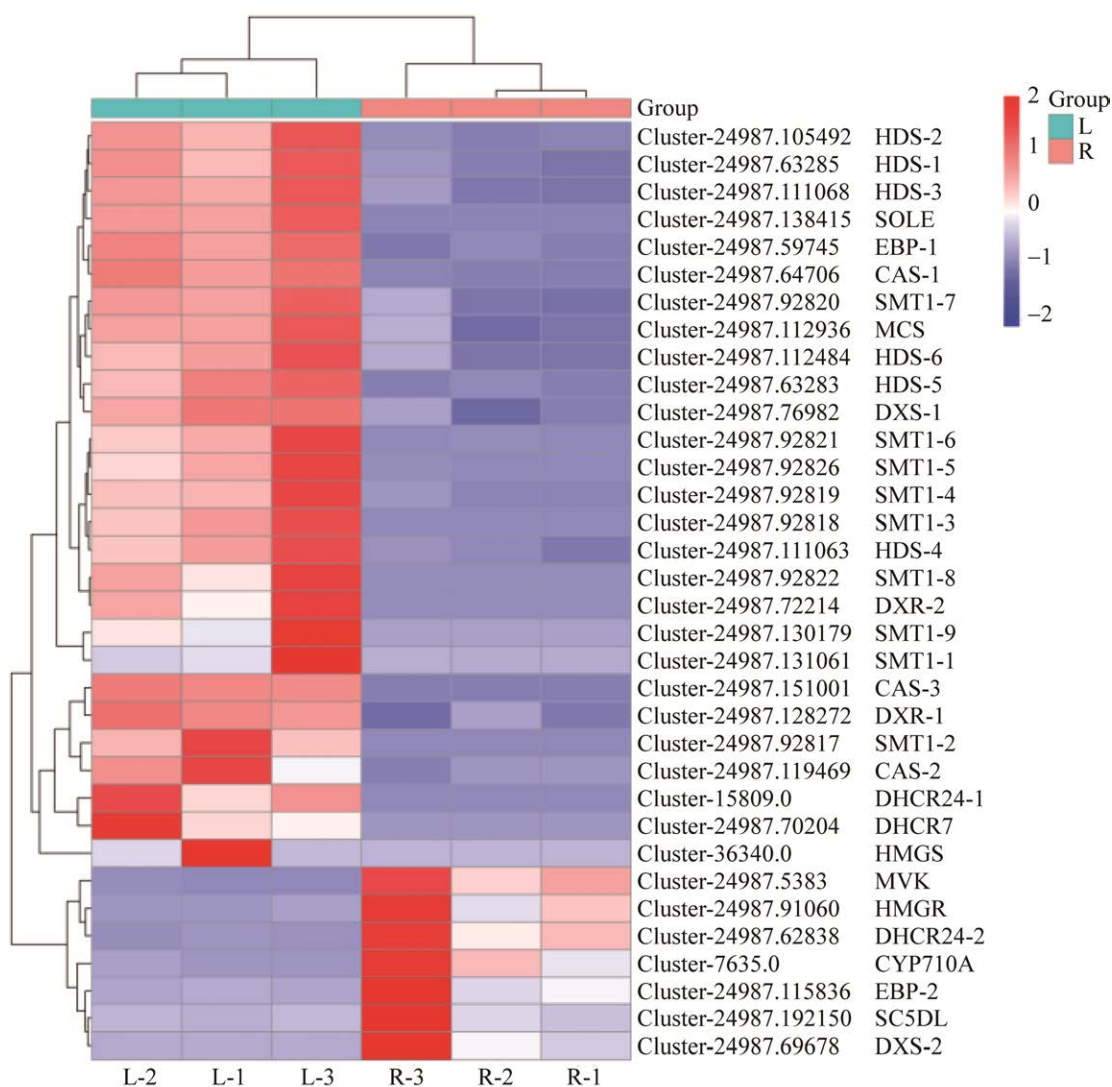


图 4 代谢酶基因差异表达分析

Figure 4 Differential expression analysis of metabolic enzyme genes.

相反, 仅有 *MVK*、*HMGS*、*DHCR24*、*CYP710A*、*EBP*、*SC5DL* 和 *DXS* 这 7 条代谢酶基因在根中表达。

2.6 山麦冬甾体皂苷生物合成途径中 DEGs 的共表达网络分析

为了进一步分析 15 个差异代谢酶之间的表达模式, 探究它们与甾体皂苷生物合成过程的相关性, 通过 Pearson 相关系数(阈值: $COR > 0.9$, $P < 0.01$)筛选甾体皂苷类合成途径中共表达的差异酶基因进行网络分析, 并构建基

因共表达网络。如图 5 所示, 14 个甾体皂苷类生物合成代谢酶具有共表达模式, 共涉及 31 条 DEGs。结果表明, 这 14 个共表达酶具有一致的调控作用, 推测它们可能共同参与调控短葶山麦冬叶与根中甾体皂苷类化合物的积累。

