

基于转录组和代谢组的大花万代兰根部发育、防御过程初探

淡冬莹¹, 龙蔷宇^{2,3}, 李佳蔚^{1*}

1. 广西大学林学院/广西森林生态与保育重点实验室, 广西南宁 530004; 2. 南宁植物园, 广西南宁 530029; 3. 南宁青秀山风景名胜旅游开发有限责任公司, 广西南宁 530004

摘要: 大花万代兰 (*Vanda coerulea*), 为附生型植物, 根裸露在空气中生长, 具有重要的观赏价值, 也是兰花育种的重要亲本。从组学水平探究大花万代兰根的生长发育机制, 能为全面了解气生根独特适应机制提供理论基础。本研究以大花万代兰气生根 3 个不同发育水平的根部位为材料, 结合转录组和代谢组学, 揭示大花万代兰根部不同部位的生长发育情况及其防御适应机制。转录代谢联合分析结果显示, 2 份对比组的差异表达基因 (DEGs) 和差异积累代谢物 (DAMs) 显著富集在代谢途径、各种次生代谢物的生物合成途径和植物激素信号传导等途径。转录组结果显示, 根部分生区 (A) 与伸长区 (B) 有 11 995 个 DEGs, 上调 6274 个, 下调 5721 个。伸长区 (B) 与成熟区 (C) 共有 3673 个 DEGs, 上调 1691 个, 下调 1982 个。代谢组结果显示 2 份对比组 DAMs 共有 102 个, 上调 52 个, 下调 50 个。在根系的生长发育上, 生长素 (auxin)、赤霉素 (GAs)、脱落酸 (ABA) 等相关基因在植物根部发育过程中有显著变化。在防御适应机制上, 生物碱 (alkaloids)、类黄酮 (flavonoids)、木质素 (lignins) 等化合物合成相关基因在根的分生区和伸长区表达相对成熟区较多。说明气生根的发育受上述激素调控且积累较多种类的次生代谢物, 提高自身的防御能力。

关键词: 转录组; 代谢组; 大花万代兰; 生长发育; 植物防御机制

中图分类号: S682.31 文献标志码: A

Process of Root Development and Defense of *Vanda coerulea* Based on Metabolome and Transcriptome

DAN Dongying¹, LONG Qiangyu^{2,3}, LI Jiawei^{1*}

1. College of Forestry, Guangxi University / Guangxi Key Laboratory of Forest Ecology and Conservation, Nanning, Guangxi 530004, China; 2. Nanning Botanical Garden, Nanning, Guangxi 530029, China; 3. Nanning Qingxiushan Scenic and Historic Tourism Development Co., Ltd, Nanning, Guangxi 530004, China

Abstract: *Vanda coerulea*, an epiphytic plant with bare roots growing in air, has important value for orchid breeding and ornament. Exploring the development and defense mechanism of the aerial roots from the omics level can provide a theoretical basis for comprehensive understanding of the unique adaptation mechanism of aerial roots. In this study, we used three root sites with different developmental levels of *V. coerulea* aerial roots as materials, combined with transcriptomics and metabolomics, to reveal the development of different parts of *V. coerulea* roots and the defense mechanisms. Transcription-metabolism analysis showed that the differentially expressed genes (DEGs) and differentially accumulated metabolites (DAMs) were significantly enriched in the metabolic pathway, biosynthesis pathway of various secondary metabolites and pathway of plant hormone signaling in two comparison groups. Transcriptome analysis showed 11 995 DEGs between the meristematic (group A) and elongation (group B) zones of the root, with 6274 up-regulated and 5721 down-regulated. There were 3673 DEGs between the elongation (group B) and maturation zone (group C) of the root, with 1691 up-regulated and 1982 down-regulated. Metabolomic results revealed 102 DAMs between the two comparison groups, with 52 up-regulated and 50 down-regulated. In the development of roots, the relative

收稿日期 2024-09-14; 修回日期 2024-10-18

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31901092, No. 32260259); 广西自然科学基金项目 (No. 2021GXNSFBA075059)。

作者简介 淡冬莹 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 兰科植物生理生态适应机制。*通信作者 (Corresponding author): 李佳蔚 (LI Jiawei), E-mail: lijiawei1662020@163.com。

expression levels of growth regulators such as auxin, gibberellins (GAs) and abscisic acid (ABA) had significant changes in different developmental stages of plant roots. In terms of defense mechanism, the genes related to the synthesis of alkaloids, flavonoids, and lignins were more expressed in the meristem and elongation zone of roots than in the mature zone. The results indicate that aerial roots development under the regulation of the above-mentioned hormones and accumulate a variety of secondary metabolites to improve defensive capabilities.

Keywords: mranscriptome; metabolome; *Vanda coerulea*; development; plant defense mechanisms

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.02.004

兰科 (Orchidaceae) 是被子植物最大的科之一, 具有观赏价值和药用价值, 依其所属生态类型可分为地生兰、附生兰和腐生兰 3 类^[1]。万代兰属 (*Vanda*) 植物属于附生兰, 为单轴茎的热带兰, 无假鳞茎, 有明显茎干, 坚固而直立, 叶片革质, 绿色。叶表面有较厚的角质层, 具较强的抗旱性。其花形硕壮、花姿奔放、花色艳丽, 花期较长, 是世界知名的商品化兰花, 也是世界重要的观赏兰花^[2]。大花万代兰 (*Vanda coerulea*) 的花型较大, 花色为浅紫或深蓝色, 花期可持续约一个月, 是万代兰属内杂交育种的重要亲本种质资源^[3]。万代兰属植物茎上具多数粗壮的气生根, 其肥厚的圆柱状气生根与空气直接接触。前人针对万代兰属植物气生根的成熟区的结构及光合生理已有一定研究, 但对于其不同发育阶段的转录和代谢调控仍缺少研究。

根是植物固定和吸收水分、营养以支持植物生长和新陈代谢的主要器官, 探究根的功能性状, 是理解植物生理响应和适应机制的重要一环^[4-5]。附生植物与地生植物最显著的差异在于根的生长环境缺少土壤的支持, 为适应附生环境水分与养分的限制, 尤其水分限制, 附生兰科植物的根演化出一系列结构和生理特征来减少水分散失、提高水分快速吸收及增加水分存储。如多数附生型兰科植物的根最外层由根被结构覆盖^[6], 根被细胞成熟过程经历了与导管细胞类似的细胞程序化死亡过程, 最终仅由细胞壁加厚的死细胞组成^[7]。根被吸水达饱和非常迅速, 且干燥时可减少根内水分蒸散, 具有促进水分吸收及减少水分散失的功能^[8-9]。生活在水分供应受限强烈地区的兰科植物的根, 具有更厚的根被^[10-12]。根的导管大小是影响水分运输的重要指标, 附生型兰属 (*Cymbidium*) 植物的根较地生型植物, 具有较大导管直径, 说明附生兰科植物可通过提高水分吸收效率来适应水分供应受限的生境^[11], 部分附生兰科植物根肉质化, 皮层细胞层数增多贮藏光合

产物及水分, 具有缓冲水分限制的功能^[13-15]。对附生植物气生根发育过程中转录和代谢组学层次的研究, 能为完整理解气生根的适应机制, 以及附生植物的引种驯化和栽培育种提供理论支持。

生长素 (auxin) 作为植物生长发育重要的植物激素, 可通过在根尖下表面细胞中积累抑制根尖向重力生长。赤霉素 (GAs) 可以促进主根的伸长, 但会对侧根、不定根的发育产生负面影响。脱落酸 (ABA) 以浓度依赖和吲哚乙酸互作等方式调控植物根系生长^[16]。上述植物激素不仅在根系发育上发挥作用, 还与部分代谢物共同参与植物根系的防御机制。植物防御机制的建立主要依赖于植物次生代谢物, 这些代谢物产物非常丰富且其功能多样化。据报道, 生物碱 (alkaloids) 可以对捕食性昆虫产生毒性来保护植物^[17], 类黄酮 (flavonoids) 中的花青素可以保护植物免受干旱、温度的胁迫^[18]。木质素 (lignins) 可减少病原体侵入和有害物质对植物的损害^[19]。此外, 植物激素也能与类黄酮等代谢物共同参与到植物抗逆胁迫当中, 彼此制约或促进来维持植物的生命过程。

结合前人对于根生长调控的广泛研究基础, 本研究针对大花万代兰气生根的分生区、伸长区和成熟区, 进行高通量 Illumina 测序, 探究大花万代兰根不同生长发育阶段的基因调控和代谢物积累变化差异, 研究结果能为了了解气生根不同阶段生长发育情况及其在植物防御过程中的作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究选取大花万代兰根尖为研究对象, 采自广西农业科学研究院资源圃温室大棚。大棚夏季平均温度 22~30 ℃, 冬季平均温度 8~10 ℃; 平均湿度 60%~70%。随机选取 3~6 株根尖发育良好有气生根的健康植株, 取气生根时, 在不损伤茎

的前提下，距离茎部 1 mm 左右用枝剪剪下。剪下的根样品分为分生区（A）、伸长区（B）和成熟区（C），并立刻用液氮保存。

1.2 方法

1.2.1 转录组测序与分析 将大花万代兰根尖 9 个样本进行 RNA 提取与检测转录组测序。委托武汉迈维生物科技有限公司完成转录组测序。简要流程如下：使用琼脂糖凝胶电泳、NanoPhotometer 分光光度计、Qubit 2.0 荧光计、Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA，合格后方可进行建库。建库起始 RNA 为 total RNA，总量≥1 μg，建库试剂盒为 Illumina 的 NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit。使用 qRT-PCR 对文库有效浓度进行准确定量（文库有效浓度高于 2 nmol/L），库检合格后，把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后进行 Illumina 测序。

