

木薯氰苷合成关键酶基因 *MeCYP79D2* 的克隆及表达分析

肖鑫辉¹, 于晓玲², 张 洁¹, 符乃方¹, 薛茂富¹, 韦卓文¹, 叶剑秋¹, 王 明^{1*}

1. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业农村部木薯种质资源保护与利用重点实验室, 海南海口 571101;
2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101

摘 要: 氰苷含量是木薯改良的重要靶标性状, *MeCYP79D2* 是木薯氰苷合成的限速酶基因之一。本研究以食用木薯品种 SC9 为材料, 克隆木薯细胞色素 P450 酶家族中的 *MeCYP79D2* 基因, 通过生物信息学软件对其进行分析, 利用实时荧光定量 PCR 检测其在不同木薯种质块根中的表达特性, 采用高效液相色谱仪测定氰化物的含量, 并分析其与 *MeCYP79D2* 基因表达量的相关性。研究结果显示: *MeCYP79D2* 基因编码区序列长度为 1625 bp, 编码 528 个氨基酸, 属于不稳定脂溶性亲水蛋白, 具有 38 个磷酸化位点; 序列比对表明该基因保守性较高; 系统进化分析显示 *MeCYP79D2* 与橡胶及麻风树关系较近; 氰苷含量不同的木薯种质资源块根中 *MeCYP79D2* 基因表达量与氰苷含量存在极显著正相关; 茉莉酸甲酯处理后, 根中 *MeCYP79D2* 基因的表达显著上调且氰苷含量显著升高。本研究结果表明 *MeCYP79D2* 参与氰苷合成, 为解析木薯氰苷生物合成的分子机制研究提供理论基础。

关键词: 木薯; 细胞色素 P450 单加氧酶; 氰苷; 基因克隆

中图分类号: S533 文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of Key Enzyme Gene *MeCYP79D2* for Cyanoside Synthesis in Cassava

XIAO Xinhui¹, YU Xiaoling², ZHANG Jie¹, FU Naifang¹, XUE Maofu¹, WEI Zhuowen¹, YE Jianqiu¹, WANG Ming^{1*}

1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Germplasm Resources Conservation and Utilization of Cassava, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: The level of cyanogenic glucosides content is an important trait for the edible quality of cassava, and *MeCYP79D2* is one of the key enzyme genes regulating cassava cyanogenic glucosides synthesis. This study used the edible variety SC9 as the material, cloned the *MeCYP79D2* gene in the cytochrome P450 enzyme family of cassava, analyzed it using bioinformatics software, and detected its expression characteristics in different cassava germplasm tubers using real-time quantitative PCR. The cyanogenic glucosides content was measured using HPLC, and its correlation with the expression level of *MeCYP79D2* gene was analyzed. The results showed that the length of the coding region sequence of *MeCYP79D2* gene was 1625 bp, encoding 528 amino acids. It belonged to an unstable lipophilic hydrophilic protein with 38 phosphorylation sites. Sequence alignment indicated that the gene was highly conserved, and phylogenetic analysis showed that *MeCYP79D2* was closely related to rubber and leprosy trees. There was a significant positive correlation between the expression of *MeCYP79D2* gene and the content of cyanogen glycosides in cassava roots of germplasms with different levels of cyanogen glycosides. After treatment with methyl jasmonate, the expression of *MeCYP79D2* gene in roots was significantly upregulated and the content of cyanogenic glucosides was significantly

收稿日期 2024-04-02; 修回日期 2024-04-16

基金项目 海南省自然科学基金青年基金项目 (No. 321QN318); 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所非营利科研启动经费人才专项 (No. PZS2023020); 国家木薯产业技术体系项目 (No. CARS-11-HNLKM)。

作者简介 肖鑫辉 (1983—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 木薯种质资源与遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 王 明 (WANG Ming), E-mail: 78651982@qq.com。

increased. The results of this study indicates that *MeCYP79D2* is involved in cyanogenic glucosides synthesis, providing a theoretical basis for studying the molecular mechanism of cassava cyanogenic glucosides biosynthesis.

Keywords: cassava; cytochrome P450; cyanogenic glucosides; gene cloning

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.11.003

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 是世界热带地区的主要粮食作物, 是重要的淀粉、能源及饲料加工原料, 全球以木薯为原料的食品多达上千种^[1-2]。因木薯中含有氰苷化合物, 人们在食用时要经过一定的处理, 费工费时, 极大限制了木薯食用化的发展。氰苷是一种广泛存在于高粱、木薯、杂粮杂豆 (利马豆和野生荞麦等)、牧草 (白三叶和百脉根等) 等植物中的代谢产物, 其被水解酶水解后能释放有毒化合物氰氢酸, 可抵抗病原微生物的侵害和昆虫啃食, 也能在植物体内被分解作为氮源^[3-4]。木薯中含有 1 种或 2 种氰苷化合物, 为亚麻苦苷和百脉根苷, 其中亚麻苦苷含量占 95% 以上^[5]。木薯分为甜木薯和苦木薯, 主要差别在于块根中氰苷类化合物含量的高低, 低于 50 mg/kg 为甜木薯, 反之则为苦木薯, 甜木薯主要用于食用和饲用, 苦木薯主要用于加工利用^[6]。

细胞色素 P450 单加氧酶 (cytochrome P450, CYP450) 是一类普遍存在于动植物和真菌中的超大酶类家族, 约占植物基因组编码蛋白质的 1%^[7]。它作为一种末端加氧酶, 可以催化各类羟基化、环氧化、脱烷基化反应, 参与植物激素、萜类、生物碱类、黄酮类等次生代谢产物的合成与代谢, 在生物过程中发挥重要作用^[8-9], 广泛分布在玉米^[10]、水稻^[11]、小麦^[12]、番茄^[13]、茶树^[14]等作物中。氰苷生物合成途径中涉及三大类酶, 其中两类均属于细胞色素 CYP450 单加氧酶家族, 为 CYP79 和 CYP71 亚族成员, 另一类为葡萄糖转移酶。氰苷生成过程中首先通过 CYP450, 将 α -氨基酸羟基化形成 N-羟基氨基酸, 然后形成醛肟, 进一步形成腈, 最后一步是由糖基转移酶催化的半氰醇的糖基化反应生成氰苷^[15]。CYP450 作为氰苷合成途径中的第一步关键酶, 在调控植物氰苷含量方面发挥着重要作用。前人研究表明, 抑制 *CYP79D1* 与 *CYP79D2* 基因的表达会降低木薯中氰苷含量, 从而降低木薯毒性^[16]。因此, 解析木薯氰苷类化合物代谢的分子机制, 选育氰化物含量低的木薯品种, 是木薯食用化利用的重要研究方向。

本研究以食用木薯品种 SC9 为材料, 克隆

MeCYP79D2 基因并进行生物信息学分析, 研究其在氰苷含量不同的木薯种质资源块根中的表达情况, 并对其在 MeJA 诱导下的表达量进行分析, 初步分析氰苷代谢关键调控酶基因 *MeCYP79D2* 的序列及表达差异, 以期后续相关基因功能和调控机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

MeCYP79D2 基因克隆供试材料为 SC9 木薯品种的叶片和块根, 基因荧光定量检测供试材料为国家木薯种质资源圃保存的 16 份种质资源。主要试剂: 与凝胶电泳有关试剂购自北京擎科生物科技有限公司; 乙腈、甲酸购自海南冷港科技有限公司。主要仪器设备: 基因扩增仪 (TaKaRa, 日本)、超微量分光光度计 (Implen N60, 德国)、实时荧光定量 PCR 仪 (Thermo, 美国) 和液相色谱仪 (Agilent 1260, 美国)。PCR 引物合成和 DNA 测序由北京擎科生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 采用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen) 提取样品总 RNA, 并用核酸检测仪检测其浓度和质量。待 RNA 质量检测合格后, 按照 RevertAid RT 逆转录试剂盒 (Thermo) 说明书将总 RNA 反转录合成 cDNA。

