

青阳参 C<sub>21</sub> 甾体类生物合成关键基因挖掘

耿应敏, 周兴乾, 吴丽丽, 张体操, 郑兰平\* (云南中医药大学中药学院, 昆明 650500)

**摘要:**目的 解析青阳参 C<sub>21</sub> 甾体类化合物的生物合成途径。方法 本研究利用代谢组学和转录组学技术, 比较分析青阳参根、茎、叶中 C<sub>21</sub> 甾体类化合物的相对含量, 再通过京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库注释, 筛选与 C<sub>21</sub> 甾体类生物合成相关的基因。最后通过实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 对部分差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 进行基因表达验证。结果 青阳参苷元在根中显著上调, 且在根中的相对含量约为叶中的 73.10 倍, 约为茎中的 19.05 倍。转录组学分析发现, 青阳参中有 269 条 DEGs 注释到了 C<sub>21</sub> 甾体类生物合成相关通路。通过分析各比较组间注释到的 DEGs, 在 C<sub>21</sub> 甾体类相关合成通路中筛选出了 18 个关键酶, 且由 87 条基因编码, 其中 AACT 等酶是其生物合成途径上游阶段的关键酶。进一步对其中 8 条 DEGs 进行 qRT-PCR 验证, 其表达趋势与对应的转录组数据结果一致。结论 本研究系统解析了青阳参中 C<sub>21</sub> 甾体类化合物的生物合成途径, 筛选出多个关键酶及编码基因, 丰富了青阳参的组学数据。这些发现为进一步研究青阳参 C<sub>21</sub> 甾体类化合物的生物合成机制奠定了基础。

**关键词:** 青阳参; 青阳参苷元; 代谢组学; 转录组学; 生物合成途径

doi:10.11669/cpj.2025.05.002 中图分类号:R29;R931.6 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)05-0447-11

Mining of Key Genes for Biosynthesis of C<sub>21</sub> Steroids of *Cynanchum otophyllum*

GENG Yingmin, ZHOU Xingqian, WU Lili, ZHANG Ticao, ZHENG Lanping\* (College of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the biosynthetic pathway of C<sub>21</sub> steroidal compounds in *Cynanchum otophyllum* Schneid. . **METHODS** Metabolomics and transcriptomics were used to compare and analyze the relative contents of C<sub>21</sub> steroids in the roots, stems and leaves of *C. otophyllum*. Then, the genes related to C<sub>21</sub> steroid biosynthesis in *C. otophyllum* were screened through Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database annotation. Finally, some differentially expressed genes (DEGs) were verified by quantitative real-time PCR. **RESULTS** The qingyangshengenin content in the roots was significantly up-regulated, with the relative qingyangshengenin content in the roots being approximately 73.10 times higher than that in the leaves and 19.05 times higher than that in the stems. Transcriptomic analysis revealed that 269 DEGs annotated C<sub>21</sub> steroidal biosynthetic pathways. By analyzing the DEGs annotated between the comparison groups, 18 key enzymes were screened out in the C<sub>21</sub> steroidal synthesis pathway, which were encoded by 87 genes, among which AACT and other enzymes were the key enzymes in the upstream stage of the biosynthesis pathway. Quantitative real-time PCR was performed to verify the expression trend of eight DEGs, which was consistent with the corresponding transcriptome data. **CONCLUSION** The biosynthetic pathway of C<sub>21</sub> steroidal compounds is systematically analyzed in this study, and several key enzymes and coding genes are screened, which enrich the omics data of *C. otophyllum*. These findings lay a foundation for further study on the biosynthesis mechanism of C<sub>21</sub> steroid compounds of *C. otophyllum*.

**KEY WORDS:** *Cynanchum otophyllum*; qingyangshengenin metabolomics; transcriptomics; biosynthetic pathway

青阳参 (*Cynanchum otophyllum* Schneid.) 是鹅绒藤属 (*Cynanchum* Linn.) 多年生草质藤本植物, 又名千年生、白药、闹狗药、奶浆藤、青洋参等, 主要分布于我国云南、四川、贵州和湖南等省区<sup>[1]</sup>。该种虽分布区较广, 但均呈散在分布, 长期采挖造成了野生资源的极大破坏, 资源量逐年减少<sup>[2]</sup>。为缓解资源短缺的问题, 从现代中药学角度解析药效成分合成机制, 挖