使用 fastp 对原始数据进行过滤，后续所有分析均基于 clean reads。使用 RSEM 软件计算转录本的表达量，使用 Benjamini & Hochberg 方法校正 P 值。校正后的 P 值以及|log₂ (Fold Change)|作为显著差异表达的阈值。基于超几何检验进行富集分析，KEGG 富集分析以 pathway 为单位进行超几何分布检验，GO 富集分析则基于 GO term 进行。

1.2.2 代谢组测定与分析 委托武汉迈维生物科技有限公司完成代谢组测定。简要流程如下：将冻干的材料用研磨机（MM 400, Retsch）研磨成粉末溶于甲醇萃取液中，离心 10 min，去除未溶解残渣。样品提取液使用 SCAA-104 滤膜（0.22 μm, ANPE）和 CNWBOND Carbon-GCB SPE 滤盒（ANPEL）进行过滤。使用液相色谱-电喷雾电离-串联质谱（LC-ESI-MS:LC, Shim-pack UFLC Shimadzu CBM30A system; ESI, MS, Applied

Biosystems 6500 QTRAP）系统进行检测。色谱分离采用 ACQUITY UPLC HSS T3 C18（1.8 mm, 2.1 mm×100 mm; Waters）。

线性离子阱（LIT）和三重四极杆（QQQ）扫描在 API 6500 QTRAP LC/MS/MS 系统上进行，并由 Analyst 1.6 软件（AB Sciex）控制。通过参数值（m/z 数据，保留时间和碎片）进行代谢物的鉴定，鉴定结果与数据库 MetaWare（<http://www.metware.cn/>）进行比较和注释。差异积累代谢物（DAMs）的筛选标准：选取 Fold Change≥2 和 Fold Change≤0.5 且 VIP≥1 的代谢物。

1.2.3 转录组学和代谢组学联合分析 结合转录组学和代谢组学，把结果相同组的差异表达基因（DEGs）及 DAMs 同时映射到 KEGG 条形图上，条形图展示了富集到某一途径的 DAMs 和 DEGs 的数目。通过网络图来表示 DAMs 与 DEGs 之间的相关关系，图中不同组学的物质用不同的形状标出。为进一步研究植物根部不同部位生长发育及其防御机制，在差异表达阈值设定为 $P_{adj} \leq 0.05$ ， $|\text{Log}_2(\text{Fold Change})| \geq 1$ 的基础上筛选出植物次生代谢、植物激素等相关 DEGs。

1.3 数据处理

使用 Excel、Origin 软件分析数据。

2 结果与分析

2.1 转录组结果与分析

将大花万代兰根部进行转录组测序分析，共获得 419 235 416 条 raw reads，数据过滤生成平均 4473.8 万个 clean reads，平均每个样品得到 6.71 Gb clean_bases，Q₂₀ 碱基百分比为 97.08%~97.51%，Q₃₀ 碱基百分比为 92.11%~93.00%，数据整体测序错误率为 0.03%，低于 1.00%（表 1）。

表 1 RNAseq 质量
Tab. 1 Quality of RNASeq

样品名 Sample	原始 reads Raw reads	过滤后 reads Clean reads	高质量 reads 碱基总数 Clean base/Gb	整体测序错误率 Error rate/%	Q ₂₀ /%	Q ₃₀ /%	GC 含量 GC content/%
A ₁	44 494 874	42 863 948	6.43	0.03	97.16	92.29	46.27
A ₂	47 855 630	46 308 188	6.95	0.03	97.44	92.74	46.46
A ₃	48 179 716	46 765 914	7.01	0.03	97.30	92.60	46.42
B ₁	48 572 592	46 891 030	7.03	0.03	97.37	92.58	46.49
B ₂	43 319 590	41 178 884	6.18	0.03	97.08	92.11	46.18
B ₃	46 426 988	44 441 728	6.67	0.03	97.26	92.55	46.46
C ₁	46 147 900	44 043 222	6.61	0.03	97.51	92.93	47.00
C ₂	46 618 804	44 706 160	6.71	0.03	97.27	92.54	46.96
C ₃	47 619 322	45 446 000	6.82	0.03	97.47	93.00	47.08

根据 RNAseq 结果, 筛选 DEGs。A vs B 共有 11 995 个差异表达基因, 上调 6274 个, 下调 5721 个。B vs C 共有 3673 个差异表达基因, 上调 1691 个, 下调 1982 个 (图 1)。

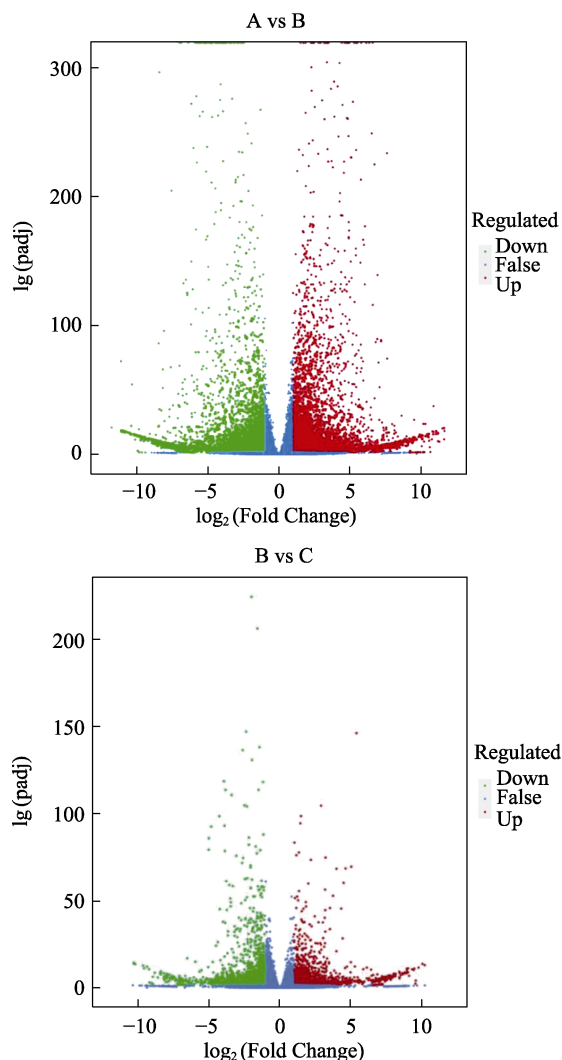


图 1 DEGs 火山图

Fig. 1 Volcano map of differential expressed genes

2.2 KEGG 富集分析

对 unigenes 进行注释后, 根据其参与的 KEGG 途径进行分类。结果显示, 共有 48 513 条参与包括细胞过程、环境信号处理、遗传信息处理、代谢和生物系统的 KEGG 途径, 并且在 A vs B 和 B vs C 分别富集了 142 条和 136 条 KEGG 途径, 选取富集分析结果中 q -value 最低的 50 条 KEGG 途径, 绘制富集条目柱形图 (图 2A)。在 A vs B 中 DEGs 最多的前 5 条 KEGG 途径为代谢途径、次生代谢物的生物合成途径、植物激素信号转导途径、植物-病原体相互作用途径、淀粉和蔗糖代谢途径。

在 B vs C 中 DEGs 最多的前 5 条 KEGG 途径为代谢途径、次生代谢物的生物合成途径、植物-病原体相互作用途径、植物激素信号转导途径和苯丙烷类生物合成途径。2 个比较组途径的差异为淀粉和蔗糖代谢途径、苯丙烷类生物合成途径。

选取富集最显著的 20 条途径绘制 KEGG 富集散点图 (图 2B)。在 A vs B 中 DEGs 显著富集 Top 5 的途径为植物激素信号转导途径、各种植物次生代谢的生物合成途径、类黄酮生物合成途径、角质 (木栓素、蜡) 生物合成途径和苯丙烷类生物合成途径。

而在 B vs C 富集 Top 20 条途径中, DEGs 显著富集 Top5 的途径为植物-病原体相互作用途径、苯丙烷类生物合成途径、次生代谢物的生物合成途径、各种植物次生代谢的生物合成以及角质 (木栓素、蜡) 生物合成途径。2 个比较组最显著富集途径的差异为植物激素信号转导途径、类黄酮生物合成途径以及次生代谢物的生物合成途径。

2.3 GO 富集分析

对大花万代兰根部转录组的 unigenes 进行 GO 注释, 结果显示 54 044 (34.84%) 条 unigenes 被注释到 GO 数据库, 并被划分到 GO 的三大类中。富集结果显示, 2 组 unigenes 都以生物过程大类中的细胞过程、代谢过程等为主; 在细胞组分大类中, 富集于细胞解剖实体和含蛋白质的复合物; 在分子功能大类中, 以结合、催化活性为主 (图 3A)。

按生物过程、分子功能和细胞组分功能群对根部不同区域产生的 DEGs 进行 GO 功能富集分析。结果表明, 在 A vs B 中, 上调基因主要富集于生物过程的细胞过程、代谢过程和刺激响应过程; 细胞组分的细胞解剖实体以及分子功能大类中的结合、催化活性。下调基因主要富集于生物过程的细胞过程、代谢过程和生物调控过程; 细胞组分的细胞解剖实体以及分子功能大类中的结合、催化活性。在 B vs C 中, 上调和下调基因都主要富集于生物过程的细胞过程、代谢过程和刺激响应过程; 细胞组分的细胞解剖实体以及分子功能大类中的结合、催化活性 (图 3B)。

2.4 代谢组检测与分析

基于 UPLC-MS/MS 检测平台和自建数据库共检测到 2 个比较组显著 DAMs 共有 102 个, 上调 52 个, 下调 50 个。其中氨基酸及其衍生物、核苷酸及其衍生物、有机酸、甘油酯、鞘脂、溶