2.7 山麦冬甾体皂苷生物合成途径中 DEGs 与转录调控因子共表达的网络分析

植物转录因子对甾体皂苷类代谢物的调控发挥重要作用。在短葶山麦冬转录组数据中,

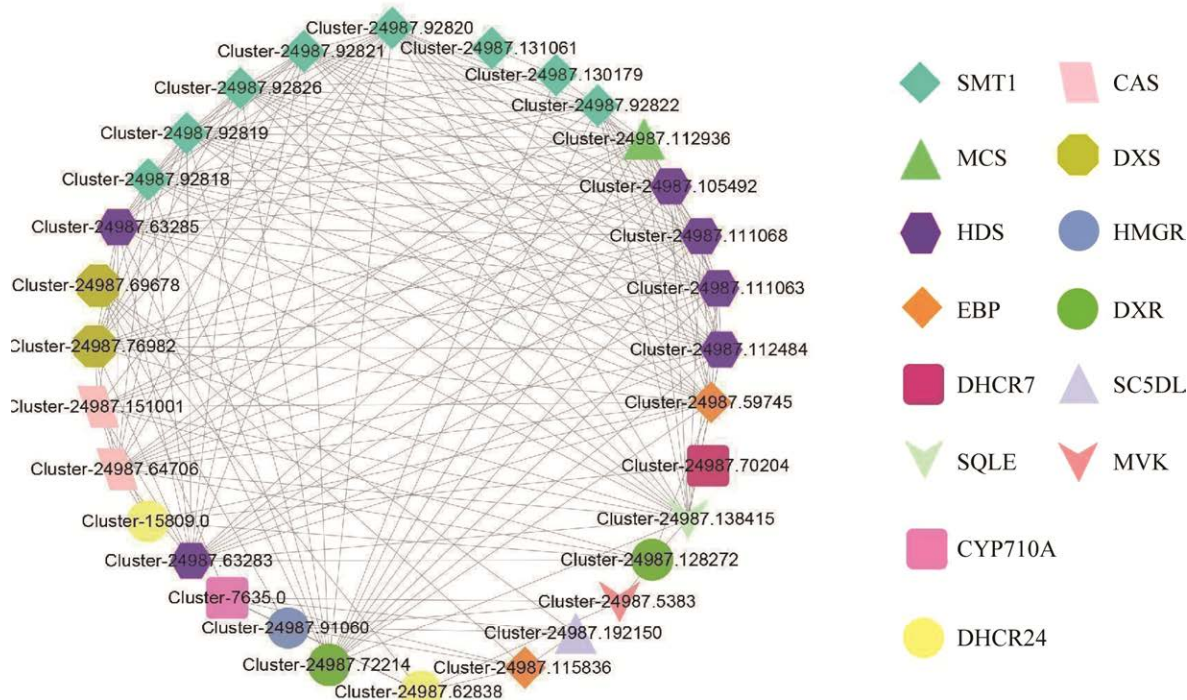


图5 甾体皂苷生物合成途径酶基因共表达网络

Figure 5 Co-expression network of steroid saponin biosynthesis pathway enzyme genes.

共鉴定了 8 039 条 unigenes 参与编码 81 个 TFs 家族。其中 *MYB* (605 条)、*C2H2* (426 条)、*C3H* (419 条)、*FAR1* (326 条)、*AP2-EREPB* (321 条)、*Orphans* (310 条)、*bHLH* (305 条)、*HB* (292 条)、*NAC* (272 条)和 *bZIP* (217 条)为数目最多的前 10 个 TFs 家族。

为深入研究转录因子调控甾体皂苷积累的关键酶,根据 Pearson 相关系数 $COR > 0.98$, $P < 0.01$ 共筛选出 109 个与关键酶具有共表达模式的转录因子,进一步对其转录调控关系进行预测,最终得到 8 个对差异代谢酶具有调控作用的转录因子。研究发现,与差异酶基因具有共表达模式的转录因子共有 A、B、C 三个组,分别有 6 个、1 个和 1 个转录因子(图 6)。在 A 组中, *GAI*、*SVP*、*LHCA4* 和 *PIL6* 分别调控 2 条代谢酶基因, *PIF4* 调控 3 条代谢酶基因, *ERF6*

调控 1 条代谢酶基因;在 B 组中, *DOF2.4* 调控 3 条代谢酶基因;而 C 组中 *NF-YB3* 调控 2 条代谢酶基因。

2.8 山麦冬转录因子启动子顺式元件分析

为了进一步验证预测到的转录因子在各种胁迫反应中可能的调控机制,对预测到的 8 个转录因子进行启动子顺式元件分析(图 7)。结果显示,在调控短葶山麦冬甾体皂苷合成代谢酶的转录因子基因的上游 2 000 bp 的启动子区域中,主要含有 ABRE、G-box、MBS、GATA-motif、GA-motif 和 AE-box 等顺式元件;其中, MBS 是响应干旱诱导胁迫相关的顺式元件, ABRE 是响应植物生理调控的顺式元件,也是 8 个转录因子中数量最多的顺式元件。结果表明,这 8 个转录因子的调控机制与植物生理调控、非生物胁迫应激等基因表达调控有关。