掘重要功能基因, 用于分子育种或体外合成药效成分, 将有利于该物种资源的保护和利用。青阳参以根入药, 名为青阳参, 始载于清代, 曾先后记载于《云南中草药选》《丽江中草药》《昆明民间常用草药》及《云南省药品标准》, 在云南具有悠久的用药历史, 且是我国独具特色的民族中药材, 在白族、纳西族、彝族等少数民族均有用药历史<sup>[2-3]</sup>。另外, 青阳参也是中成药

基金项目: 云南省基础研究项目资助 (202301AT070254); 云南省应用基础研究中医联合专项资助 (202101AZ070001-056)

作者简介: 耿应敏, 女, 硕士研究生 研究方向: 中药资源开发与利用 \* 通讯作者: 郑兰平, 女, 博士, 副研究员 研究方向: 中药资源开发与利用

青阳参片的原料药<sup>[3]</sup>。据《彝药志》和《滇南本草》记载,青阳参具有益肾强筋、祛风除湿、驱虫等功效,在民间用其治疗风湿关节炎、风湿冷痛、腰肌劳损等<sup>[4]</sup>。现代药理学研究表明,青阳参具有丰富的药理作用。首先,青阳参在治疗脑部疾病方面效果显著,多项研究表明青阳参总苷具有显著的抗抑郁作用,并且是很有前途的抗癫痫中药材<sup>[5-8]</sup>。最近的研究结果也表明青阳参里的 C<sub>21</sub> 甾体苷元具有显著的抗肿瘤作用<sup>[9-10]</sup>,此外,青阳参也具有较高的抗人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)活性<sup>[11]</sup>,其在抗肝炎和免疫调节等方面也具有显著效果<sup>[12-13]</sup>。化学研究表明,青阳参主要含有 C<sub>21</sub> 甾体类、苯乙酮类、有机酸类等化学成分,其中 C<sub>21</sub> 甾体皂苷是其活性成分<sup>[14]</sup>。在青阳参中,构成 C<sub>21</sub> 甾体皂苷的苷元主要有青阳参苷元(qingyangshengenin)、告达亭(caudatin)、去乙酰萝藦苷元(deacetylmetaplexigenin)等多个类型,但形成糖苷的主要是青阳参苷元和告达亭<sup>[14-16]</sup>。C<sub>21</sub> 甾体类是含有 21 个碳原子的甾体衍生物,具有抗炎、抗肿瘤、抗生育等作用,是重要的次生代谢产物,常作为甾体药物的前体在临床上广泛应用<sup>[17]</sup>。而甾体皂苷类化合物的上游合成途径主要有甲羟戊酸(mevalonate pathway, MVA)和 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)两条途径,其主要涉及萜类化合物骨架合成、倍半萜和三萜生物合成以及类固醇类化合物合成<sup>[18-19]</sup>。

关于青阳参的已有研究主要集中在化学成分中提取分离及其药理活性方面,目前未见组学相关的研究报道,且其 C<sub>21</sub> 甾体类化合物的生物合成及调控的分子机制尚不清楚。随着高通量测序技术的发展,代谢组学和转录组学已广泛应用于中药活性成分生物合成途径中关键酶基因的挖掘<sup>[20]</sup>。因此,本研究基于广泛靶向代谢组学从总体分析青阳参化学成分的组成特点以及筛选其药效成分,并联合转录组学技术筛选 C<sub>21</sub> 甾体类生物合成途径相关的酶基因,初步探究 C<sub>21</sub> 甾体类化合物积累的分子机制,为后续关键基因的鉴定及功能验证研究奠定基础,并为以后该种资源的合理开发和利用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

青阳参植株采集于云南省丽江市拉市海(26°52.330'N, 100°9.494'E),经云南中医药大学杨从卫老师鉴定确认。选取青阳参长势一致且健康的新鲜植株,用超纯水洗净泥土,并用滤纸吸干表面

水分后,将植株的根、茎、叶分别放入液氮中速冻,1 h 后保存至 -80 °C 的冰箱中备用,不同部位样品均设置 3 个生物学重复。

### 1.2 样品提取及代谢组分析

**1.2.1 样品提取** 将不同组织部位样品分别放置于冻干机(Scientz-100F)中真空冷冻干燥后,使用研磨仪(MM 400, Retsch)将其研磨至粉末状;分别称取 50 mg 样品,并加入 1.2 mL 在 -20 °C 预冷后的体积分数 70% 甲醇;每 30 min 涡旋 1 次,共涡旋 6 次;离心后吸取上清,用微孔滤膜(0.22 μm pore size)过滤后,将样品保存于进样瓶中。