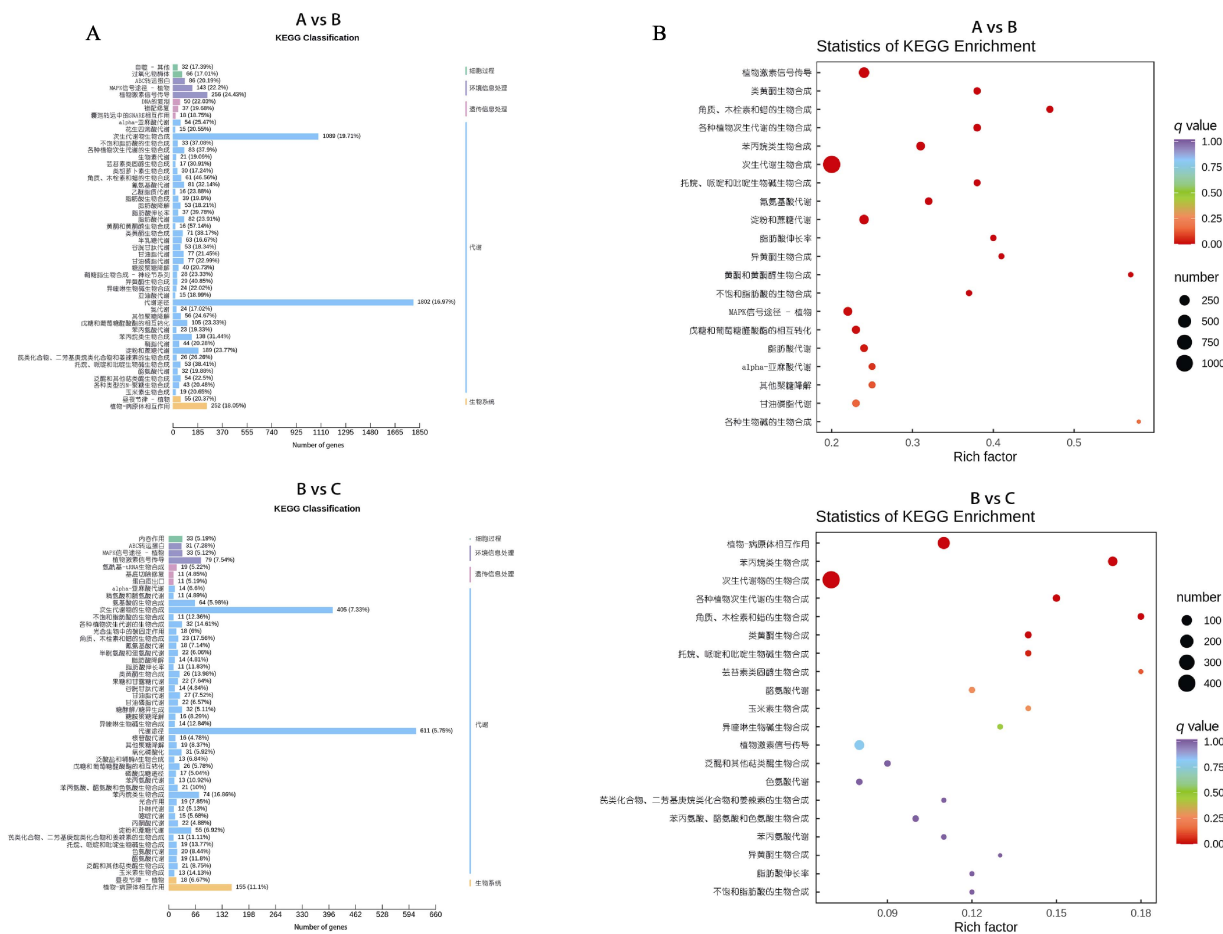


图 2 DEGs 的 KEGG 富集通路
Fig. 2 KEGG enrichment pathway of DEGs

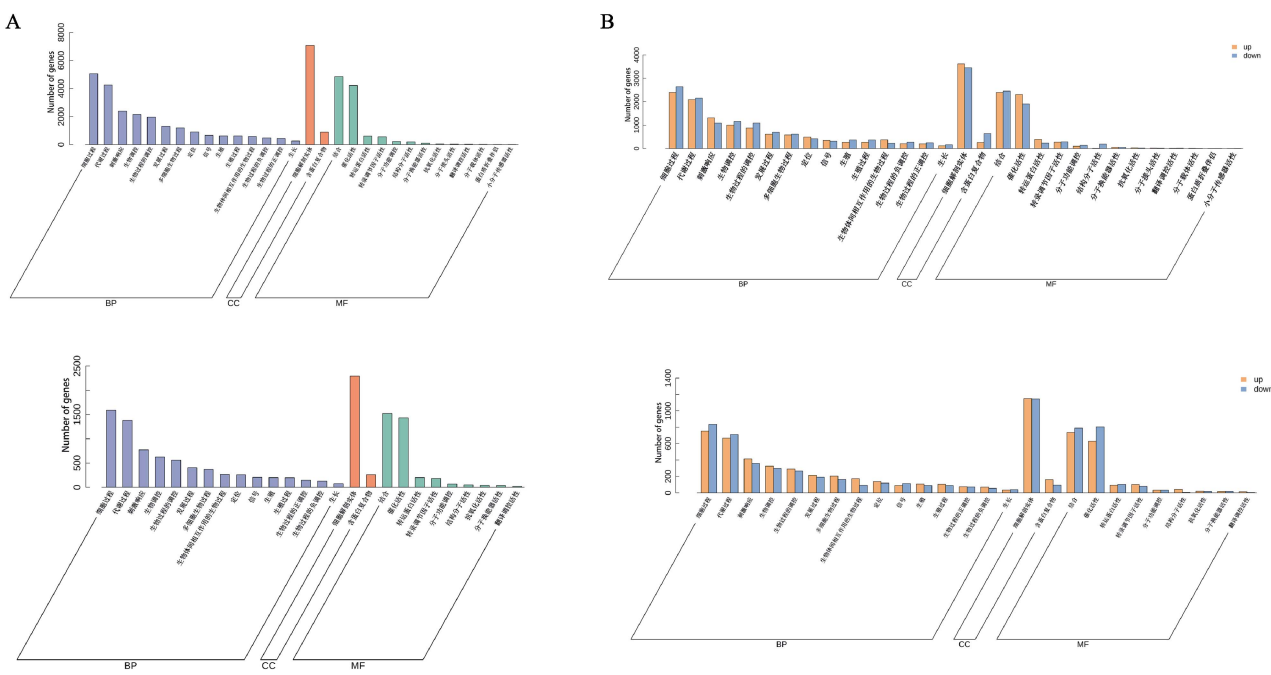


图 3 DEGs 的 GO 富集分析
Fig. 3 GO enrichment analysis of DEGs

血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、游离脂肪酸、糖类和维生素在 A vs B 分别上调 6、4、0、1、0、1、2、10、0、1 个，下调 5、4、5、6、2、2、1、4、6、1 个。在 B vs C 分别上调 3、1、0、5、0、6、4、4、3、1 个，下调 6、1、3、0、1、0、0、1、2、0 个。DAMs 涉及到氨基酸及其衍生物、核苷酸及其衍生物、有机酸、甘油酯、鞘脂、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、游离脂肪酸、糖类和维生素十类。

2.5 差异积累代谢物（DAMs）筛选与分析

从上述十类代谢产物中,关注到磷脂酰丝氨酸（18:2）（Lmqn008024）、溶血磷脂酰乙醇胺 20:2（Lmhp010757）、溶血磷脂酰乙醇胺 20:2（2n 异构）（Lmhp010514）、羟基蓖麻油酸（Lmbn007891）、

9,10,11-三羟基-12-十八碳烯酸（Hmqn003054）在 A vs B 和 B vs C 中均上调表达。氧化谷胱甘肽（mws413）、茄三糖（Lmmn000214）、二氢鞘氨醇-1-磷酸（MWS0952）在 A vs B 和 B vs C 中均下调表达。

尿苷-5'-二磷酸-D-木糖（Zmfn000481）、茉莉酰-L-异亮氨酸（pme2074）、D-松醇（mws2104）、半乳糖醇（pme2237）、D-甘露醇（mws1155）、异抗坏血酸（MWSmce690）、溶血磷脂酰胆碱 19:0（pmb2228）、溶血磷脂酰乙醇胺 18:1（2n 异构）*（pmb0856）在 A vs B 中下调表达，B vs C 中上调表达。9-过氧-10E，12Z-十八碳二烯酸（pmb2787）在 A vs B 上调表达，B vs C 中下调表达（表 2）。