1.2.2 基因克隆 在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载 *MeCYP79D2* 基因序列, 利用 Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) 在线软件设计特异性扩增 *MeCYP79D2* 基因编码区 (CDS) 序列的引物 (5'-ATGGCCATGAACGTCTCCAC-3' 和 5'-TCAAGGTGAAGTGGGGTAGA-3')。扩增体系为: cDNA 模板 2 μ L、*MeCYP79D2*-F (10 μ mol/L) 0.5 μ L、*MeCYP79D2*-R (10 μ mol/L) 0.5 μ L、Phanta Max Master Mix (2 $\times$) 23.5 μ L、无菌水补足至 50 μ L。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖

凝胶电泳检测，并送至北京擎科生物科技有限公司测序。

1.2.3 生物信息学分析 对 MeCYP79D2 的同源序列、进化关系、蛋白理化性质、结构和功能等方面进行生物信息学分析，使用的数据库和软件见表 1。

表 1 生物信息学分析的数据库和软件
Tab. 1 Database and software of Bioinformatics analysis

序号 No.	数据库或软件 Database or Software	功能 Function	网址 Website
1	NCBI Blastp	查找木薯 MeCYP79D2 的同源氨基酸序列	
2	DNAMAN 6.0	进行多重比对	
3	MEGA 7.0	邻接法 (Neighbor-joining method) 构建系统发育进化树	
4	ProtParam	对 MeCYP79D2 进行理化性质预测	https://web.expasy.org/protparam
5	ProtScale	Kyte & Doolittle 法进行疏水性预测	https://web.expasy.org/protscale
6	TMHMM 2.0	跨膜结构域预测	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
7	SignalP 6.0	信号肽预测	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/
8	Net-Phos 3.1 Server	磷酸化位点预测	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/
9	SOPMA	蛋白二级结构预测	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html
10	Swiss-Model	构建蛋白的三级结构模型	https://swissmodel.expasy.org/interactive

1.2.4 荧光定量 PCR 检测 利用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen) 提取 16 份种质资源的块根 RNA。取 1 μg RNA，逆转录合成第一链 cDNA，稀释 10 倍后作为模板。使用 Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) 在线软件设计木薯 *MeCYP79D2* 基因的荧光定量 PCR 引物 (正向引物：5'-ACTTCAGAGATCATTTCTCC-AGCTA-3'，反向引物：5'-ACATTCTTGTTGC-TCTTGTTACTGGT-3')，选用 *MeActin* 为内参基因 (正向引物：5'-TGATGAGTCTGGTCCATCCA-3'，反向引物：5'-CCTCCTACGACCCAATCTCA-3')。扩增体系 (10 μL)：cDNA 模板 1 μL、10 μmol/L 荧光定量 PCR 引物各 0.2 μL、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (2×) 5 μL、ddH₂O 3.6 μL。反应程序：95 ℃ 预变性 30 s；95 ℃ 10 s、60 ℃ 20 s，40 个循环。每样品设置 3 次重复。

1.2.5 氰化物含量的测定 参照王琴飞等^[17]的方法利用高效液相色谱仪分析样品中氰苷含量。色谱柱：Waters Atlantic C18，4.6 mm×150 mm，粒径 5 μm，柱温 25 ℃。流动相：A 为含 0.1% 甲酸的 80% 乙腈/水 (V/V)，B 为 0.1% 甲酸水溶液。梯度洗脱程序：起始时 (0 min)，A 为 10%，B

为 90%；15 min 时，A 和 B 均为 50%；18 min 时，A 为 100%，持续 2 min；22 min 时，A 为 10%，B 为 90%；平衡柱子 5 min。流速为 0.6 mL/min，漂移管温度为 95 ℃，雾化温度为 80 ℃，气流速度为 2.0 L/min，增益为 3，进样体积为 10 μL。采用外标法计算样品中亚麻苦苷和百脉根苷的含量。

1.3 数据处理

采用 Excel 2016 和 SPSS 20.0 软件进行数据处理及分析。应用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因的相对表达量，使用 Tukey's HSD 法进行显著性测验 (P<0.05)。使用 Graphpad (v8.0.2) 绘制相基因对表达量和氰苷含量柱状图。

2 结果与分析

2.1 *MeCYP79D2* 基因克隆

采用同源克隆策略，在 NCBI 数据库中搜索获得木薯品种 Col22 的 *MeCYP79D2* 基因 cDNA 全长 1626 bp，编码 541 个氨基酸。以木薯 SC9 叶片 RNA 为模板，扩增 *MeCYP79D2* 基因全长，将克隆得到的目的基因纯化、测序后进行序列比对。*MeCYP79D2* 基因编码区长度为 1625 bp，编码 528 个氨基酸 (图 1)。与 Col22 的 *MeCYP79D2*