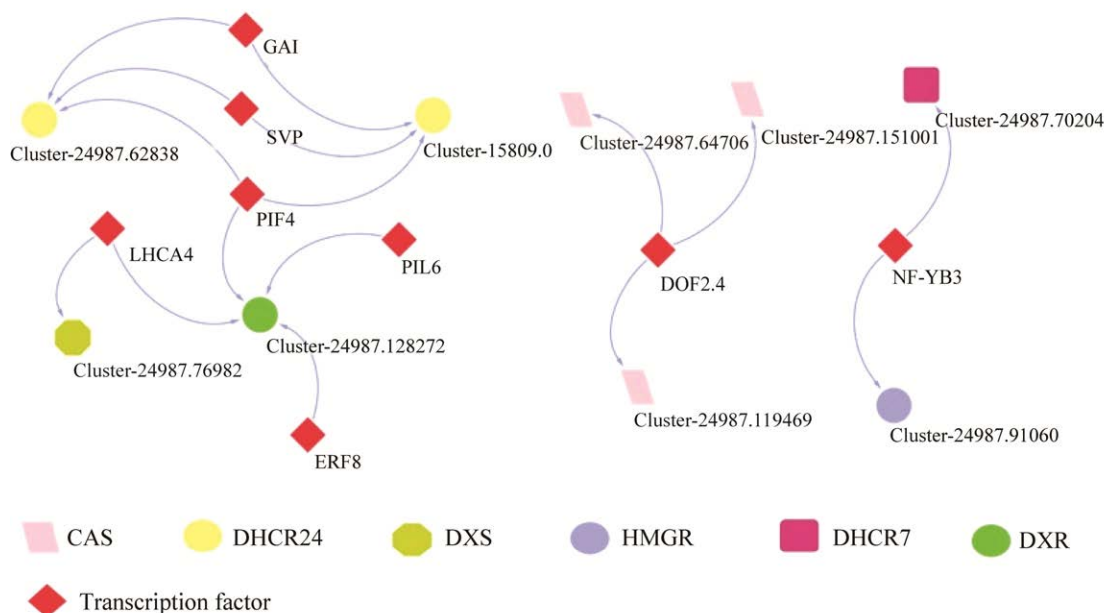


图 6 甾体皂苷生物合成基因及其可能的调控转录因子基因与酶基因调控网络

Figure 6 Regulatory networks of steroid saponin biosynthesis genes, their possible regulatory transcription factor genes, and enzyme genes.

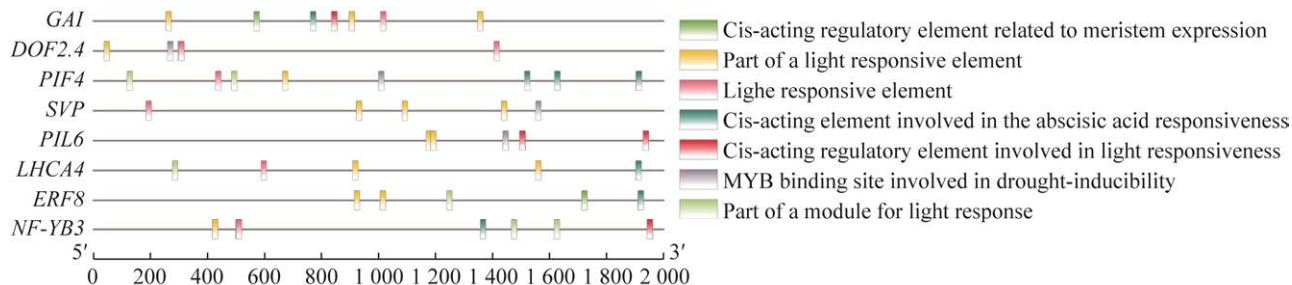


图 7 八个转录因子的启动子元件分析

Figure 7 Analysis of the promoter elements of 8 transcription factors.

2.9 山麦冬叶和根中差异表达的转录因子与代谢酶基因的 qRT-PCR 验证

随机对其中 8 个关键转录因子和代谢酶基因在叶和根的差异表达情况进行 qRT-PCR 验证。如图 8 所示, 短莠山麦冬甾体皂苷合成代谢酶基因 *GAS*、*DXS* 在叶中的表达量显著高于根, 酶基因 *DHCR24*、*HMGR* 在根中的表达量显著高于叶; 参与甾体皂苷合成代谢的转录因子 *GAI* 在根中的表达量显著高于叶, *DOF2.4*、

PIF4 和 *SVP* 在叶中的表达量显著高于根。通过 qRT-PCR 验证分析, 结果表明这些转录因子基因在叶与根中的表达差异情况与测序结果一致, 证明其数据可靠。