表 2 部分代谢物筛选结果
Tab. 2 Partial metabolite screening results

基因 ID Gene ID	物质 Compounds	变量重要性投影 VIP	显著性 P 值 P-value	差异倍数 Fold_Change	差异倍数对数 Log ₂ (Fold Change)	类型 Type
Zmfn000481	尿苷-5'-二磷酸-D-木糖	1.24E+00/1.37E+00	9.46E-03/2.47E-03	1.19E-05/4.60E+04	-1.64E+01/1.55E+01	Down/Up
pme2074	茉莉酰-L-异亮氨酸	1.24E+00/1.37E+00	4.43E-03/4.07E-04	2.57E-03/7.38E+02	-8.61E+00/9.53E+00	Down/Up
mws2104	D-松醇	1.20E+00/1.36E+00	3.55E-03/1.80E-05	4.13E-01/4.70E+00	-1.28E+00/2.23E+00	Down/Up
pme2237	半乳糖醇	1.24E+00/1.37E+00	2.57E-02/3.33E-02	7.64E-05/2.21E+04	-1.37E+01/1.44E+01	Down/Up
mws1155	D-甘露醇	1.24E+00/1.37E+00	2.57E-02/3.33E-02	7.64E-05/2.21E+04	-1.37E+01/1.44E+01	Down/Up
MWSmce690	异抗坏血酸	1.24E+00/1.37E+00	7.77E-02/1.68E-02	7.05E-05/2.47E+04	-1.38E+01/1.46E+01	Down/Up
pmb2228	溶血磷脂酰胆碱 19:0	1.23E+00/1.33E+00	1.44E-04/2.29E-02	4.95E-01/2.40E+00	-1.01E+00/1.26E+00	Down/Up
pmb0856	溶血磷脂酰乙醇胺 18:1(2n 异构)*	1.02E+00/1.34E+00	1.25E-01/3.37E-03	4.14E-01/2.51E+00	-1.27E+00/1.33E+00	Down/Up
pmb2787	9-过氧-10E,12Z-十八碳二烯酸	1.24E+00/1.37E+00	7.10E-02/7.10E-02	4.95E+04/2.02E-05	1.56E+01/-1.56E+01	Up/Down
mws4134	氧化谷胱甘肽	1.24E+00/1.36E+00	3.65E-04/1.26E-02	1.75E-01/2.63E-01	-2.51E+00/-1.93E+00	Down/Down
Lmmn000214	茄三糖	1.21E+00/1.34E+00	1.68E-02/6.22E-04	4.45E-01/4.99E-01	-1.17E+00/-1.00E+00	Down/Down
MWS0952	二氢鞘氨醇-1-磷酸	1.23E+00/1.33E+00	3.32E-03/2.62E-02	1.53E-01/4.58E-01	-2.71E+00/-1.13E+00	Down/Down
Lmhp010757	溶血磷脂酰乙醇胺 20:2	1.23E+00/1.36E+00	4.87E-04/2.42E-03	5.82E+00/2.31E+00	2.54E+00/1.21E+00	Up/Up
Lmhp010514	溶血磷脂酰乙醇胺 20:2(2n 异构)	1.22E+00/1.29E+00	8.37E-03/1.88E-02	5.30E+00/2.14E+00	2.40E+00/1.10E+00	Up/Up
Lmbn007891	羟基蓖麻油酸	1.24E+00/1.37E+00	3.90E-05/1.04E-03	2.02E+01/3.13E+00	4.34E+00/1.65E+00	Up/Up
Hmqn003054	9,10,11-三羟基-12-十八碳烯酸	1.24E+00/1.37E+00	4.56E-07/2.77E-03	4.51E+00/2.33E+00	2.17E+00/1.22E+00	Up/Up
Lmqn008024	磷脂酰丝氨酸(18:2)	1.23E+00/1.35E+00	4.21E-04/5.15E-03	3.19E+00/2.26E+00	1.67E+00/1.18E+00	Up/Up

注：“/” 前为 A vs B 组，后为 B vs C 组。
Note: Before “/” represents group A vs B, after “/” represents group B vs C.

2.6 转录组和代谢组联合分析

利用两组学共同富集到的 KEGG pathway 绘制条形图，对于共有 KEGG pathway 数目超过 25 的，以转录组为准，只展示 P-value 排名前 25 的途径。结果表明 2 个比较组的 DEGs 和 DAMs 显著富集在代谢途径、次生代谢物的生物合成途

径和植物激素信号传导途径（图 4A）。筛选与上述代谢物相关的皮尔逊系数大于 0.80 且 P-value 小于 0.05 的 DEGs 绘制相关性网络图（图 4B）。

综上所述，结合 KEGG、GO 富集分析结果得出，根系发育是一个十分复杂的过程，涉及到植物激素信号转导途径、次生代谢物的生物合成途

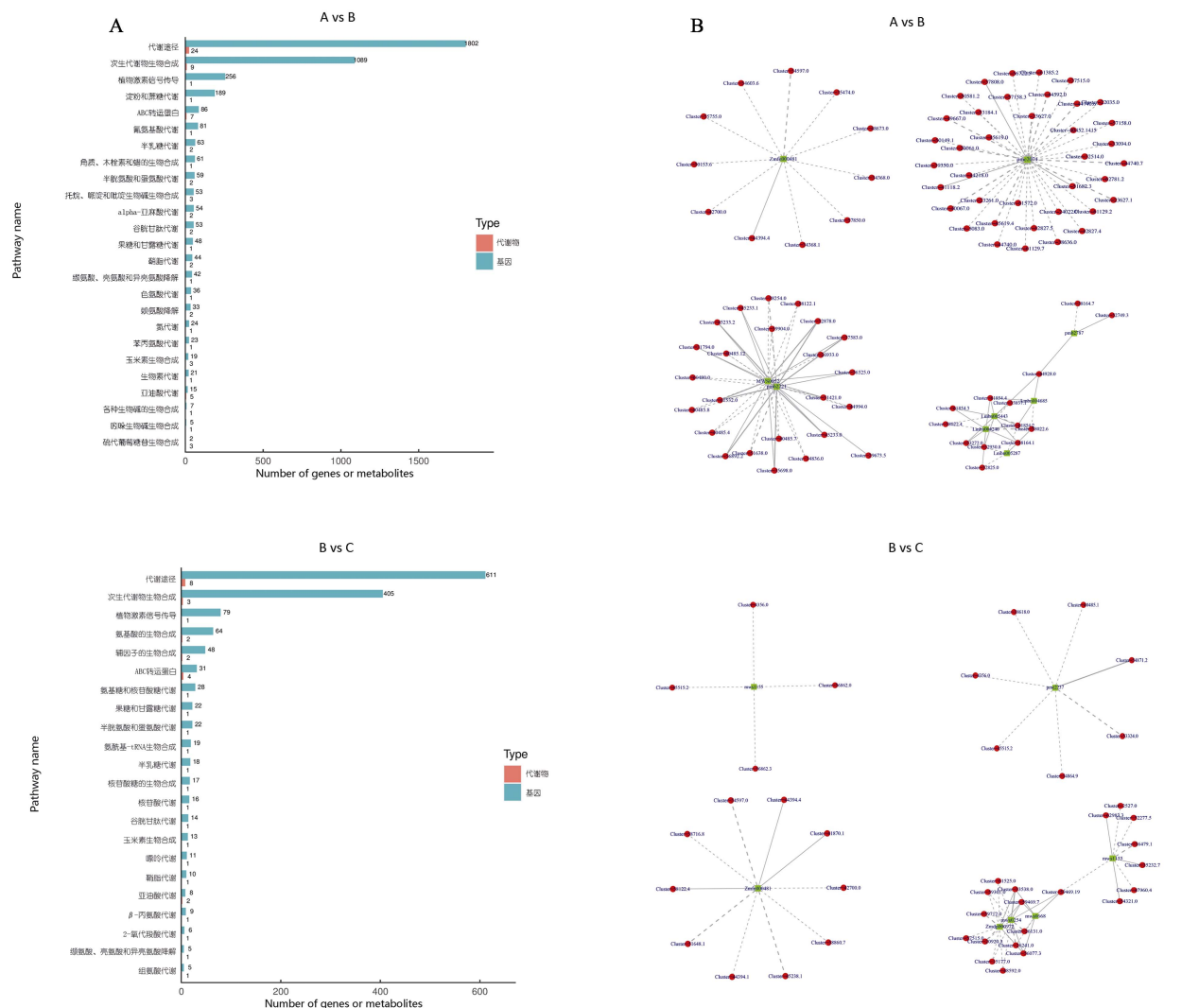


图 4 两组学 KEGG 富集条目图、代谢物相关基因网络图

Fig. 4 KEGG-enrichment entries and metabolite-related gene network diagrams of two omics

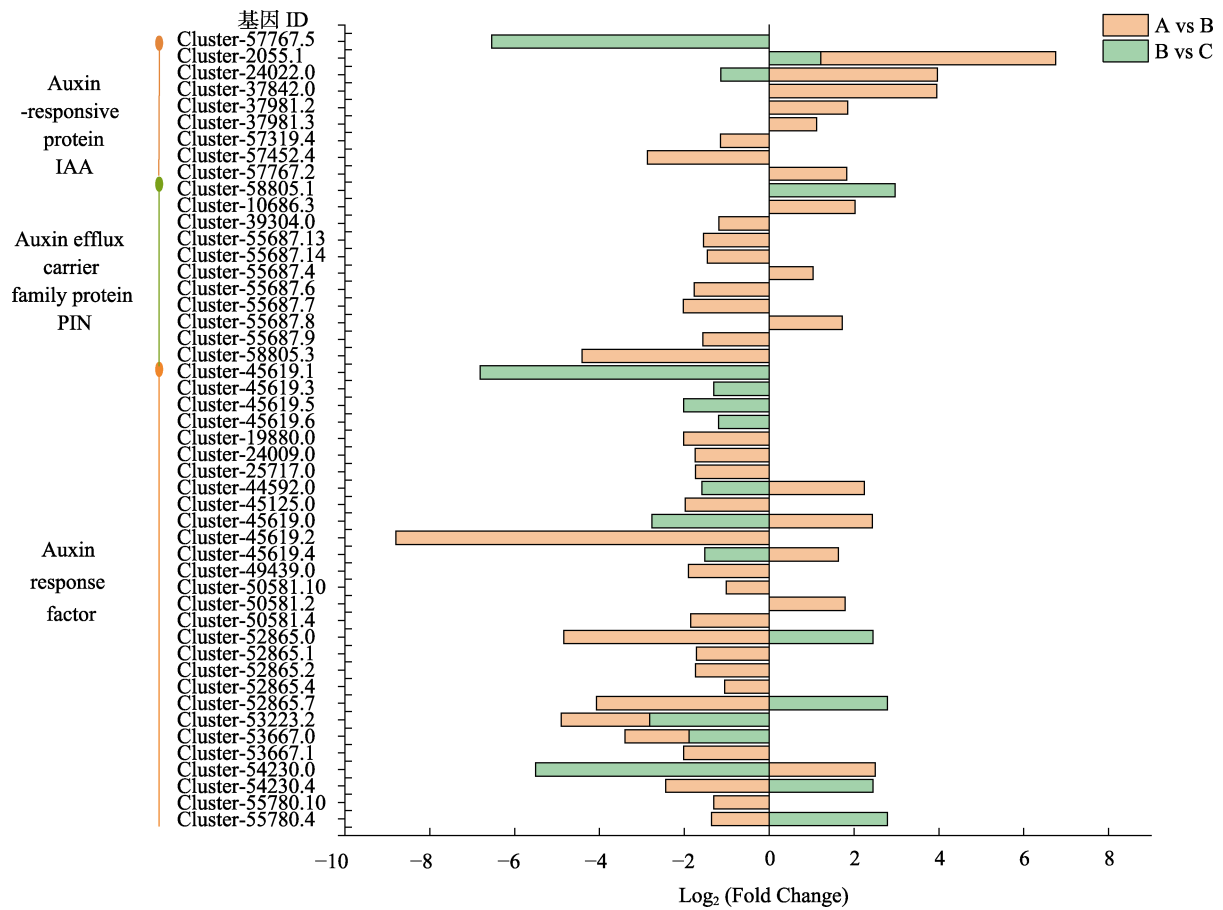
径、类黄酮生物合成途径、苯丙烷类生物合成途径、代谢途径、角质（木栓素、蜡）生物合成途径、植物-病原体相互作用、细胞过程、代谢过程、细胞解剖实体和含蛋白质的复合物等过程。