基因核苷酸序列比对, 在 117 和 1560 位置上存在单碱基突变, 942 位置上存在单碱基缺失, 相似

性达 99.82%。蛋白质序列比对发现有 192 个位点存在差异, 占比 38.35%。

```

1  ATGGCCATGAACGTCTCCACCACCGCAACCAACGCGCTCCTTCGCTCCACGTCTCCATGAACAATACTGCCAAAATCCTCCTATC
1  M A M N V S T T A T T T A S F A S T S S M N N T A K I L L I
91  ACCCTTTCATTTCATTGTGCTACTGTTATAAACTTCAAAAAGGGCTTCTACAAGAAAGCTAGCAAGAACTCCCACTCCCTCCT
91  A C C C T T T C A T T T C A T T G T C A G T A C T G T T A T A A A A C T T C A A A A A G G G C T T C T A C A A G A A G C T A G C A A G A A C T C C C A C T C C C T C C T
31  T L F I S I V S T V I K L Q K R A S Y K K A S K N F P L P P
31  T L F I S I V S T V I K L Q K R A S Y K K A S K N F P L P P
181  GTCGACCTCATGGCCACTCATCGGAACATCCCTGAAATGATCCGGTACAGAACCAACGTTTCGTTGGATTACCAACTCATGAAGGAC
181  G T C G A C C T C A T G G C C A C T C A T C G G A A C A T C C C T G A A A T G A T C C G G T A C A G A A C C A A C G T T T C G T T G G A T T A C C A A C T C A T G A A G G A C
61  G P T P W P L I G N I P E M I R Y R P T F R W I H Q L M K D
61  G P T P W P L I G N I P E M I R Y R P T F R W I H Q L M K D
271  ATGAACACCGATATTTGTCTGATCCGTTTCGGAACAACTACGTTGTTCTTATAGCTGCCCTGTCATTGCTGGAATCCTGAAAAAG
271  A T G A A C A C C G A T A T T T G T C T G A T C C G T T T C G G A A C A A C T A C G T T G T T C T T A T A G C T G C C T G T C A T T G C T G G A A T C C T G A A A A G
91  M N T D I C L I R F G K T N V V P I S C P V I A R E I L K K
91  M N T D I C L I R F G K T N V V P I S C P V I A R E I L K K
361  CACGATGCTGCTTCTCTAACAGGCCAAAGATTCTCTGCGCTAAACAATGAGCGGGGATACTTGACGACGATTGTGGCCATACAAT
361  C A C G A T G C T G C T T C T C T A A C A G G C C A A A G A T T C T C T G C G C T A A A C A A T G A G C G G G G A T A C T T G A C G A C G A T T G T G G C C A T A C A A T
121  H D A V F S N R P K I L C A K T M S G G Y L T T I V V P Y N
121  H D A V F S N R P K I L C A K T M S G G Y L T T I V V P Y N
451  GATCAATGGAAGAAATGAGGAAGGTCTAATCTCAGAGATCATTTCTCCAGCTAGGCACAAATGGTCCATGATAAGAGAGCTGAGGAA
451  G A T C A A T G G A A G A A A T G A G G A A G G T C T A A T C T C A G A G A T C A T T T C T C C A G C T A G G C A C A A T G G T C C A T G A T A A G A G A G C T G A G G A A
151  D Q W K K M R K V L T S E I I S P A R H K W L H D K R A E E
151  D Q W K K M R K V L T S E I I S P A R H K W L H D K R A E E
541  GCAGATCAGCTTGTGTTCTATATCAATAACCACTACAGAGCAACAAGAAATGTAATGTGAGAATTGCGGCAAGGCATTACGGTGGAAAT
541  G C A G A T C A G C T T G T G T T C T A T A T C A A T A A C C A G T A C A G A G C A A C A A G A A T G T A A T G T G A G A A T T G C G G C A A G G C A T T A C G G T G G A A A T
181  A D Q L V F Y I N N Q Y K S N K N V N V R I A A R H Y G G N
181  A D Q L V F Y I N N Q Y K S N K N V N V R I A A R H Y G G N
631  GTGATCAGAAAGATGATGTTTAGCAAGAGATACCTCGGCAAGGGATGCTGATGGAGGACCAAGGGCTGAAGAAATCATGCACGTTGAT
631  G T G A T C A G A A A G A T G A T G T T T A G C A A G A G A T A C T T C G G C A A G G G A T G C C T G A T G G A G G A C C A G G G C T G A A G A A A T C A T G C A C G T T G A T
211  V I R K M M F S K R Y F G K G M P D G G P G P E E I M H V D
211  V I R K M M F S K R Y F G K G M P D G G P G P E E I M H V D
721  GCAATTTTCACAGCACTTAAATATTGTATGATTTTGCATCTCTGATTACTTGCCTTTTTTGGAGGGGCTTGATCTTGATGGCCAGGAA
721  G C A A T T T T C A C A G C A C T T A A A T A T T G T A T G A T T T T G C A T C T C T G A T T A C T T G C C T T T T T T G G A G G G C T T G A T C T T G A T G G C C A G G A A
241  A I F T A L K Y L Y G F C I S D Y L P F L E G L D L D G Q E
241  A I F T A L K Y L Y G F C I S D Y L P F L E G L D L D G Q E
811  AAGATTGTGCTTAATGCAAAATAGACCATAGGGATCTTCAAAACCCATTAATAGAAGAAAGGATTCAACAATGGAGGAGTGTTGAAAGA
811  A A G A T T G T G C T T A A T G C A A A T A G A C C A T A G G G A T C T T C A A A C C C A T T A A T A G A A G A A G G A T T C A A C A A T G G A G G A G T G T T G A A G A
271  K I V L N A N K T I R D L Q N P L I E E R I Q Q W R S G E R
271  K I V L N A N K T I R D L Q N P L I E E R I Q Q W R S G E R
901  AAGGAAATGGAAGACTTGCTTGATGTTTTCATTACTCTTCAGATTGATGGCAAGCCATTGCTCAATCCAGACGAGATAAAGAAATCAA
901  A A G G A A A T G G A A G A C T T G C T T G A T G T T T C A T T A C T C T T C A G A T T G A T G G C A A G C C A T T G C T C A A T C C A G A C G A G A T A A A G A A T C A A
301  K E M E D L L D V F I T L Q I Q M A S H C S I Q T R * R I K
301  K E M E D L L D V F I T L Q I Q M A S H C S I Q T R * R I K
991  TCGTGAAATATTGATAGCAACAATAGACAACCCAGCAACGCCGTAGAAATGGGCAATGGGGAGCTGATAAATCAACCAAGAACTTCTGG
991  T C G T G A A A T A T T G A T A G C A A C A A T A G A C A C C C A G C A A C G C C G T A G A A T G G G C A A T G G G G A G C T G A T A A A T C A A C C A G A A C T T C T G G
331  S L K L * * Q Q * T T Q Q Q T P * N G Q W G S * * I N Q N F W
331  S L K L * * Q Q * T T Q Q Q T P * N G Q W G S * * I N Q N F W
1081  CAAAGGCCACAGAGGAATGACAGAGTGGTGGGCAAGAGAGGCTTGTGCAAGAAATCTGACATCCCTAATCTTAATGCTCAAGGCT
1081  C A A A G G C C A C A G A G G A A T G A C A G A G T G G T G G G C A A G A G A G G C T T G T G C A A G A A T C T G A C A T C C C T A A T C T T A A T G C T C A A G C C T
361  Q R P Q R N L T E W S A K T G L C K N L T S L I L I T S K P
361  Q R P Q R N L T E W S A K T G L C K N L T S L I L I T S K P
1171  GTGCAAGGGAGGCGCTTCAGGCTCCACCCAGTTGCATCTCAACGTCCTCAGTAGCCATGGAAGACGCCGTCATCGGCGATTACTTCA
1171  G T G C A A G G G A G G C G C T T C A G G C T C C A C C C A G T T G C A T C T C A A C G T C C C T C A G T A G C C A T G G A A G A C G C C G T C A T C G G C G A T T A C T T C A
391  V Q G R P S G S T Q L H T S T S L T * P W K T P S S A I T S
391  V Q G R P S G S T Q L H T S T S L T * P W K T P S S A I T S
1261  TTCCAAAGGGCAGCTGGGCAATTCTTAGCGCTACGGGCTCGGCCGAACCCAAAAACATGGCCTGATCCACTCAAGTACGACCCAGAAA
1261  T T C C A A A G G G C A G C T G G G C A A T T C T T A G C G C T A C G G G C T C G G C C G A A C C C A A A A A C A T G G C C T G A T C C A C T C A A G T A C G A C C C A G A A A
421  F Q R A A G Q F L A A T G S A G T Q K H G L I H S T T Q K
421  F Q R A A G Q F L A A T G S A G T Q K H G L I H S T T Q K
1351  GGCACCTTGAACAGGGCGAAGTGGTGTGCTGACTGAGCAGACCTTAGGTTGCTGACACTCAGCACTGGACGTCGTGGGTGTGCTGCTGCT
1351  G G C A C C T T G A A C A G G G C G A A G T G G T G T G C T G A C T G A G C A G A C C T T A G G T T G C T G A C A C T C A G C A C T G G A C G T C G T G G G T G T G C T G C T G C T
451  G T * T R A K W C * L S T T L G S S H S A L D V V G V S L L
451  G T * T R A K W C * L S T T L G S S H S A L D V V G V S L L
1441  TGCTTGAACACCATGATTACGATGATGCTGGCCAGGATGCTTCAGTGCTTCACTTGGACTCCGCCCTTAATGTAAACCAAGATTGATC
1441  T G C T T G A A C A C C A T G A T T A C G A T G A T G C T G G C C A G G A T G C T T C A G T G C T T C A C T T G G A C T C C G C C C C T A A T G T A A C C A A G A T T G A T C
481  C L E P P * L R * C W P G C F S A S L G L R P L M * P R L I
481  C L E P P * L R * C W P G C F S A S L G L R P L M * P R L I
1531  TCAGTGAGAATATCGATGAGCTTACTCCAGCAACACCCATCACAGGATTGCTAAGCCACGGTTGGCTCCTCATCTCTACCCCACTTCAC
1531  T C A G T G A G A A T A T C G A T G A G C T T A C T C C A G C A A C A C C C A T C A C A G G A T T G C T A A G C C A C G G T T G G C T C C T C A T C T C T A C C C A C T T C A C
511  S V R I S M S L L Q Q H P S Q D L L S H G W L L I S T P L H
511  S V R I S M S L L Q Q H P S Q D L L S H G W L L I S T P L H
1621  CTGA
1621  CTGA
541  L
541  L