3 讨论与结论

甾体皂苷作为植物中重要的次生代谢产物, 在植物体内的生物合成主要包括 3 条途径, 萜类化合物骨架合成为上游途径, 下游途径为

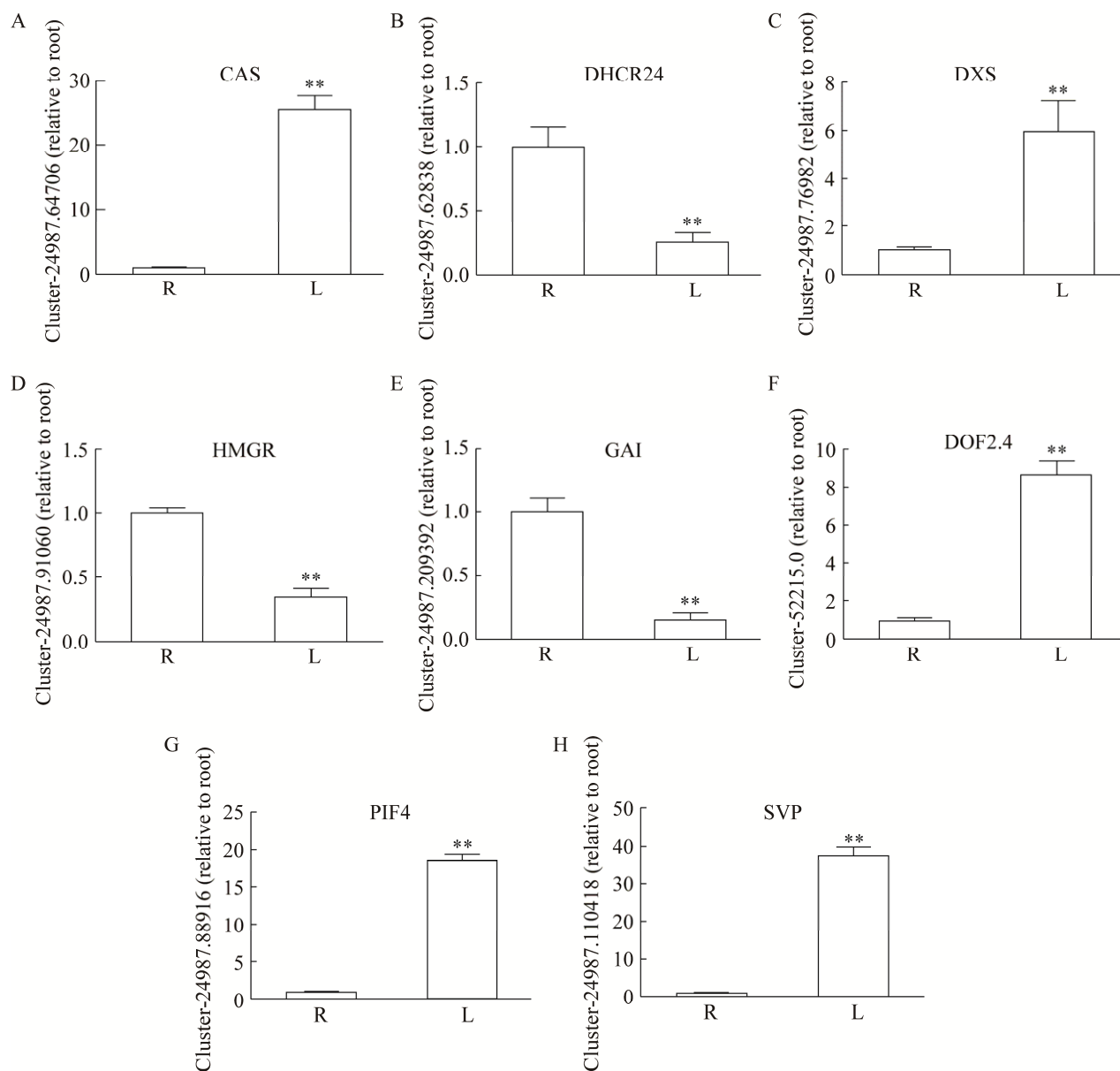


图 8 八个转录因子和代谢酶基因差异表达的 qRT-PCR 分析 数据结果以平均值标准差表示, 采用 SPSS 2.00 软件进行方差分析, **: $P < 0.01$, 差异非常显著

Figure 8 qRT-PCR analysis of 8 transcription factors and enzyme genes. Data are expressed as the mean ANOVA using SPSS 2.00 software, **: $P < 0.01$, very significant difference.

倍半萜和三萜生物合成与甾体化合物合成。本研究共挖掘出 682 条 unigenes 以及编码的 31 个代谢酶参与这 3 种合成过程, 其中上游途径包括 *AACT*、*HMGR*、*DXS* 和 *DXR* 等 16 个代谢酶, 下游途径包括 *SQLE*、*CAS*、*FPS*、*SMO1*、*SMT1*

和 *CYP710A* 等 15 个代谢酶, 几乎涉及短葶山麦冬甾体皂苷生物合成的各个关键过程。目前根据 KEGG 通路对植物甾体皂苷生物合成途径进行解析, 已识别的酶反应过程中共有 31 个代谢酶参与其合成, 而本测序结果共挖掘出 31 个,