2.7 植物激素相关基因分析

从 A vs B、B vs C 两个比较组中筛选到与生长素（auxin）有关的 DEGs 分别有 264、83 个，上调基因分别有 127、35 个，下调基因分别为 137、48 个。生长素响应因子（auxin response factor, ARF）在 A vs B、B vs C 中总体均下调表达，生长素外排 PIN 家族蛋白（auxin efflux carrier family protein, PIN）在 A vs B 中总体呈现下调表达，而在 B vs C 中上调表达，生长素响应 IAA 蛋白（auxin-responsive protein, IAA）在 A vs B 中总体呈现上调表达，而在 B vs C 中呈现下调表达（图 5）。

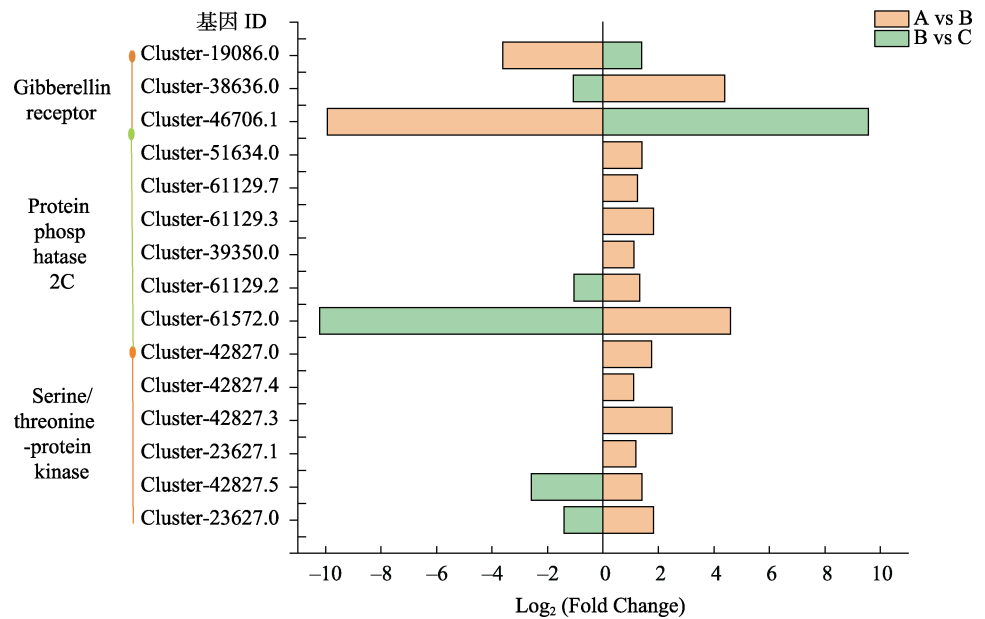
从 A vs B、B vs C 两个比较组中筛选到与赤霉素（GAs）有关的 DEGs 分别有 72、18 个。上调基因分别有 37、11 个，下调基因分别有 35、7 个。其中，有赤霉素受体 GID1（gibberellin receptor, GID1）家族基因 GID1B-like（A）在 A vs B 中上调表达，而在 B vs C 中下调表达，GID1C（A）、GID1C-like isoform X1（A）基因在 A vs B 中下调表达，B vs C 中上调表达（图 6）。

从 A vs B、B vs C 两个比较组中筛选到与脱落酸（ABA）相关 DEGs 分别有 289、99 个。上调基因分别有 172、54 个，下调基因分别为 117、45 个。其中，丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 SRK2（serine/threonine-protein kinase, SRK2）、蛋白磷酸酶 2C（protein phosphatase 2C, PP2C）相关基因在 A vs B 中总体呈现上调表达，而在 B vs C 中呈现下调表达（图 6）。



正值代表代表该基因上调，负值代表下调。
The positive value represents the up-regulation of the gene, and the negative value represents the down-regulation.

图 5 Auxin 相关 DEGs 分析
Fig. 5 Auxin-related DEGs analysis



正值代表代表该基因上调，负值代表下调。
The positive value represents the up-regulation of the gene, and the negative value represents the down-regulation.

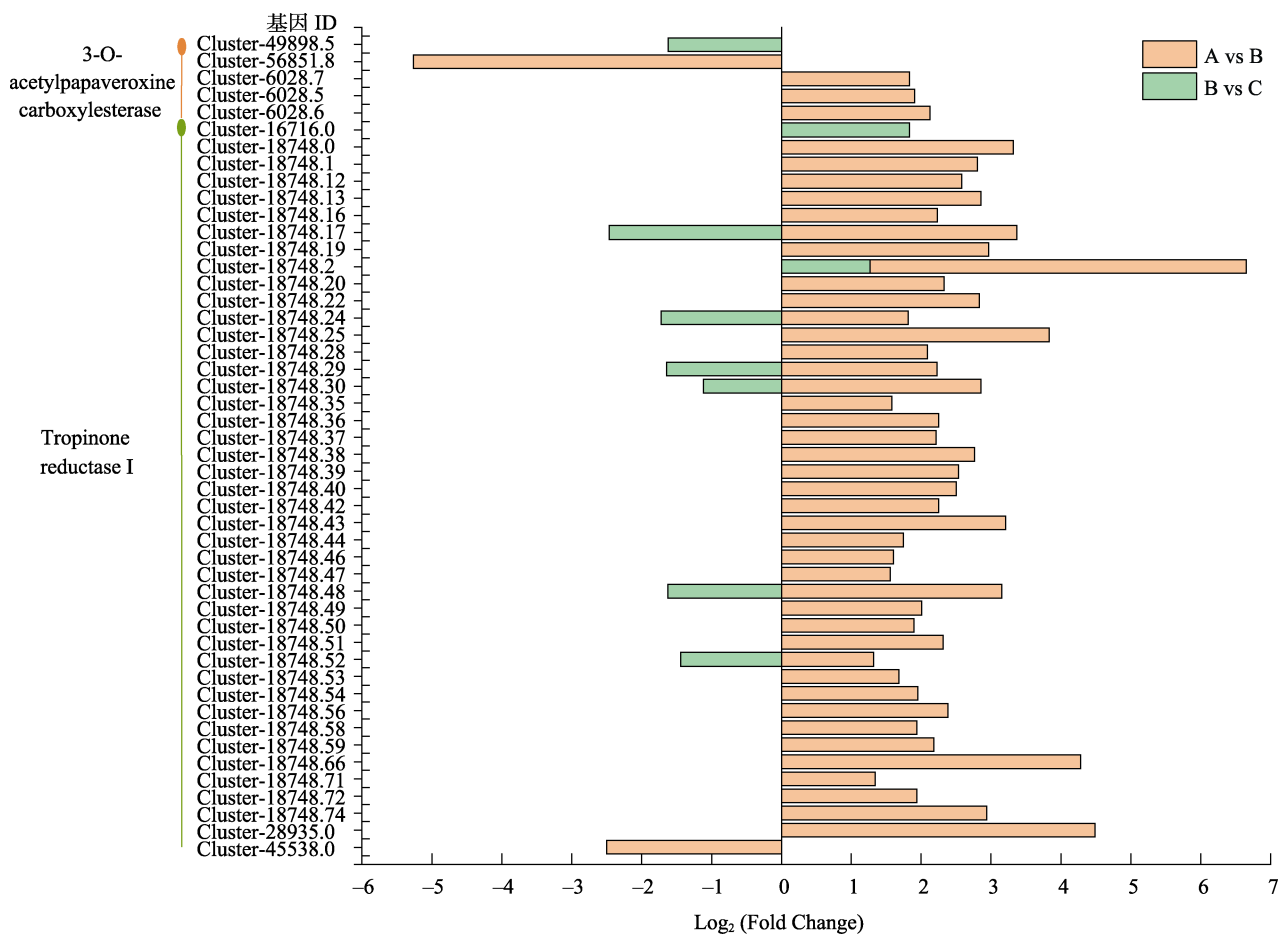
图 6 GAs、ABA 相关 DEGs 分析
Fig. 6 GAs, ABA-related DEGs analysis