```

图 1 *MeCYP79D2* 基因编码区序列

Fig. 1 Coding sequence of *MeCYP79D2* gene

2.2 *MeCYP79D2* 蛋白氨基酸序列比对及系统进化分析

在 NCBI 数据库中对 *MeCYP79D2* 氨基酸序列保守结构域进行搜索, 结果如图 2 所示, *MeCYP79D2* 包含细胞色素 P450 酶 (cytochrome_P450) 结构域和 CYP79 结构域非特异性位点, 属于细胞色素 P450 酶超家族 (cytochrome_P450 superfamily)。通过 Blastp 同源比对, 发现木薯 *MeCYP79D2* 氨基酸序列 (XP_021629850.1) 与橡胶树 (*Hevea brasiliensis*, XP_021674957.2)、麻风树 (*Jatropha curcas*, AXF53803.1)、蓖麻 (*Ricinus communis*, XP_002534163.3)、水银草 (*Mercurialis annua*, XP_050203649.1)、亚麻 (*Linum usitatissimum*, WAL01197.1)、雷公藤

(*Tripterygium wilfordii*, XP_038697057.1)、大蒲桃 (*Syzygium grande*, KAI6691975.1)、蒜头果 (*Malania oleifera*, XP_057972653.1)、大桉 (*Eucalyptus grandis*, XP_010030374.3)、番木瓜 (*Carica papaya*, XP_021887085.1) 等的氨基酸序列相似性较高, 分别为 88.35%、77.45%、75.60%、70.85%、67.23%、68.74%、60.79%、62.57%、61.19%、59.47%。利用 DNAMAN 7.0 软件对木薯 *MeCYP79D2* 氨基酸序列与上述 10 个物种进行序列比对, 结果表明, 不同物种的 *MeCYP79D2* 氨基酸序列具有较高的保守性, 其中与橡胶树和麻风树相似度较高 (图 3), 说明 *MeCYP79D2* 基因的功能与橡胶树和麻风树的 CYP79D2 功能相似。

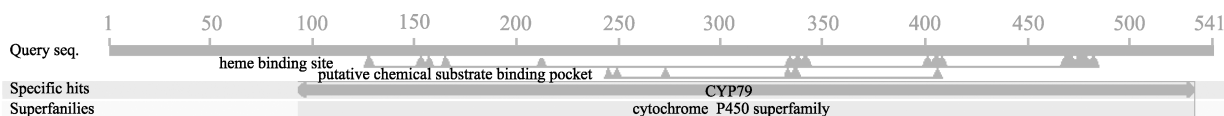


图 2 *MeCYP79D2* 蛋白保守结构域预测

Fig. 2 Prediction of *MeCYP79D2* protein conserved domain

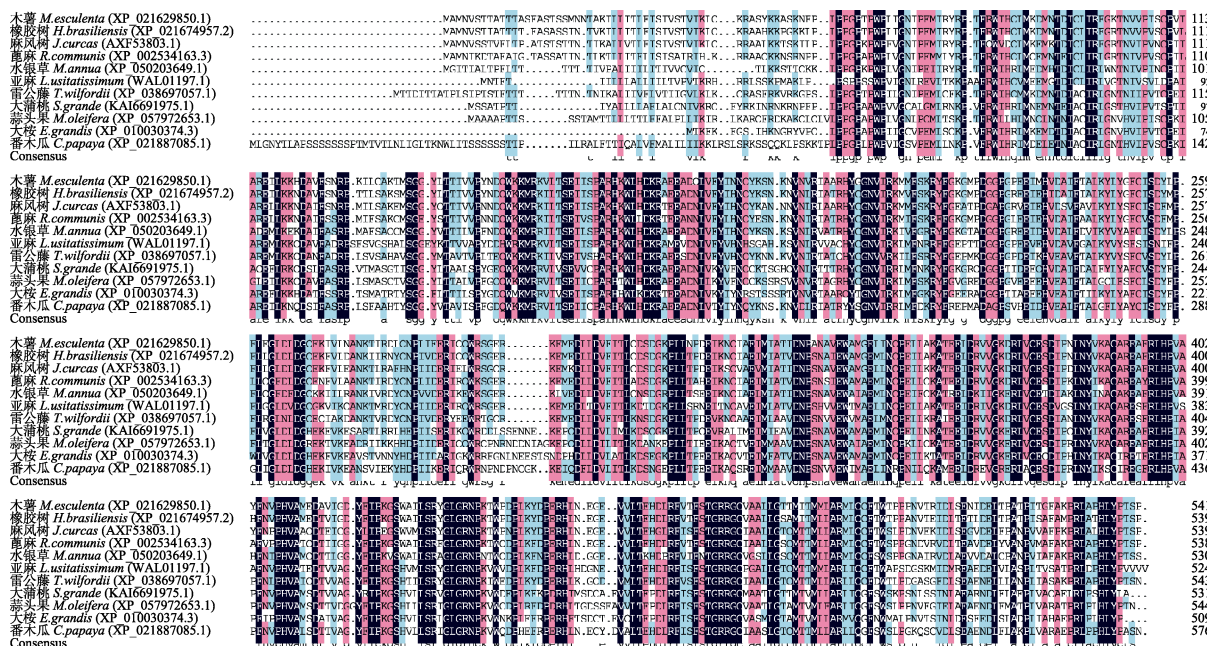


图 3 木薯与其他作物的 CYP79D2 氨基酸序列比对

Fig. 3 Sequences alignment of amino acid of CYP79D2 between cassava and other plants

利用 MEGA7.1^[18]软件中 neighbor-joining 法^[19]将木薯 MeCYP79D2 氨基酸序列与其他 10 个物种构建同源进化树 (图 4), 结果显示, 木薯与橡胶树、麻风树属于同一分支, 其中与橡胶树在进化关系上最为接近, 与序列比对结果一致。

2.3 MeCYP79D2 蛋白理化性质预测

利用 ProtParam 在线软件分析预测 MeCYP79D2 蛋白分子结构式为 $C_{2758}H_{4366}N_{742}O_{781}S_{27}$, 相对分子量为 61.28 kDa, 理论等电点为 8.90, 预测该蛋白由 541 个氨基酸残基组成, 其中亮氨酸 (Leu) 比

例最高, 为 9.1%, 半胱氨酸 (Cys) 比例较低, 为 1.3%; 不稳定系数为 40.40, 脂肪系数为 89.78, 总平均亲水性为 -0.239, 依据总平均亲水性小于 0 为亲水蛋白, 推测 MeCYP79D2 蛋白为不稳定的脂溶性亲水蛋白。

使用 ProtScale 在线工具对 MeCYP79D2 蛋白的亲/疏水性进行预测分析, 结果如图 5 所示。第 34 位氨基酸得分最高, 为 2.100, 疏水性最强, 第 445 位氨基酸得分最低, 为 -2.063, 亲水性最强, 第 0~50 位氨基酸有 1 个典型的疏水性区域,