表明本研究通过转录组测序可以充分挖掘参与短莠山麦冬甾体皂苷生物合成中的各个代谢酶。

为进一步探究代谢酶基因对短莠山麦冬叶与根甾体皂苷积累的影响,本研究分析了甾体皂苷合成代谢酶的表达模式。基因差异表达分析结果显示,叶与根比较,共有 15 个代谢酶在甾体皂苷合成途径中的表达具有明显的差异。MVA 与 MEP 途径是组成甾体皂苷生物合成上游途径中最重要的两个部分;其中,MVA 途径主要包括 3 个代谢酶 *HMGR*、*HMGS*、*MVK*。*HMGR* 是 MVA 途径中第一个关键限速酶,对甾体皂苷的合成具有重要调控作用。已有研究表明,通过上调 *HMGR* 的表达水平能够促进甾体皂苷的合成^[17]。*HMGS* 是 MVA 途径中催化乙酰辅酶 A 与乙酰乙酰辅酶 A 缩合反应的第二个关键酶,在 MVA 途径中起正向调控作用,过表达的 *HMGS* 可以显著增加甾体皂苷合成途径下游甾醇的含量^[18]。同时,MEP 途径中主要包括 4 个代谢酶 *DXS*、*DXR*、*HDS* 与 *MCS*。*DXS* 与 *DXR* 是 MEP 途径中影响下游产物合成的限速酶,通过提高 *DXS* 与 *DXR* 的基因表达水平有利于促进甾体皂苷合成途径上游萜类化合物的积累^[19]。因此,在甾体皂苷生物合成的上游 MVA 与 MEP 途径中,*HMGR*、*HMGS*、*DXS* 与 *DXR* 可能是影响甾体皂苷生物合成下游产物的关键酶,对甾体皂苷的积累具有重要调控作用。另外,在甾体皂苷生物合成的下游途径中主要包括 8 个代谢酶 *SQLE*、*CAS*、*SMT1*、*EBP*、*SC5DL*、*DHCR7*、*DHCR24* 和 *CYP710A*。其中,*SQLE* 是合成甾体皂苷下游合成途径中重要的催化酶,能催化角鲨烯合成甾体皂苷前体 2,3-氧化角鲨烯^[20]。研究显示,在外源激素脱落酸(abscisic acid, ABA)与 GA3 的诱导下可以上调 *SQLE* 的表达,促进甾体皂苷的积累^[21]。*CAS* 是众多环氧角鲨烯环化酶(oxidosqualene cyclases,

OSCs)其中的一种^[22],在催化 2,3-氧化角鲨烯向甾体先导化合物环阿屯醇转化中起到重要作用^[23]。而 *FPS* 是下游途径中催化合成甾体皂苷的第一个关键酶,可以正向调控甾体皂苷的合成。研究表明,上调 *FPS* 基因的表达水平同时抑制 *CAS* 基因表达比调控单个基因更有利于皂苷的积累,其原因可能为降低 *CAS* 的表达可以减少前体向其他植物甾醇分支方向合成,从而增加前体向皂苷合成方向流动^[24]。因此,在甾体皂苷生物合成的下游阶段,*CAS* 和 *SQLE* 可能是参与调控甾体皂苷积累的关键酶。此外,本研究的基因差异表达分析发现,下游途径中大部分代谢酶基因的表达水平表现为叶高于根,表明这些代谢酶可能在下游阶段对甾体皂苷在叶中的积累起促进作用。然而,以往有研究表明在药用植物中甾体皂苷的差异表达水平多表现为根高于叶^[25],表达水平越高则代谢产物积累越丰富,分析其原因可能与短莠山麦冬的生长年限较短有关,也有研究表明在生长年限较短时代谢产物主要在叶中积累,而较长时则在根中积累^[26]。综上所述,通过差异表达分析所挖掘的 15 个代谢酶可能在短莠山麦冬的甾体皂苷差异积累中发挥重要作用;其中,在甾体皂苷生物合成的上游阶段的 *HMGS*、*HMGR*、*DXS* 和 *DXR* 代谢酶及下游阶段的 *SQLE*、*CAS* 代谢酶可能是影响其甾体皂苷积累的主要关键酶。

在植物中,转录因子可以通过转录激活或抑制生物合成途径中代谢酶的基因以调节甾体皂苷积累。在本研究中,通过基因的共表达网络构建短莠山麦冬甾体皂苷合成的 8 个转录因子与 *DXS*、*DXR*、*HMGR*、*CAS*、*DHCR7* 和 *DHCR24* 这 6 个代谢酶之间的调控网络。结果显示,与差异酶基因具有共表达模式的转录因子共有 A、B、C 三个组。在 A 组中有 6 个转