综上所述,植物根部不同区域的生长发育有显著差异,上述基因的上调、下调表达在调控根部发育过程中发挥着重要作用。

2.8 植物次生代谢物相关基因分析

从 A vs B、B vs C 两个比较组中筛选到与生物碱 (alkaloids) 有关的 DEGs 分别有 95、34 个,

上调基因分别有 66、14 个,下调基因分别有 29、20 个。其中,托品酮还原酶 (tropinone reductase I, TR-I)、3-O-乙酰丙烷氧烷羧酸酯酶 (3-O-acetylpapaveroxine carboxylesterase, CXE1) 相关基因在 A vs B 总体呈现上调表达,而在 B vs C 呈现下调表达 (图 7)。

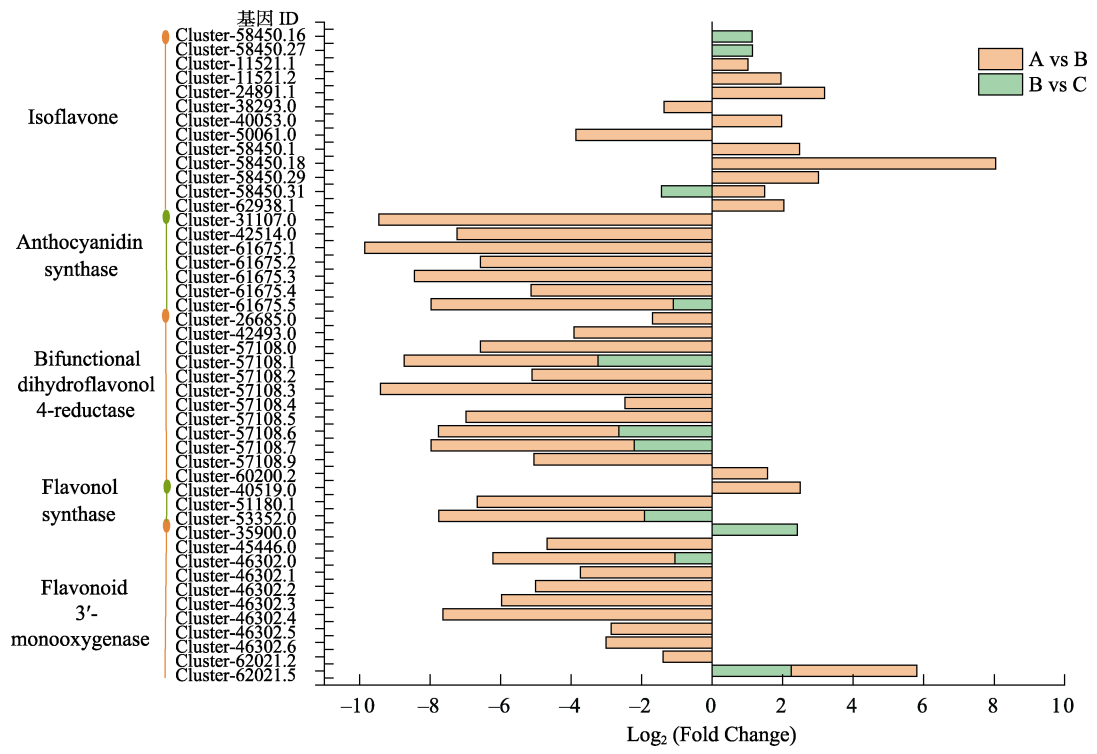


正值代表该基因上调, 负值代表下调。
The positive value represents the up-regulation of the gene, and the negative value represents the down-regulation.

图 7 Alkaloids 相关 DEGs 分析
Fig. 7 Alkaloids-related DEGs analysis

从 A vs B、B vs C 两个比较组中筛选到与类黄酮 (flavonoids) 有关的 DEGs 分别有 151、58 个, 上调基因分别有 71、23 个, 下调基因分别为 80、35 个。其中, 类黄酮 3'-单加氧酶 (flavonoid 3'-monooxygenase) 家族基因在 A vs B 中总体下调表达, 而在 B vs C 中上调表达, 黄酮醇合酶 (flavonol synthase, FLS)、双功能二氢黄酮醇 4-还原酶 (bifunctional dihydroflavonol 4-reductase, DFR)、花青素合酶 (anthocyanidin synthase, ANS) 基因总体在 2 组中均下调表达, 异黄酮

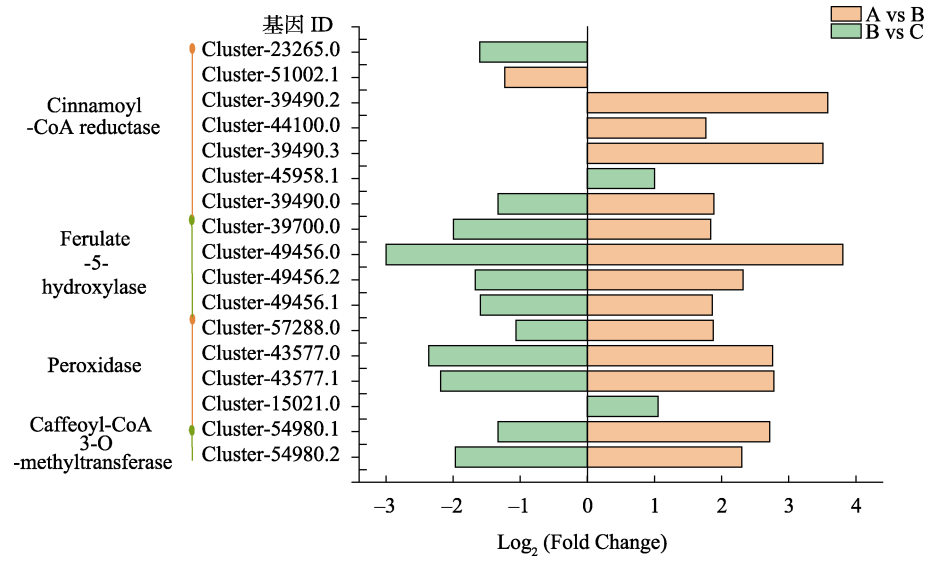
(isoflavone) 基因总体 2 组中均上调表达 (图 8)。
筛选与木质素 (Lignins) 有关的 DEGs。A vs B、B vs C 中分别有 75、57 个, 上调基因分别有 64、22 个, 下调基因分别有 11、35 个。关注到咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶 (Caffeoyl-CoA-3-O-methyltransferase, CCoAOMT)、过氧化物酶 (Peroxidase, PRX)、阿魏酸-5-羟化酶 (Ferulate-5-hydroxylase, F5H)、肉桂酰辅酶 A 还原酶 (Cinnamoyl-CoA reductase, CCR) 相关基因在 A vs B 中总体呈现上调表达, 而在 B vs C 中呈现下调表达 (图 9)。



正值代表代表该基因上调，负值代表下调。
The positive value represents the up-regulation of the gene, and the negative value represents the down-regulation.

图 8 Flavonoids 相关 DEGs 分析

Fig. 8 Flavonoids-related DEGs analysis



正值代表代表该基因上调，负值代表下调。
The positive value represents the up-regulation of the gene, and the negative value represents the down-regulation.

图 9 Lignin 相关 DEGs 分析

Fig. 9 Lignin-related DEGs analysis

3 讨论

3.1 与植物生长发育相关的显著富集途径及其代谢物

植物激素在植物的生长发育比如胚胎形成、种子萌发、形态建成、果实成熟以及器官衰老等，以

及在抵抗环境胁迫，比如干旱、盐碱、高温、寒冷和洪水等非生物胁迫中发挥重要的调控作用^[20]，它主要由植物激素信号传导途径产生。植物典型 5 类激素主要包括生长素(auxin)、赤霉素(GAs)、细胞分裂素(cytokinin)、脱落酸(ABA)和乙烯

(ethylene)。植物在长期的进化当中为了抵抗环境胁迫已经进化出复杂的机制来感知和响应外部压力^[21]。本研究富集结果表明在大花万代兰根部分生区和伸长区产生了大量的植物激素来刺激根的生长发育以及抵抗环境胁迫。

Auxin 作为植物生长发育重要的植物激素,参与了根的生长过程。生长素响应因子 (ARF) 可以与 IAA 蛋白相互作用来调控 auxin 反应基因的表达,而生长素外排载体 (PIN) 家族的成员也被证明处于 Aux/IAA 和 ARF 的控制之下。IAA、ARF、PIN 蛋白相互作用有助于维持 Auxin 稳态^[22]。本研究中, Auxin 相关基因的大量表达表明,其在大花万代兰气生根的发育发挥着重要作用,而 ARF 在 A vs B、B vs C 中均下调表达。PIN 蛋白在 A vs B 中下调表达,而在 B vs C 中上调表达。IAA 蛋白在 A vs B 中上调表达,而在 B vs C 中下调表达。说明 auxin 在气生根中的反应极其复杂,这与前人在植物根部研究中的现象一致,可能与 IAA、ARF、PIN 蛋白的相互作用有关,三者的相互调控共同维持 auxin 稳态,促进气生根的生长发育。