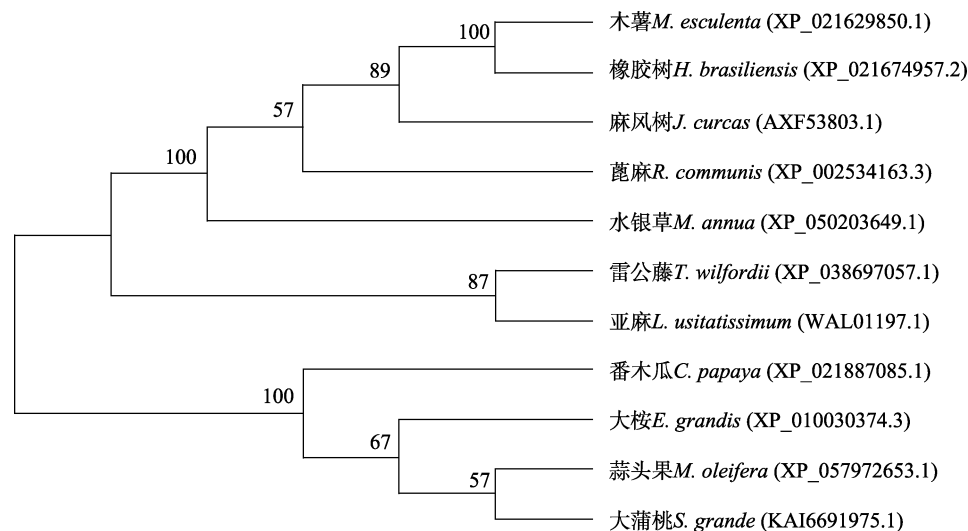


图 4 木薯与其他物种的 CYP79D2 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of CYP79D2 between cassava and other plants

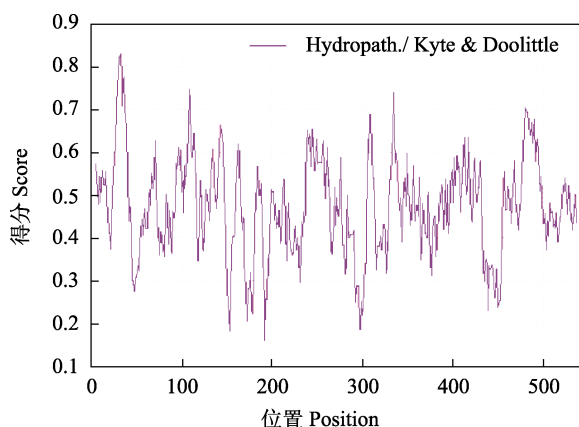


图 5 *MeCYP79D2* 蛋白的亲/疏水性预测
Fig. 5 Hydrophobicity/hydrophilic character analysis of *MeCYP79D2*

该区域存在 1 个跨膜结构。通过 TMHMM 软件预测发现 *MeCYP79D2* 蛋白的第 1~18 位氨基酸位于细胞膜内，第 19~41 位氨基酸之间有 1 个跨膜螺旋区，第 42~541 位氨基酸位于细胞膜外，推测 *MeCYP79D2* 蛋白是一个跨膜蛋白（图 6），与 ProtScale 预测的蛋白跨膜结构结果相符。SignalP 预测结果显示，*MeCYP79D2* 蛋白不含信号肽。

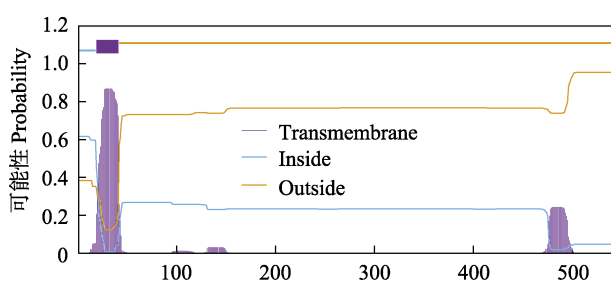


图 6 *MeCYP79D2* 蛋白的跨膜结构预测
Fig. 6 Prediction of transmembrane structures of *MeCYP79D2*

采用 NetPhos 3.1 Server 软件对 *MeCYP79D2* 蛋白的磷酸化修饰位点进行分析，结果如图 7 所示。*MeCYP79D2* 蛋白具有 38 个潜在磷酸化修饰位点，占氨基酸序列的 7.0%，其中丝氨酸位点 20 个，苏氨酸位点 15 个，酪氨酸位点 3 个，主要能被蛋白激酶 C (PKC)、蛋白激酶 A (PKA)、细胞分裂周期蛋白 2 (*cdc2*) 和酪蛋白激酶 II (CK II) 等蛋白激酶磷酸化。

2.4 *MeCYP79D2* 蛋白的二、三级结构分析

利用 SOPMA 软件对 *MeCYP79D2* 蛋白二级结构进行预测，结果如图 8 所示。*MeCYP79D2* 蛋白主要以 α -螺旋和不规则卷曲为主，分别为 224 个和 197 个，分别占氨基酸序列的 45.10%和

36.41%；另外还含有 27 个 β -转角和 73 个延伸链，分别占氨基酸序列的 4.99%和 13.49%。基于木薯 *CYP79D2* 的晶体结构 (Q9M7B7.1A) 对 *MeCYP79D2* 蛋白进行三级结构建模，结果如图 9 所示，二者相似度为 99.63%。

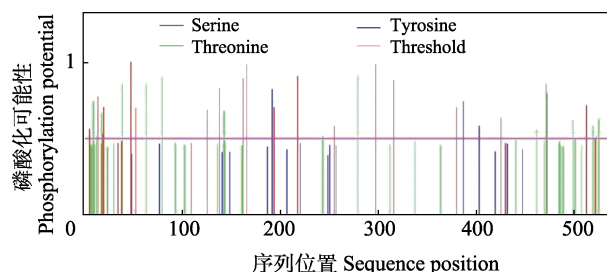


图 7 *MeCYP79D2* 蛋白的磷酸化位点预测
Fig. 7 Prediction of phosphorylation site of *MeCYP79D2*

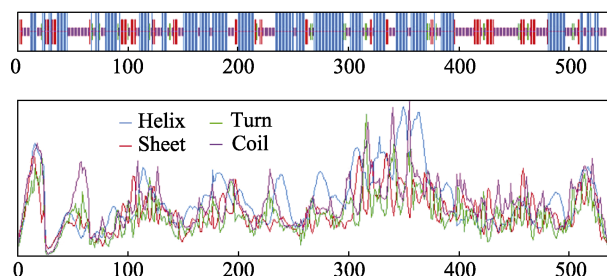


图 8 *MeCYP79D2* 蛋白的二级结构预测
Fig. 8 Prediction of secondary structure types of *MeCYP79D2*

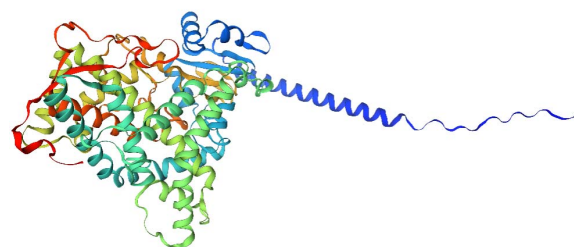


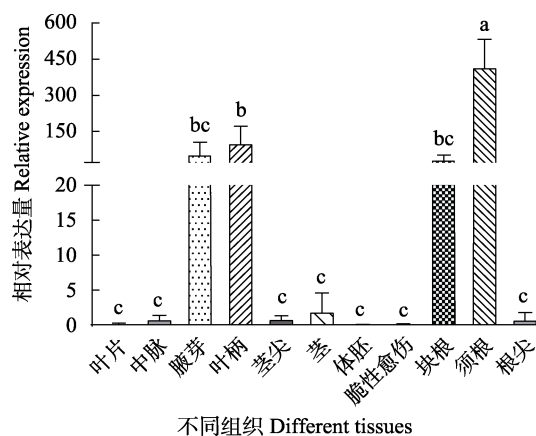
图 9 *MeCYP79D2* 蛋白的三级结构
Fig. 9 Tertiary structure of *MeCYP79D2*