**1.2.2 仪器分析** 数据采集仪器系统主要包括超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)和串联质谱(tandem mass spectrometry, MS/MS)。

UPLC 检测条件:色谱柱为 Agilent SB-C<sub>18</sub> 柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm);流动相:A 相为 0.1% 甲酸水,B 相为乙腈(加入 0.1% 的甲酸);洗脱梯度:0 min B 相比例为 5%,9 min 内 B 相比例线性增加到 95%,并维持在 95% 1 min,10 ~ 11.10 min, B 相比例降为 5%,并以 5% 平衡至 14 min;流速 0.35 mL · min<sup>-1</sup>;柱温 40 °C;进样量 2 μL。

MS/MS 检测条件:电喷雾离子源温度为 550 °C;离子喷雾电压在正离子模式和负离子模式下分别为 5 500 V 和 -4 500 V;离子源气体 I、气体 II 和气帘气分别设置为 344.74、413.69 和 172.37 kPa,碰撞诱导电离参数设置为高。三重四极杆扫描使用多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM),并将碰撞气体设置为中等,再进一步优化去簇电压和碰撞能。最后根据每个时期内洗脱的代谢物,在每个时期监测一组特定的多反应监测模式离子对。

根据二级谱信息进行物质定性,分析时去除同位素信号,含 K<sup>+</sup> 离子、Na<sup>+</sup> 离子、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 离子的重复信号,以及本身是其他更大分子量物质的碎片离子的重复信号。利用三重四级杆质谱的 MRM 对代谢物进行定量。最终获得不同样本的代谢物质谱分析数据后,对所有物质色谱峰进行峰面积积分,并对其中同一代谢物在不同样本中的质谱出峰进行校正<sup>[21]</sup>。

**1.2.3 数据处理与统计分析** 将最终的代谢物数据进行主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)等。以变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)大于 1,且差异倍数(fold change, FC) ≥ 2

或  $FC \leq 0.5$  为条件筛选差异代谢物。

### 1.3 转录组测序和分析

**1.3.1 总 RNA 提取、测序及注释** 使用 RNA 提取试剂盒 (MagZol™ Reagent Plus Kit) 对样品进行总 RNA 的提取。使用 PacBio 测序仪对合格的文库进行全长转录组测序,得到干净数据后,进行聚类去冗余,最终得到全长转录本序列用于后续分析以及作为二代数据比对的参考转录本序列。通过 DIAMOND BLASTX 和 HMMER 软件将序列比对到七大功能数据库 (KEGG、Nr、Swiss-Prot、GO、KOG、TrEMBL、Pfam),最后得到数据库注释信息和蛋白结构域的注释结果<sup>[22]</sup>。

**1.3.2 基因表达量与差异分析** 采用每千个碱基的转录每百万映射读取的片段 (FPKM) 作为衡量基因表达水平的指标,使用软件 RSEM<sup>[23]</sup> 和 Bowtie2<sup>[24]</sup> 计算青阳参 3 个组织部位的基因表达水平。使用 DESeq2<sup>[25-26]</sup> 进行样品组间的差异表达分析,获得 3 个组织部位之间的差异表达基因集 (differentially expressed genes, DEGs),并对 DEGs 进行功能注释和分析。DEGs 的筛选条件为  $|\log_2 FC| \geq 1$ ,且错误发现率  $FDR < 0.05$ 。

### 1.4 C<sub>21</sub> 甾体类生物合成相关基因的筛选和分析

筛选与 C<sub>21</sub> 甾体类生物合成通路相关的显著 DEGs,并将 C<sub>21</sub> 甾体类差异代谢物的相对定量数据和相关 DEGs 的表达定量数据进行相关性网络分析,皮尔逊相关系数阈值设置为 0.80,同时设置  $P < 0.05$ ,以建立 C<sub>21</sub> 甾体类化合物与差异基因的关联性。

### 1.5 qRT-PCR 分析

随机挑选 8 条在 C<sub>21</sub> 甾体类生物合成途径上的 DEGs,并根据基因序列设计了特异性引物 (表 1),且以 GAPDH 作为内参基因进行 qRT-PCR 验证。每个样品中每个基因的检测设置 3 个复孔,共进行 3 次生物学重复。将 3 次生物学重复得到的数据利用公式  $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算其相对表达量,并绘制箱线图。