GAs 是四环二萜类化合物^[23],在植物生长发育中有着重要的作用,它能够影响根系发育,促进植株根茎的伸长,且较高水平的 GA 限制植株根系生长。研究表明,GA 可以促进主根的伸长,但会对侧根、不定根的发育产生负面影响^[24]。赤霉素受体 (GID1) 是植物 GA 中重要的受体之一,被鉴定为可溶性 GA 受体^[25],并且 GID1 家族有 3 个受体基因 GID1a、GID1b 和 GID1c,其中 GID1b 被证明在根系中的表达非常强烈^[26]。GA-GID1 复合物可以引起生长抑制因子 DELLA 蛋白的快速分解来促进植物生长,DELLA 是核转录调节因子,可抑制 GA 信号转导,通过在内胚层中表达稳定的 DELLA 突变蛋白从而抑制根伸长^[27-28]。本研究 GID1B-like (A) 基因在根部的强烈表达与前人结果一致,其在 A vs B 中上调表达,B vs C 中下调表达,这一结果证明了该基因在根系伸长区部分含量较高,并且 GID1B-like (A) 很可能在根部作为主要的 GA 结合受体参与到 GA-GID1 的过程中引起 DELLA 蛋白的快速分解来促进植物生长。

ABA 是一种主要的非生物应激反应激素,可以与 auxin、GA 等共同调节植物根系的发育并且在维持根分生组织活性和细胞伸长方面起着重要

作用。研究表明 ABA 通过激活 auxin 生物合成基因的表达来促进 auxin 在根系中的积累,ABA 处理减小了根分生组织大小、分生组织区细胞数和成熟区细胞长度,从而限制了根系伸长^[29]。ABA 对根毛伸长的影响很大程度上取决于主要的 PYR/PP2C/SnRK2 信号途径,拟南芥 PID 编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (SNF1 相关蛋白激酶 2, SnRK2 蛋白),该激酶通过控制 PIN 的亚细胞定位来调节生长素的再分布,特别是在根尖部分,在 ABA 处理后,几乎所有这些 auxin 生物合成基因在根尖上调^[30]。蛋白磷酸酶 PP2C 作为 ABA 受体被诱导,PP2C 能够通过接触使 ABA 信号的正调节因子 SnRK2 发生去磷酸化作用而失活^[31]。本研究丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (SRK2)、蛋白磷酸酶 (PP2C) 相关基因在 A vs B 中上调,而在 B vs C 中下调,进一步验证了 SRK2 和 PP2C 的互作反应主要发生于植物伸长区部分,可能是通过 SRK2 促进 auxin 在该区域的积累,而 PP2C 使得 SRK2 失活这一相互作用来控制根部伸长区的伸长。

3.2 与植物防御机制相关的显著富集途径及其代谢物

植物次生代谢途径主要产生植物次生代谢物,在植物响应环境变化过程中起到非常重要的作用。植物的次生代谢产物非常丰富,研究发现次生代谢物的功能是多样化的,它们可以促进植物生长发育、建立植物的防御机制^[32],保护植物免受病虫害等。目前从植物分离获得的次生代谢产物主要分为三大类:包括含苯环结构的苯丙烷类、异戊烯基的萜类以及含氮的生物碱。在本实验中 GO 显著富集于生物过程的代谢过程并结合 KEGG 富集表明大花万代兰根部会产生大量的次生代谢物,这些代谢物在植物-环境相互作用、植物-微生物相互作用以及促进根的生长发育上发挥调控作用。

苯丙烷途径由芳香族氨基酸苯丙氨酸和酪氨酸开始,由莽草酸途径合成^[33],是一条重要的植物次生代谢途径,其产物主要包括 lignins、flavonoids 和酚类化合物等,通过产生抵御病原物侵染的物理和化学屏障,在植物应答逆境胁迫中扮演着重要的角色,使植物对外界生物和非生物胁迫产生一定的抗性作用。在本实验中 GO 和 KEGG 富集表明在 A vs B、B vs C 中,苯丙烷途径都是最显著富集之一的途径,表明大花万代兰根尖处在发育阶段组织机械强度比较弱的情况

下, 可通过化学防御应对外部胁迫。

Alkaloids 是天然存在的特性代谢物, 氮是其化学结构中存在的特征元素, 其表现出广泛的生物学特性, 可以为植物进行固氮来应对环境胁迫, 包括生物和非生物反应, 如可以对蜜蜂、蜡螟等捕食性昆虫产生毒性^[17]。此外, 紫外线 UV-B 还可以引起玫瑰花根毛 alkaloid 含量的增加以保护植物免受辐射伤害^[34]。除非生物因素外, 植物激素对于 alkaloid 也具有一定的调控作用^[35-36]。Alkaloid 被合成的过程中有大量不同的酶作为底物参与合成过程并且发生一系列的催化反应, 例如氧化、还原、酰化等, 这阐释了本研究托品酮还原酶 (TR-I)、3-O-乙酰丙烷氧烷羧酸酯酶 (CXE1) 在根部中的诱导表达以及 GO 富集结果中的 DEGs 在 A vs B、B vs C 中均显著富集在分子功能大类中的酶的结合、催化活性上, TR-I 和 CXE1 在 A vs B 中上调, 而在 B vs C 中下调表达, 表明根部伸长区正在发生大量与 alkaloid 有关的植物抗逆防御反应, 而在根的成熟区这些反应可能变慢或不显著。

Flavonoids 由苯丙烷类化合物和聚酮类化合物途径合成^[33], 是一种包含 10000 多种结构的次生代谢物, 广泛存在于植物界当中^[37]。根据其基本骨架的结构, 可以分为不同的类别, 如查尔酮、黄酮醇和花青素^[38]。在自然界中, flavonoid 参与了许多生物过程, 例如黄酮醇不仅能作为信号分子与植物激素共同调控植物根系的发育^[39-40]还能对干旱和盐胁迫作出响应^[41]; 光照、温度、干旱等可以诱导花青素的表达以保护植物免受各种环境的胁迫^[18]。Flavonoid 能够在植物与环境、植物与微生物的相互作用中起到重要作用。本研究, FLS、ANS 在 A vs B、B vs C 中均下调表达, 表明其在根部分生区的含量较高, 说明 flavonoid 类化合物对于分生区的保护作用尤为重要。成熟区由于根被的成熟, 机械强度增加, 防御相关化合物的积累显著较少。

Lignins 是植物细胞壁的主要成分之一, 是一种天然酚类聚合物, 分子量高, 组成结构复杂。其生物合成广泛有助于抗倒伏性以及对各种生物和非生物胁迫的反应^[42]。植物细胞壁是抵御外界危害的第一道屏障, 其中 lignin 能够提供植物在面对外部环境压力和侵袭时的抗性和防御机制, 增强植物的抗性, 减少病原体侵入和有害物质对植物的损害。因此, lignin 与植物抗病、抗虫、耐

热、耐寒等胁迫有一定关系^[19]。研究表明, 在水分胁迫下 lignin 中咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶 (CCoAOMT) 在大豆根部伸长区显著上调, 这可能是与木质部木质化的增加从而限制根部水分流失有关^[43]。此外, 肉桂酰辅酶 A 还原酶 (CCR) 基因是 lignin 生物合成的关键基因, 在植物伤口或病原体感染等条件下诱导, 并且与干旱胁迫和盐胁迫都有很强的相关性^[44]。本研究中的 CCoAOMT、CCR 在 A vs B 中上调表达, 而在 B vs C 中下调表达, 这与前人在大豆根部的研究结果一致, 说明在植物根伸长区, 根的维管组织成熟, 需积累较多木质素, 且木质素中抗胁迫、抗病原体等作用在这发育过程可能发挥着关键作用。

大花万代兰气生根在面临外界生物和非生物胁迫时会通过调控相关基因和代谢物进行防御。Alkaloids、flavonoids、lignins 在建立根系防御机制上发挥了重要作用, 可以保护植物免受病虫害、温度、光照、辐射等胁迫伤害。在根系的生长发育上, auxin、GAs、ABA 是重要的植物激素, 参与植物根部分生、伸长等过程。从 DEGs 和 DAMs 在不同部位的数量可以看出, 根的分生区和伸长区反应活跃, 代谢物较多, 并且这些代谢物参与了植物防御机制的建立、植物代谢过程以及植物激素信号转导等植物生命过程, 如半乳糖醇、D-松醇可以增加植物防御相关基因的表达等^[45-46]。本研究结果为万代兰根部发育的后续研究提供有力支持。

参考文献

- [1] 李璐滨, 胡陶, 杨凯, 唐征, 庄彩云, 刘振静, 彭镇华. 中国兰属植物菌根真菌的 AFLP 多样性分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(1): 81-86.
LI L B, HU T, YANG K, TANG Z, ZHUANG C Y, LIU Z J, PENG Z H. AFLP diversity in the mycorrhizal fungi of *Cymbidium* plants[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35(1): 81-86. (in Chinese)
- [2] 陈建兵, 王美娜, 王玉, 段晓娟, 李健, 孔德敏, 饶文辉, 王志才, 唐凤霞, 张灏. 兰花属间杂交新品种‘CNOCC 紫玉’[J]. 园艺学报, 2023, 50(增刊 1): 137-138.
CHEN J B, WANG M N, WANG Y, DUAN X J, LI J, KONG D M, RAO W H, WANG Z C, TANG F X, ZHANG H. A new cultivar of *Vandachostylis* ‘CNOCC Purple Jade’[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2023, 50(Suppl. 1): 137-138. (in Chinese)
- [3] MOTES M R. *Vandas: their botany, history, and culture*[M]. Portland: Timber Press, 1997.