2.5 *MeCYP79D2* 在木薯不同组织部位中的表达分析

基于前人转录组数据^[20]，对 *MeCYP79D2* 在木薯叶片、中脉、腋芽、叶柄、茎尖、茎、体胚、脆性愈伤、块根、须根、根尖等 11 个组织部位的相对表达情况进行分析，结果如图 10 所示，*MeCYP79D2* 基因在木薯腋芽、叶柄、块根和须根中的表达量显著高于其他组织。

2.6 不同木薯种质资源块根中 *MeCYP79D2* 表达与氰苷含量关系分析

为探究 *MeCYP79D2* 在与氰苷含量的关系，



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).
图 10 木薯不同组织部位中 *MeCYP79D2* 表达情况
Fig. 10 Expression of *MeCYP79D2* in different tissues of cassava

取 16 份氰苷含量的不同的木薯种质资源的块根, 检测其 *MeCYP79D2* 基因相对表达量和氰苷含量。结果表明, *MeCYP79D2* 基因表达量与氰苷含量存在极显著正相关, 相关系数为 0.692 (图 11)。

2.7 *MeCYP79D2* 基因在 MeJA 处理下的表达分析

用 100 $\mu\text{mol/L}$ 茉莉酸甲酯 (MeJA) 对 SC9

木薯种茎进行水培处理, 分别检测处理 0、3、6、9、12、24 h 后 *MeCYP79D2* 基因在根、茎、叶中的表达情况及处理 0、1、2、3 d 后的氰苷含量变化。结果显示, SC9 根中 *MeCYP79D2* 基因的表达受 MeJA 诱导显著上调 (图 12A), 且 24 h 后 SC9 根中氰苷含量极显著升高, 而茎和叶中氰苷含量分别于 2~3 d 后极显著升高 (图 12B), 推测 MeJA 调控 *MeCYP79D2* 基因的表达来促进氰苷的合成。

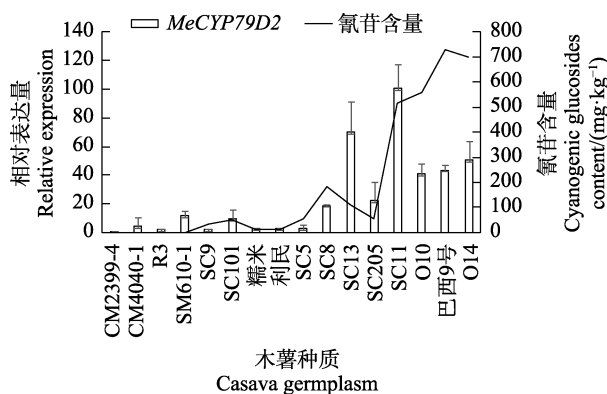
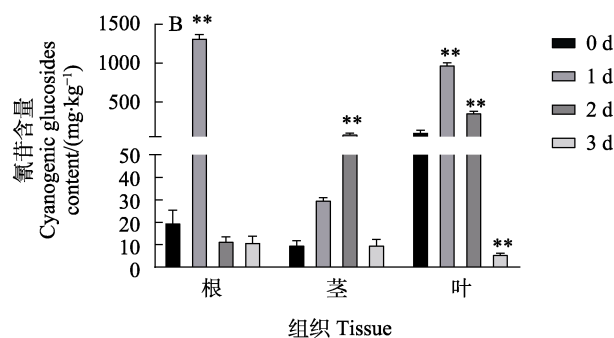
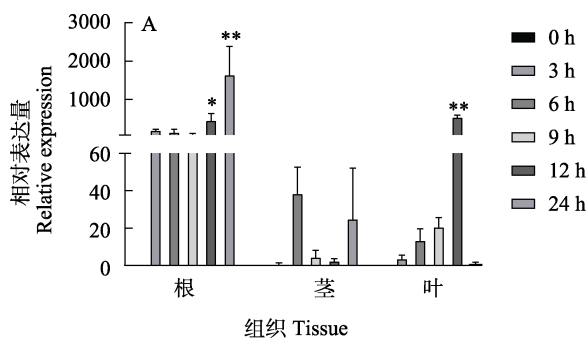


图 11 16 份木薯种质块根中 *MeCYP79D2* 基因表达与氰苷含量关系

Fig. 11 Relationship between *MeCYP79D2* expression and cyanogenic glucosides content in tuberous roots of 16 cassava germplasms



*表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$)。
* indicates significant difference ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 12 MeJA 诱导下 *MeCYP79D2* 在 SC9 根、茎、叶中氰苷含量及表达情况

Fig. 12 Cyanogenic glucosides content and *MeCYP79D2* expression in SC9 tubers root, stem, and leaf tissues induced by MeJA

3 讨论

氰苷不仅是评判木薯能否食用的关键性状, 还是其块根还原氮的重要来源, 可影响氨基酸和蛋白质合成以及块根组织损伤后, 快速引发采后生理腐烂过程^[16, 21-23]。植物中氰苷的合成、运输和转运是一个高度整合的过程, 涉及不同组织和器官中多种基因和酶的差异表达。在模式植物高

粱中发现氰苷的生物合成途径, 具体步骤如下: 一是 L-酪氨酸经 CYP79A1 催化后氮端羟基化, 脱水、脱羧化生成相对应的对羟基苯乙醛肟; 二是在 CYP71E1 的催化下, 对羟基苯乙醛肟通过脱水和碳端羟基化, 转变为对羟基苯乙醛腈; 三是在糖苷转移酶 UGT85B1 的作用下, 对羟基苯乙醛腈糖基化成为蜀黍苷^[24]。不同研究表明, 在木

薯^[25-26]、韭菜^[27]、百脉根^[28]中均发现了上述生物合成途径。在不同种类的植物中, 催化氰苷合成的酶不尽相同, 但都是由 CYP79 同源基因编码, 且功能都具有相似性, 木薯催化氰苷合成第一步的酶是 CYP79D1 和 CYP79D2^[22, 29], CYP79D1 和 CYP79D2 基因相似性为 85%, 与高粱 CYP79A1 序列具有 54% 的同源性。虽然 CYP79D1 和 CYP79D2 的表达相同, 并且都可以使用缬氨酸和异亮氨酸作为底物, 但缬氨酸的结合亲和力高于异亮氨酸, 因此在木薯中, 亚麻苦苷是主要的氰苷成分, 占 95% 以上^[30]。且 CYP79D1 和 CYP79D2 活性被证实高于 CYP71E7, 在催化氰苷生物合成中具有限速作用^[25]。此外参与氰苷运输和代谢途径的基因有多药及毒素外排转运蛋白 MATE、硝酸盐/肽转运蛋白 NPF、羟基腈裂解酶 HNL 等, 在利用基因工程改造木薯氰苷含量, 增强营养等方面具有重要意义^[31]。