录因子与 4 个代谢酶基因具有共表达模式, 其中, *GAI* 和 *SVP* 可以调控 1 个代谢酶 *DHCR24*; 而 *PIF4* 可以调控 2 个代谢酶 *DHCR24* 与 *DXR*; *PIL6* 与 *ERF8* 均能调控 *DXR*; *LHCA4* 可以调控 2 个代谢酶 *DXS* 与 *DXR*; 在 B 组中有 1 个转录因子 *DOF2.4* 与代谢酶 *CAS* 的 3 条基因具有共表达模式; 在 C 组中有 1 个转录因子 *NF-YB3* 与 2 个代谢酶 *DHCR7*、*HMGR* 具有共表达模式。其中, *GAI* 是植物转录因子 *GRAS* 家族的核心成员, 可以抑制二萜类植物激素赤霉素(gibberellic acid, GA)的合成^[27-28]。GA 是调控植物生长发育的一类重要激素。研究表明, 甘草在 GA 诱导后可以上调 *SQLE* 的表达, 从而促进甾醇在甘草中的积累^[21]。另外, *PIF4* 与 *PIL6* 都是植物转录因子 *bHLH* 家族的转录因子。研究表明, *bHLH* 家族的转录因子在调控萜类及植物甾醇类物质代谢中具有重要作用, 而 *PIF4* 可以通过与油菜素内酯生物合成过程中关键的生物合成基因的启动子区域结合以促进其基因的表达^[29], 从而促进油菜素内酯的生物合成。其中, 油菜素内酯是植物甾醇类衍生物, 其合成主要通过植物甾醇类生物合成途径。*ERF8* 是来自植物 *ERF* 家族的转录因子之一。大量研究显示, *ERF* 家族的转录因子可以正向调控植物萜类化合物的生物合成, 可以上调 *DXS*、*HDS*、*AACT* 等萜类合成代谢酶基因的表达水平, 从而促进萜类化合物合成^[30]。目前尚未有研究直接表明 *SVP*、*LHCA4* 及 *NF-YB3* 对甾体皂苷生物合成的调控作用, 但它们具有其他调控植物生长发育的功能。研究表明, *SVP* 可以调控植物芽休眠过程^[31]; *LHCA4* 可以调控植物叶绿素的积累^[32]; *NF-YB3* 的过表达可以增加植物的干旱耐受性^[33]; 而 *DOF2.4* 目前未有研究报道其相关功能。综上所述, 推测在短葶山麦冬中 *GAI*、*PIF4*、*PIL6* 及 *ERF8* 可能是参与调控其甾体皂苷合成的重

要转录因子。

通过启动子分析预测关键转录因子的调控机制, 可以很大程度提高对基因调控的认识水平, 也可以进一步促进甾体皂苷积累的分子机制解析。因此, 本研究对山麦冬甾体皂苷合成代谢酶调控的 8 个转录因子进行了启动子顺式元件分析。在 8 个转录因子的启动子区域鉴定出多种类型的顺式作用元件, 主要包括脱落酸响应元件(abscisic acid responsive elements, ABRE)、干旱诱导胁迫响应元件(MYB binding site involved in drought-inducibility, MBS)、光响应元件(light response element, G-box)等。其中, 8 个转录因子的启动子区域数量最多的顺式元件主要为 ABRE。ABRE 是参与 ABA 响应的顺式元件, 而 ABA 是在渗透胁迫条件下产生的对植物种子发育和发芽有着重要作用的植物激素之一^[34-35]。研究表明, ABA 诱导可以增强 *SQLE* 的启动子活性以上调其表达水平, 从而促进甾醇在植物体内的积累^[21]。此外, ABA 还能与 NO 相互作用, 共同调节马铃薯块茎的休眠与发芽^[36]。而 MBS 参与植物干旱胁迫诱导的表达, 对提高植物的耐旱性有着重要作用^[37]。这些调控机制可以使植物更好地适应外界环境变化, 利于活性成分的积累。本研究预测的转录因子调控机制主要涉及植物的生理调控与非生物胁迫应激调控, 特别是 MBS 和 ABA 响应途径, 可能参与调控短葶山麦冬甾体皂苷的积累。另外, 应用 qRT-PCR 对短葶山麦冬叶与根的差异表达情况进行验证分析, 结果表明这些转录因子和代谢酶基因在叶与根中差异表达趋势与转录组测序结果相一致, 证明测序结果真实可靠。