- [4] KONG D, WANG J, WU H, VALVERDE-BARRANTES O J, WANG R, ZENG H, KARDOL P, ZHANG H, FENG Y. Nonlinearity of root trait relationships the root economics spectrum[J]. *Nature Communication*, 2019, 10(1): 2203.
- [5] FRESCHET G T, ROUMET C, COMAS L H, WEEMSTRA M, BENGOUGH A G, REWALD B, BARDGETT R D, DE DEYN G B, JOHNSON D, KLIMEŠOVÁ J, LUKAC M, MCCORMACK M L, MEIER I C, PAGÈS L, POORTER H, PRIETO I, WURZBURGER N, ZADWORYNY M, BAGNIEWSKA-ZADWORNIA A, BLANCAFLOR E B, BRUNNER I, GESSLER A, HOBBIE S E, IVERSEN C M, MOMMER L, PICON-COCHARD C, POSTMA J A, ROSE L, RYSER P, SCHERER-LORENZEN M, SOUDZILOVSKAIA N A, SUN T, VALVERDE-BARRANTES O J, WEIGELT A, YORK L M, STOKES A. Root traits as drivers of plant ecosystem functioning: current understanding, pitfalls, future research needs[J]. *New Phytologist*, 2020, 232(3): 1123-1158.
- [6] BENZING D, OTT D, FRIEDMAN W. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex[J]. *American Journal of Botany*, 1982, 69: 608-614.
- [7] LI J W, ZHANG S B, XI H P, BRADSHAW C J A, ZHANG J L. Processes controlling programmed cell death of root velamen radicum in an epiphytic orchid[J]. *Annals of Botany*, 2020, 126(2): 261-275.
- [8] MOREIRA A S F P, FILHO J P L, ISAIAS R M S. Structural adaptations of two sympatric epiphytic orchids (Orchidaceae) to a cloudy forest environment in rocky outcrops of Southeast Brazil[J]. *Revista de Biología Tropical*, 2013, 61(3): 1053-1065.
- [9] ZOTZ G, WINKLER U. Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake[J]. *Oecologia*, 2013, 171: 733-741.
- [10] ZHANG W, HU H, ZHANG S B. Divergent adaptive strategies by two co-occurring epiphytic orchids to water stress: escape or avoidance?[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 588.
- [11] LI J W, CHEN X D, HU X Y, MA L, ZHANG S B. Comparative physiological and proteomic analyses reveal different adaptive strategies by *Cymbidium sinense* and *C. tracyanum* to drought[J]. *Planta*, 2018, 247: 69-97.
- [12] QI Y, HUANG J L, ZHANG S B. Correlated evolution of leaf and root anatomic traits in *Dendrobium* (Orchidaceae)[J]. *Annals of Botany Plants*, 2020, 12(4): plaa034.
- [13] ZHANG N G, YONG J W H, HEW C S, ZHOU X. The production of cytokinin, abscisic acid and auxin by CAM orchid aerial roots[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1995, 147: 371-377.
- [14] ASCHAN G, PFANZ H. Non-foliar photosynthesis - a strategy of additional carbon acquisition[J]. *Flora*, 2003, 198: 81-97.
- [15] MARTIN C E, MAS E J, LU C, ONG B L. The photosynthetic pathway of the roots of twelve epiphytic orchids with CAM leaves[J]. *Photosynthetica*, 2010, 48: 42-50.
- [16] 饶智雄, 安玉艳, 曹荣祥, 唐泉, 汪良驹. 外源 ALA 缓解 ABA 抑制草莓根系伸长生长的机理研究[J]. *园艺学报*, 2023, 50(3): 461-474.
RAO Z X, AN Y Y, CAO R X, TANG Q, WANG L J. Studies on mechanisms of ALA alleviating ABA inhibiting root growth of strawberry[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2023, 50(3): 461-474. (in Chinese)
- [17] BHAMBHANI S, KONDHARE K R, GIRI A P. Diversity in chemical structures and biological properties of plant alkaloids[J]. *Molecules*, 2021, 26(11): 3374.
- [18] SHI L, LI X, FU Y, LI C. Environmental stimuli and phytohormones in anthocyanin biosynthesis: a comprehensive review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(22): 16415.
- [19] MOURA J C, BONINE C A, DE OLIVEIRA FERNANDES VIANA J, DORNELAS M C, MAZZAFERA P. Abiotic and biotic stresses: changes in the lignin content and composition in plants[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52(4): 360-376.
- [20] WAADT R, SELLER C A, HSU P K, TAKAHASHI Y, MUNEMASA S, SCHROEDER J I. Plant hormone regulation of abiotic stress responses[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(10): 680-694.
- [21] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. *Cell*, 2016, 167(2): 313-324.
- [22] SALEHIN M, BAGCHI R, ESTELLE M. SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development[J]. *Plant Cell*, 2015, 27(1): 9-19.
- [23] YAMAUCHI Y, TAKEDA-KAMIYA N, HANADA A, OGAWA M, KUWAHARA A, SEO M, KAMIYA Y, YAMAGUCHI S. Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed *Arabidopsis thaliana* seeds[J]. *Plant Cell Physiology*, 2007, 48(3): 555-561.
- [24] 尤扬. 植物生长调节剂在大豆生长初期根系的应用及赤霉素电化学检测平台的构建[D]. 邯郸: 河北工程大学, 2022.
YOU Y. Application of plant growth regulators in soybean root system at early growth stage: construction of gibberellin electrochemical detection platform[D]. Handan: Hebei University of Engineering, 2022. (in Chinese)
- [25] HIRANO K, UEGUCHI-TANAKA M, MATSUOKA M. GID1-mediated gibberellin signaling in plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(4): 192-199.
- [26] GRIFFITHS J, MURASE K, RIEU I, ZENTELLA R, ZHANG Z L, POWERS S J, GONG F, PHILLIPS A L, HEDDEN P, SUN T P, THOMAS S G. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin recep-

- tors in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(12): 3399-3414.
- [27] UBEDA-TOMÁS S, SWARUP R, COATES J, SWARUP K, LAPLASE L, BEEMSTER G T, HEDDEN P, BHALERAO R, BENNETT M J. Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis[J]. *Nature Cell Biology*, 2008, 10(5): 625-628.
- [28] SUN T P. The molecular mechanism evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants[J]. *Current Biology*, 2011, 21(9): R338-R345.
- [29] QIN H, WANG J, ZHOU J, QIAO J, LI Y, QUAN R, HUANG R. Absciscic acid promotes auxin biosynthesis to inhibit primary root elongation in rice[J]. *Plant Physiology*, 2023, 191(3): 1953-1967.
- [30] WANG T, LI C, WU Z, JIA Y, WANG H, SUN S, MAO C, WANG X. Absciscic acid regulates auxin homeostasis in rice root tips to promote root hair elongation[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1121.
- [31] RAGHAVENDRA A S, GONUGUNTA V K, CHRISTMANN A, GRILL E. ABA perception and signalling[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(7): 395-401.
- [32] ERB M, KLIEBENSTEIN D J. Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy[J]. *Plant Physiology*, 2020, 184(1): 39-52.
- [33] SAITO K, YONEKURA-SAKAKIBARA K, NAKABAYASHI R, HIGASHI Y, YAMAZAKI M, TOHGE T, FERNIE A R. The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: structural genetic diversity[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 72: 21-34.
- [34] BINDER B Y, PEEBLES C A, SHANKS J V, SAN K Y. The effects of UV-B stress on production of terpenoid indole-alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots[J]. *Biotechnology Progress*, 2009, 25(3): 861-865.
- [35] BIENAIME C, MELIN A, BENSADDEK L, JACQUES A, NAVA-SAUCEDO E, BALTORA-ROSSET E. Effects of plant growth regulators on cell growth and alkaloids production by cell cultures of *Lycopodiella inundata*[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2015, 123: 523-533.
- [36] RAJ D, KOKOTKIEWICZ A, DRYŚ A L, LUCZKIEWICZ M. Effect of plant growth regulators on the accumulation of indolizidine alkaloids in *Securinega suffruticosa* callus cultures[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2015, 123: 39-45.
- [37] BRUNETTI C, DI FERDINANDO M, FINI A, POLLASTRI S, TATTINI M. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: relative significance in plants and humans[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(2): 3540-3555.
- [38] SCHIJLEN E G, DE VOS C H, MARTENS S, JONKER H H, ROSIN F M, MOLTHOFF J W, TIKUNOV Y M, ANGENENT G C, VAN TUNEN A J, BOVY A G. RNA interference silencing of chalcone synthase, the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits[J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(3): 1520-1530.
- [39] MIERZIAK J, KOSTYN K, KULMA A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment[J]. *Molecules*, 2014, 19(10): 16240-16265.
- [40] TAN H, MAN C, XIE Y, YAN J, CHU J, HUANG J. A crucial role of GA-regulated flavonol biosynthesis in root growth of *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(4): 521-537.
- [41] WANG F, ZHU H, KONG W, PENG R, LIU Q, YAO Q. The *Antirrhinum AmDEL* gene enhances flavonoids accumulation and salt drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2016, 244(1): 59-73.
- [42] LIU Q, LUO L, ZHENG L. Lignins: biosynthesis and biological functions in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 335.
- [43] YAMAGUCHI M, VALLIYODAN B, ZHANG J, LENOBLE M E, YU O, ROGERS E E, NGUYEN H T, SHARP R E. Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolism and control of free iron in the elongation zone[J]. *Plant Cell and Environment*, 2010, 33(2): 223-243.
- [44] SRIVASTAVA S, VISHWAKARMA R K, ARAFAT Y A, GUPTA S K, KHAN B M. Abiotic stress induces changes in Cinnamoyl CoA Reductase (CCR) protein abundance and lignin deposition in developing seedlings of *Leucaena leucocephala*[J]. *Physiologia Molecular Biology Plants*, 2015, 21(2): 197-205.
- [45] LIU Y, ZHANG L, MA J, MENG S, PANG C P, ZHAO X M, ZHANG H D, WANG S, XU T, HE Y, LIU Y F. Application of galactinol to tomato enhances tolerance to cold and heat stresses[J]. *Horticultural Environment and Biotechnology*, 2022, 63: 311-323.
- [46] CHEN J, FERNANDEZ D, WANG D, CHEN Y J, DAI G. Biological control mechanisms of D-pinitol against powdery mildew in cucumber[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2014, 88: 52-60.