目前国内外尚未培育出叶片或块根中完全不含氰苷的木薯品种^[32]。研究表明, 亚麻苦苷在叶片或部分在茎中合成, 并通过茎韧皮部运输到块根, 一部分储存在液泡中, 另一部分为氨基酸合成提供还原的氮源, 块根则不合成亚麻苦苷。MCMAHON 等^[31]提出基于库源关系改良木薯品种中氰苷含量的分子策略, 即通过阻断亚麻苦苷合成的限速步骤 CYP79D1 和 D2 的催化, 可将块根中亚麻苦苷降低到安全水平。GOMEZ 等^[33]使用基因编辑技术对 CYP79D1 和 CYP79D2 进行敲除, 得出 CYP79D2 的表达在亚麻苦苷合成中作用突出。本研究从食用品种 SC9 中克隆得到 *MeCYP79D2* 基因编码序列, 其 cDNA 全长 1625 bp, 编码 528 个氨基酸, 分子量为 61.28 kDa, 理论等电点为 8.90。周伟坚等^[34]克隆 *MeCYP79D2* 基因与数据库中在核苷酸序列和氨基酸序列同源性达 99%, 本研究与数据库比对, 核苷酸序列相似性达 99.82%, 但氨基酸序列差异达 38.35%, 可能与克隆基因的品种差异有关。原晓龙等^[35]也在蒜头果中克隆出 *MoCYP79* 基因 cDNA 序列, 与木薯中 AAF27290.1 和 AAF27289.1 蛋白聚为一类。本研究通过系统进化分析表明, *MeCYP79D2* 与包括蒜头果在内的 10 个物种距离相近, 其中和橡胶和麻风树关系最近。结构分析表明, *MeCYP79D2* 基因属于细胞色素 P450 酶超家族和 CYP79 结构域非特异性位点, 含有一个保守的血红素结合域, 序列为 FxxGxRxCxG^[36]。生信分析

结果显示, 该蛋白为不稳定的脂溶性亲水蛋白, 存在一个跨膜结构, 不含信号肽, 具有 38 个潜在磷酸化修饰位点, 二级结构主要以 α -螺旋和不规则卷曲为主。*MeCYP79D2* 主要在须根、叶柄、腋芽和块根中表达。通过高氰苷含量与低氰苷含量的木薯种质资源中 *MeCYP79D2* 基因表达量与氰苷含量的相关性分析得出二者存在极显著正相关, 是否可以作为高氰和低氰品种的功能标记开发, 有待进一步研究。

此外, 氰苷在植物防御反应中起着重要作用, 同时受外界干旱、低温等环境及内源性激素变化的影响。茉莉酸及其衍生物茉莉酸甲酯 (MeJA) 是植物体内重要的脂质激素, 参与调控生物胁迫和非生物胁迫下植物的生长发育过程^[37]。茉莉酸含量的增加通常伴随着防御相关基因的上调表达, 产生具有防御功能的次级代谢产物, 如萜类化合物、葡萄糖苷、黄酮类和花青素等^[38-39]。昆虫咬食和茉莉酸及其衍生物均可上调氰苷合成关键基因的表达^[40-42], 表明氰苷的合成可能与茉莉酸密切相关。在本研究中, *MeCYP79D2* 基因在 MeJA 作用下, 表达量和氰苷含量均呈显著性变化, 说明 *MeCYP79D2* 基因参与茉莉酸激素的响应影响氰苷合成。以上结果为后续相关基因的功能研究奠定基础, 同时为深入研究木薯氰苷合成机制提供理论依据。

参考文献

- [1] AMELEWORK A B, BAIRU M W. Advances in genetic analysis and breeding of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): a review[J]. Plants, 2022, 11(12): 1617.
- [2] ROCHA V P C, GONÇALVES-VIDIGAL M.C, ORTIZ A H T, VALENTINI G, FERREIRA, R C U, GONÇALVES, T M, LACANALLO G F, VIDIGAL FILHO P S. Population structure and genetic diversity in sweet cassava accessions in Paraná and Santa Catarina, Brazil[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2020, 38: 25-38.
- [3] JØRGENSEN K, MORANT A V, MORANT M, JENSEN N B, OLSEN C E, KANNANGARA R, MOTAWIA M S, MØLLER B L, BAK S. Biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin in cassava: isolation, biochemical characterization, and expression pattern of CYP71E7, the oxime-metabolizing cytochrome P450 enzyme[J]. Plant Physiology, 2011, 155(1): 282-292.
- [4] 邹良平, 起登凤, 孙建波, 彭明. 木薯生氰糖苷研究进展[J].

- 热带农业科学, 2013, 33(10): 43-46.
- ZOU L P, QI D F, SUN J B, PENG M. Research advances on cyanogenic glycoside in cassava[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2013, 33(10): 43-46. (in Chinese)
- [5] 吴显荣, 刘建卫. 植物体内的生氰糖苷[J]. 北京农业大学学报, 1984, 10(4): 345-352.
- WU X R, LIU J W. The cyanogenic glycosides in higher plants[J]. Journal of China Agricultural University, 1984, 10(4): 345-352. (in Chinese)
- [6] 沈培峰. 木薯生氰葡萄糖苷酶 (Linamarase) 基因的克隆表达和酶学特性分析[D]. 海口: 海南大学, 2012.
- SHEN P F. Expression and enzymatic properties of linamarase in cassava[D]. Haikou: Hainan University, 2012. (in Chinese)
- [7] NELSON D, WERCK-REICHHART D. A P450-centric view of plant evolution[J]. Plant Journal, 2011, 66(1): 194-211.
- [8] 高世玺, 戎梅, 彭俊祥, 徐艳红, 魏建和. 细胞色素 P450 在植物倍半萜类化合物生物合成中的作用研究进展[J]. 药学学报, 2023, 58(10): 1-19.
- GAO S X, RONG M, PENG J X, XU Y H, WEI J H. Research progress on the role of cytochrome P450 in plant sesquiterpene biosynthesis[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2023, 58(10): 1-19. (in Chinese)
- [9] 李永康, 马雪祺, 冯婧娴, 陈万生, 孙连娜, 肖莹. 细胞色素 P450 酶在植物次生代谢产物生物合成中的研究进展[J]. 分子植物育种, 2024, 22(7): 2179-2183.
- LI Y K, MA X Q, FENG Q X, CHEN W S, SUN L N, XIAO Y. Advances of cytochrome P450s in the biosynthesis of plant secondary metabolites[J]. Molecular Plant Breeding, 2024, 22(7): 2179-2183. (in Chinese)
- [10] LAO S H, HUANG X H, HUANG H J, LIU C W, ZHANG C X, BAO Y Y. Genomic and transcriptomic insights into the cytochrome P450 monooxygenase gene repertoire in the rice pest brown planthopper[J]. Nilaparvata Lugens, Genomics, 2015, 106(5): 301-309.
- [11] WASEEM M, HUANG F, WANG Q, ASLAM M M, ABBAS F, AHMAD F, ASHRAF U, HASSAN W, FIAZ S, YE X, YU L, KE Y. Identification, methylation profiling, and expression analysis of stress-responsive cytochrome P450 genes in rice under abiotic and phytohormones stresses[J]. GM Crops Food, 2021, 12(1): 551-563.
- [12] 司文洁, 吴林楠, 郭利建, 周梦蝶, 刘香利, 马猛, 赵惠贤. 小麦粒重相关基因 TaCYP78A5 功能标记开发及验证[J]. 作物学报, 2019, 45(12): 1905-1911.
- SI W J, WU L N, GUO L J, ZHOU M D, LIU X L, MA M, ZHAO H X. Development and validation of the functional marker of grain weight-related gene TACYP78A5 in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Acta Agronomica Sinica, 2019, 45(12): 1905-1911. (in Chinese)
- [13] CHAKRABARTI M, ZHANG N, SAUVAGE C, MUÑOS S, BLANCA J, CAÑIZARES J, DIEZ M J, SCHNEIDER R, MAZOUREK M, MCCLEAD J, CAUSSE M, VAN DER KNAAP E. A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(42): 17125-17130.
- [14] 何荟如, 林杰, 吴叶蝶, 潘泓静, 彭志松, 苏祝成. 茶树 CsCYP79A1 基因克隆及表达分析[J]. 南方农业学报, 2021, 52(3): 641-650.
- HE H R, LIN J, WU Y D, PAN H J, PENG Z S, SU Z C. Cloning and expression analysis of CsCYP79A1 gene in tea plant[J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(3): 641-650. (in Chinese)
- [15] 刘易. 中成药中氰苷类有毒成分的筛查、定量测定和体外转化研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2016.
- LIU Y. Screening, quantitative determination and *in vitro* transformation of cyanide glycosides in Chinese patent medicine[D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2016. (in Chinese)
- [16] JØRGENSEN K, BAK S, BUSK P K, SØRENSEN C, OLSEN C E, PUONTI-KAERLAS J, MØLLER B L. Cassava plants with a depleted cyanogenic glucoside content in leaves and tubers. distribution of cyanogenic glucosides, their site of synthesis and transport, and blockage of the biosynthesis by RNA interference technology[J]. Plant Physiology, 2005, 139(1): 363-74.
- [17] 王琴飞, 林立铭, 张振文, 余厚美, 徐缓, 羊贤月. 食用木薯块根及其制品中生氰糖苷检测方法的建立与应用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 271-278.
- WANG Q F, LIN L M, ZHANG Z W, YU H M, XU H, YANG X Y. Establishment and application of a method for detecting the cyanogenic glycoside in sweet cassava root and its products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(2): 271-278. (in Chinese)
- [18] KUMAR S, STECHER G, AND TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33: 1870-1874.
- [19] SAITOU N, AND NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4: 406-425.
- [20] WILSON M C, MUTKA A M, HUMMEL A W, BERRY J, CHAUHAN R D, VIJAYARAGHAVAN A, TAYLOR N J,