本研究通过高通量测序技术对短葶山麦冬转录组进行测序, 首次建立了短葶山麦冬叶和根的转录组数据库, 并利用生物信息学的工具与方法从分子水平对短葶山麦冬的甾体皂苷生

物合成途径及其转录调控机制进行解析,有助于进一步阐释调控短葶山麦冬甾体皂苷积累的分子机制,为调控短葶山麦冬甾体皂苷的积累提供了思路,同时也为今后短葶山麦冬的甾体皂苷类化合物深入研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] 王冠明. 麦冬种质资源与遗传多样性研究[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2010.
WANG GM. Study on germplasm resources and genetic diversity of Lilyturf[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Forestry University, 2010 (in Chinese).
- [2] 曹世伟. 新优麦冬品种及繁殖应用技术介绍[J]. 上海建设科技, 2021(5): 79-82.
CAO SW. Introduction of new superior *Ophiopogon japonicus* varieties and their propagation and application techniques[J]. Shanghai Construction Science & Technology, 2021(5): 79-82 (in Chinese).
- [3] 万学锋, 黄玉吉, 陈菁瑛, 赖钟雄. 山麦冬研究进展[J]. 亚热带农业研究, 2008, 4(2): 97-100.
WAN XF, HUANG YJ, CHEN JY, LAI ZX. Advances in *Liriope lout*[J]. Subtropical Agriculture Research, 2008, 4(2): 97-100 (in Chinese).
- [4] CHEN MH, CHEN XJ, WANG M, LIN LG, WANG YT. *Ophiopogon japonicus*—a phytochemical, ethnomedicinal and pharmacological review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 181: 193-213.
- [5] 迟宇昊, 李暘, 申远. 麦冬化学成分及药理作用研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2021, 38(2): 189-192.
CHI YH, LI Y, SHEN Y. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Ophiopogon japonicus*[J]. Journal of Xinxiang Medical University, 2021, 38(2): 189-192 (in Chinese).
- [6] 高龙龙, 尹丽君, 孟伟凡, 张则宽, 张旻昱. 麦冬及其有效成分抗心脑血管疾病的药理研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2021, 19(13): 182-185.
GAO LL, YIN LJ, MENG YF, ZHANG ZK, ZHANG MY. Research progress on the pharmacological effect of *ophiopogonis radix* and relative effective components on cardiovascular and cerebrovascular diseases[J]. Chinese Medicine Modern Distance Education of China, 2021, 19(13): 182-185 (in Chinese).
- [7] UPADHYAY S, JEENA GS, SHIKA, SHUKLA RK. Recent advances in steroidal saponins biosynthesis and *in vitro* production[J]. Planta, 2018, 248(3): 519-544.
- [8] FERNÁNDEZ-CABEZÓN L, GALÁN B, GARCÍA JL. New insights on steroid biotechnology[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 958.
- [9] 张雪, 王希付, 赵荣华, 俞捷, 顾雯, 付兴情, 曹冠华, 贺森. 药用植物甾体皂苷生物合成途径研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 225-234.
ZHANG X, WANG XF, ZHAO RH, YU J, GU W, FU XQ, CAO GH, HE S. Research progress on biosynthesis pathways of steroid saponins in medicinal plants[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2020, 26(14): 225-234 (in Chinese).
- [10] CHEN YY, WU JK, YU D, DU XW. Advances in steroidal saponins biosynthesis[J]. Planta, 2021, 254(5): 91.
- [11] GUO JD, HUANG Z, SUN JL, CUI X, LIU Y. Research progress and future development trends in medicinal plant transcriptomics[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 691838.
- [12] WANG MZ, QIU XX, PAN X, LI CL. Transcriptional factor-mediated regulation of active component biosynthesis in medicinal plants[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2021, 22(6): 848-866.
- [13] 尹艳, 关红雨, 张夏楠. 甾体皂苷生物合成相关酶及基因研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(8): 1332-1336.
YIN Y, GUAN HY, ZHANG XN. Review on enzymes and genes related to the biosynthesis of steroidal saponins[J]. Natural Product Research and Development, 2016, 28(8): 1332-1336 (in Chinese).
- [14] SINGH AK, KUMAR SR, DWIVEDI V, RAI A, PAL S, SHASANY AK, NAGEGOWDA DA. A WRKY transcription factor from *Withania somnifera* regulates triterpenoid withanolide accumulation and biotic stress tolerance through modulation of phytosterol and defense pathways[J]. The New Phytologist, 2017, 215(3): 1115-1131.
- [15] 董燕梅, 张文颖, 凌正一, 李靖锐, 白红彤, 李慧, 石雷. 转录因子调控植物萜类化合物生物合成研究进展[J]. 植物学报, 2020, 55(3): 340-350.
DONG YM, ZHANG WY, LING ZY, LI JR, BAI HT, LI H, SHI L. Advances in transcription factors regulating plant terpenoids biosynthesis[J]. Bulletin of