## 2 结果与分析

### 2.1 青阳参代谢组结果

**2.1.1 代谢物总体分析和 PCA 分析** 在青阳参根、茎、叶中共检测到 1 385 个代谢物,其中氨基酸及其衍生物类占比最多,其次是酚酸类,脂类、黄酮类及其他类代谢物的数量依次降低 (图 1A)。PCA 结果显示 (图 1B),第一主成分 (PC1) 的解释率为 50.40%,第二主成分 (PC2) 的解释率为 34.69%。在这两个维度上,不同组织部位之间有明显的

**表 1** 本研究用于实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 的引物序列

**Tab. 1** Primer sequences used for qRT-PCR in this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
GAPDH-F	CAGATCAAGTCAACCACACGGG
GAPDH-R	TAAACTCAAGGGAATCCTCGGG
AACT_42891-F	GCTCGCAGCACAGACCATACA
AACT_42891-R	CATCCCACAACCCATCTTTTCAT
AACT_30964-F	GCTCGCAGCACAGACCATACA
AACT_30964-R	CATCCCACAACCCATCTTTTCAT
MVD_39064-F	TCGGAGTCTATATGCTGTTTTCGTC
MVD_39064-R	TGCTAGTTCTTTCTGCGCCTGAG
IPPI_53071-F	CAATAAGGCCAAACCTGGCATC
IPPI_53071-R	GAAGAACACCATCAACGCAAGC
CYP51_39069-F	ATCACCTGCTTTCGCCAACCC
CYP51_39069-R	ACATCCATGCCTGCCTCCAC
CYP51_4038-F	GAAAGGATCGGTTCTGGTGAT
CYP51_4038-R	TCCTGAGACTGTCGAGGTGTGC
GGPP_43032-F	GGGAAGAATCCACCGCCATC
GGPP_43032-R	ACAGCCACATCCTCGCCATAA
GCPE_29264-F	AGTGTCTCTTACTGAACCCCCG
GCPE_29264-R	TCCTGCGTTGGAAATCAAATA

分离,表明青阳参在根、茎、叶中的代谢物存在明显差异,质控样本 (QC) 的聚类结果也表明实验结果可靠 (图 1B)。

**2.1.2 差异代谢物筛选** 在根和叶的比较组 (leaf vs root) 中,共鉴定出 955 种差异代谢物,其中有 591 种在根中下调,364 种在根中上调,且有 32 种是根和叶比较组中特有的差异代谢物;在叶和茎的比较组 (stem vs leaf) 中,共鉴定出 856 种差异代谢物,其中有 437 种在叶中上调,419 种在叶中下调,且有 59 种是叶和茎比较组中特有的差异代谢物;在根和茎的比较组 (stem vs root) 中,共鉴定出 834 种差异代谢物,其中有 527 种在根中下调,307 种在根上调,且有 53 种是根和茎的比较组中特有的差异代谢物 (图 2)。在上述 3 个比较组中,从根和叶比较组中筛选出的差异代谢物数量最多,其余两组筛选出的差异代谢物数量相近,且有 417 种代谢物是 3 个比较组所共有的差异代谢物 (图 2B)。

在各对比组差异显著的代谢物中,根和叶比较组中主要是苯丙氨酰-缬氨酰-苯丙氨酸等氨基酸及其衍生物;叶和茎比较组中主要是 L-天冬酰胺-L-色氨酸等氨基酸及其衍生物及东莨菪内酯-7-O-木糖基(1→6)葡萄糖苷等木脂素和香豆素;根和茎比较组中主要是苯丙氨酰-酪氨酰-异亮氨酸等氨基酸及其衍生物。对差异代谢物中的甾体类代谢物分析发现,共有 10 个甾体类代谢物在各组织部位均有分布,其中 3 个代谢物属于甾体皂苷类,分别为杠柳苷 E、杠柳苷 B 和青阳参苷元。