- VOYTAS D F, CHITWOOD D H, BART R S. Gene expression atlas for the food security crop cassava[J]. Wiley, 2017, 213: 1632-1641.
- [21] NARAYANAN NN, IHEMERE U, ELLERY C, SAYRE RT. Overexpression of hydroxynitrile lyase in cassava roots elevates protein and free amino acids while reducing residual cyanogen levels[J]. PLoS One, 2011, 6: e21996.
- [22] ZIDENGA T, LEYVA-GUERRERO E, MOON H, SIRITUNGA D, SAYRE R T. Extending cassava root shelf life via reduction of reactive oxygen species production[J]. Plant Physiology, 2012, 159: 1396-1407.
- [23] ZIDENGA T, SIRITUNGA D, SAYRE R T. Cyanogen metabolism in cassava roots: impact on protein synthesis and root development[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 220.
- [24] ABROL Y P, CONN E E. Studies on cyanide metabolism in *Lotus arabicus* L. and *Lotus tenuis* L.[J]. Pergamon, 1966, 5(2): 535-538.
- [25] ANDERSEN M D, BUSK P K, SVENDSEN I, MØLLER B L. Cytochromes P450 from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin: cloning, functional expression in *Pichia pastoris*, and substrate specificity of the isolated recombinant enzymes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(3): 1966-1975.
- [26] DIMUTH S, RICHARD S. Engineering cyanogen synthesis and turnover in cassava (*Manihot esculenta*)[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 56(4): 661-669.
- [27] TEICHER V B, KUCHARSKI N, MARTIN H D, VANDER SAAG P, SIES H, STAHL W. Biological activities of apo-canthaxanthinoic acids related to gap junctional communication[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999, 365(1): 150-155.
- [28] FORSLUND K, MORANT M, JØRGENSEN B, OLSEN C E, ASAMIZU E, SATO S, TABATA S, BAK S. Biosynthesis of the nitrile glucosides rhodiocyanoside A and D and the cyanogenic glucosides lotaustralin and linamarin in *Lotus japonicus*[J]. Plant Physiology, 2004, 135(1): 71-84.
- [29] WITTSTOCK U, HALKIER B A. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7: 263-270.
- [30] MCMAHON J, WHITE W L B, SAYRE R T. Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. Journal of Experimental Botany, 1995, 46: 731-741.
- [31] MCMAHON J, SAYRE R, ZIDENGA T. Cyanogenesis in cassava and its molecular manipulation for crop improvement[J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(7): 1853-1867.
- [32] SAYRE R, BEECHING J R, CAHOON E B, EGESI C, FAUQUET C, FELLMAN J, FREGENE M, GRUISSEM W, MALLOWA S, MANARY M, MAZIYA-DIXON B, MBANASO A, SCHACHTMAN D P, SIRITUNGA D, TAYLOR N, VANDERSCHUREN H, ZHANG P. The BioCassava plus program: biofortification of cassava for sub-Saharan Africa[J]. Annual Review of Plant Biology, 2011, 62: 251-272.
- [33] GOMEZ M A, BERKOFF K C, GILL B K, IAVARONE AT, LIEBERMAN S E, MA J M, SCHULTINK A, KARAVOLIAS N G, WYMAN S K, CHAUHAN R D, TAYLOR N J, STASKAWICZ B J, CHO M J, ROKHSAR D S, LYONS J B. CRISPR-Cas9-mediated knockout of *CYP79D1* and *CYP79D2* in cassava attenuates toxic cyanogen production[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 17, 13: 1079254.
- [34] 周伟坚, 陈忠正, 容显初, 李洁宇. 木薯氰化物合成限速酶 *CYP79D2* 基因克隆与序列分析[J]. 中国农学通报, 2008, 24(8): 121-125.
- ZHOU W J, CHEN Z Z, RONG X C, LI J Y. Cloning and alignment of the *CYP79D2* gene encoding the committed enzyme in the synthesis of cyanogenic glucoside in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(8): 121-125. (in Chinese)
- [35] 原晓龙, 陈中华, 李云琴, 王毅. 一个与氰苷生物合成相关的植物 *CYP* 基因的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(7): 2182-2187.
- YUAN X L, CHEN Z H, LI Y Q, WANG Y. Cloning and expression analysis of a plant cytochrome P450 gene involved in the biosynthesis of cyanogenic glycoside[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(7): 2182-2187. (in Chinese)
- [36] 杨杰. 白桦 *CYP450* 的 5 个家族基因在三萜合成中的功能研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.
- YANG J. Functional analysis in triterpenoid synthesis of five *CYP450* family genes in *Betula platyphylla* Suk[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2019. (in Chinese)
- [37] 黎家, 李传友. 新中国成立 70 年来植物激素研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(10): 1227-1281.
- LI J, LI C Y. Seventy-year major research progress in plant hormones by Chinese scholars[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2019, 49(10): 1227-1281. (in Chinese)
- [38] GEYTER ND, GHOLAMI A, GOORMACHTIG S, GOOSSENS A. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17: 349-359.
- [39] FALK K L, KÄSTNER J, BODENHAUSEN N,

- SCHRAMM K, MELDAU S. The role of glucosinolates and the jasmonic acid pathway in resistance of *Arabidopsis thaliana* against molluscan herbivores[J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23: 1188-1203.
- [40] SALZMAN R A, BRADY J A, FINLAYSON S A, BUCHANAN CD, SUMMER E J, FENG S, KLEIN P E, KLEIN R R, PRATT L H, MARIE-MICHÈLE C P. Transcriptional profiling of sorghum induced by methyl jasmonate, salicylic acid, and aminocyclopropane carboxylic acid reveals cooperative regulation and novel gene responses[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138: 352-368.
- [41] ZHU-SALZMAN K, SALZMAN R A, AHN J E, KOIWA H. Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134: 420-431.
- [42] CHEN C, LIU F, ZHANG K X, NIU X L, ZHAO H, LIU Q X, GEORGIEV M I, XU X H, ZHANG X Q, ZHOU M L. Meja-responsive bhlh transcription factor ljbhlh7 regulates cyanogenic glucoside biosynthesis in *lotus japonicus*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73: 2650-2665.