- Botany, 2020, 55(3): 340-350 (in Chinese).
- [16] 苏文炳, 蒋园园, 白昀鹭, 甘小清, 刘月学, 林顺权. 转录因子调控植物萜类化合物生物合成研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(5): 919-926.
- SU WB, JIANG YY, BAI YL, GAN XQ, LIU YX, LIN SQ. Advances in transcription factors regulation on plant terpene biosynthesis[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(5): 919-926 (in Chinese).
- [17] SHAIKH S, SHRIRAM V, KHARE T, KUMAR V. Biotic elicitors enhance diosgenin production in *Helicteres isora* L. suspension cultures via up-regulation of *CAS* and *HMGR* genes[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants: an International Journal of Functional Plant Biology, 2020, 26(3): 593-604.
- [18] LIAO P, LUNG SC, CHAN WL, HU ML, KONG GKW, BACH TJ, HAO Q, LO C, CHYE ML. Overexpression and inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase affect central metabolic pathways in tobacco[J]. Plant & Cell Physiology, 2021, 62(1): 205-218.
- [19] VACCARO M, OCAMPO BERNAL V, MALAFRONT N, de TOMMASI N, LEONE A. High yield of bioactive abietane diterpenes in *Salvia sclarea* hairy roots by overexpressing cyanobacterial *DXS* or *DXR* genes[J]. Planta Medica, 2019, 85(11/12): 973-980.
- [20] 邵喜喜, 孟云鹤, 周沈婷, 刘欣婷, 蒋慧姝, 效啸, 杨京, 卫功元, 王崇龙. 环氧角鲨烯合成通路在大肠杆菌中的构建和优化[J]. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2105-2115.
- AHAO XX, MENG YH, ZHOU ST, LIU XT, JIANG HS, XIAO X, YANG J, WEI GY, WANG CL. Construction and optimization of squalene epoxide synthetic pathway in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(06): 2105-2115 (in Chinese).
- [21] MANZOOR MM, GOYAL P, PANDOTRA P, DAR MS, DAR MJ, MISRA P, GUPTA AP, VISHWAKARMA RA, AHUJA A, DHAR MK, GUPTA S. Transcriptome-wide identification of squalene epoxidase genes from *Glycyrrhiza glabra* L.: expression analysis and heterologous expression of GgSQE1 suggest important role in terpenoid biosynthesis[J]. Protoplasma, 2021, 258(5): 991-1007.
- [22] 陈翠玉, 庞亚如, 陈泉冰, 李春, 吕波. 环氧角鲨烯环化酶在三萜化合物生物合成中的进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 443-459.
- CHEN CY, PANG YR, CHEN QB, LI C, L(U) B. Oxidosqualene cyclases in triterpenoids biosynthesis: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 443-459 (in Chinese).
- [23] GUO SY, YIN Y, LEI T, SHI YH, GAO W, ZHANG XN, LI J. A cycloartenol synthase from the steroidal saponin biosynthesis pathway of *Paris polyphylla*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2021, 23(4): 353-362.
- [24] YANG Y, GE F, SUN Y, LIU DQ, CHEN CY. Strengthening triterpene saponins biosynthesis by over-expression of farnesyl pyrophosphate synthase gene and RNA interference of cycloartenol synthase gene in *Panax notoginseng* cells[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2017, 22(4): 581.
- [25] LEI YY, HARRIS AJ, WANG AH, ZHAO LY, LUO M, LI J, CHEN HF. Comparative transcriptomic analysis of genes in the triterpene saponin biosynthesis pathway in leaves and roots of *Ardisia kteniophylla* A. DC., a plant used in traditional Chinese medicine[J]. Ecology and Evolution, 2022, 12(5): e8920.
- [26] LIAO WF, MEI ZN, MIAO LH, LIU PL, GAO RJ. Comparative transcriptome analysis of root, stem, and leaf tissues of *Entada phaseoloides* reveals potential genes involved in triterpenoid saponin biosynthesis[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 1-12.
- [27] FU X, SUDHAKAR D, PENG J, RICHARDS DE, CHRISTOU P, HARBERD NP. Expression of *Arabidopsis* GAI in transgenic rice represses multiple gibberellin responses[J]. The Plant Cell, 2001, 13(8): 1791-1802.
- [28] ITO T, FUKAZAWA J. SCARECROW-LIKE3 regulates the transcription of gibberellin-related genes by acting as a transcriptional co-repressor of GAI-ASSOCIATED FACTOR1[J]. Plant Molecular Biology, 2021, 105(4/5): 463-482.
- [29] WEI ZY, YUAN T, TARKOWSKÁ D, KIM J, NAM HG, NOVÁK O, HE K, GOU XP, LI J. Brassinosteroid biosynthesis is modulated via a transcription factor cascade of COG1, PIF4, and PIF5[J]. Plant Physiology, 2017, 174(2): 1260-1273.
- [30] WEI QH, LAN KE, LIU YY, CHEN R, HU TY, ZHAO SJ, YIN XP, XIE T. Transcriptome analysis reveals regulation mechanism of methyl jasmonate-induced terpenes biosynthesis in *Curcuma wenyujin*[J]. PLoS

- One, 2022, 17(6): e0270309.
- [31] da SILVEIRA FALAVIGNA V, GUITTON B, COSTES E, ANDRÉS F. I want to (bud) break free: the potential role of *DAM* and *SVP*-like genes in regulating dormancy cycle in temperate fruit trees[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 9: 1990.
- [32] YAMATANI H, KOHZUMA K, NAKANO M, TAKAMI T, KATO Y, HAYASHI Y, MONDEN Y, OKUMOTO Y, ABE T, KUMAMARU T, TANAKA A, SAKAMOTO W, KUSABA M. Impairment of *Lhca4*, a subunit of *LHCI*, causes high accumulation of chlorophyll and the stay-green phenotype in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(5): 1027-1035.
- [33] ZHANG T, ZHANG D, LIU YJ, LUO CB, ZHOU YN, ZHANG LY. Overexpression of a NF-YB3 transcription factor from *Picea wilsonii* confers tolerance to salinity and drought stress in transformed *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, 94: 153-164.
- [34] BROOKBANK BP, PATEL J, GAZZARRINI S, NAMBARA E. Role of basal ABA in plant growth and development[J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(12): 1936.
- [35] NAKASHIMA K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. ABA signaling in stress-response and seed development[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(7): 959-970.
- [36] WANG ZK, MA R, ZHAO MS, WANG FF, ZHANG N, SI HJ. NO and ABA interaction regulates *Tuber* dormancy and sprouting in potato[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 311.
- [37] ISLAM MS, MOHTASIM M, ISLAM T, GHOSH A. Aldehyde dehydrogenase superfamily in sorghum: genome-wide identification, evolution, and transcript profiling during development stages and stress conditions[J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 316.

(本文责编 郝丽芳)