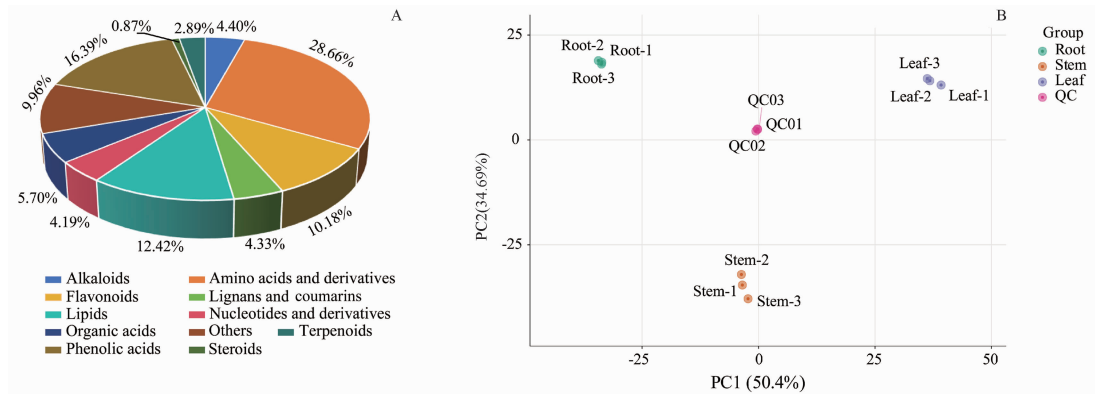
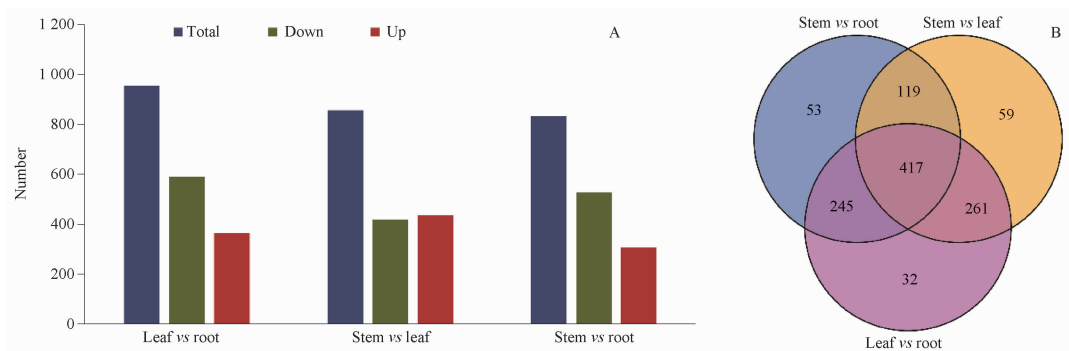


图1 青阳参总体样本代谢物类别组成饼状图(A)和青阳参各组样品质谱数据的主成分分析(PCA)得分图(B)

Fig. 1 Pie charts of metabolite class composition of overall samples (A) and PCA scores of mass spectrometry data of quality control samples of each group of samples (B) of *Cynanchum otophyllum*.



A - 差异代谢物柱状图; B - 差异代谢物韦恩图。

A - the bar chart of differential metabolites; B - the Venn diagram of differential metabolites.

图2 青阳参各对比组间差异代谢物数量

Fig. 2 Number of different metabolites among comparison groups of *Cynanchum otophyllum*.

由于青阳参苷元是青阳参中构成  $C_{21}$  甾体皂苷的重要苷元,因此对青阳参苷元进一步分析发现,在根和叶比较组中,青阳参苷元在根中显著上调,且在根中的相对含量约为叶的 73.10 倍;在根和茎比较组中,青阳参苷元也在根中显著上调,且在根中的相对含量约为茎的 19.05 倍;在叶和茎比较组中,青阳参苷元在叶中显著下调,且在叶中的相对含量约为茎中的 0.26 倍。表明青阳参苷元在根和茎中含量较高,且在根中的相对含量最高。而次生代谢产物含量的差异是由基因表达差异造成的,即青阳参苷元在 3 个比较组中,均在根和茎中显著上调,可进一步对其进行转录组学分析,挖掘造成此差异的关键酶基因。

### 3 结果

#### 3.1 转录组测序结果

通过 PacBio 对青阳参进行 3 代全长转录组测序,共获得 74.69 Gb 数据,去除低质量序列和接头序列后,共获得了 72.11 Gb 数据,最终生成 42 913

条 Isoforms,平均长度为 2 358 bp,N50 长度为 2 658 bp(表 2)。将三代去冗余之后的转录本作为参考序列,并将每个二代测序样品的 clean reads 比对到三代全长转录本序列。

表 2 青阳参转录组原始数据统计

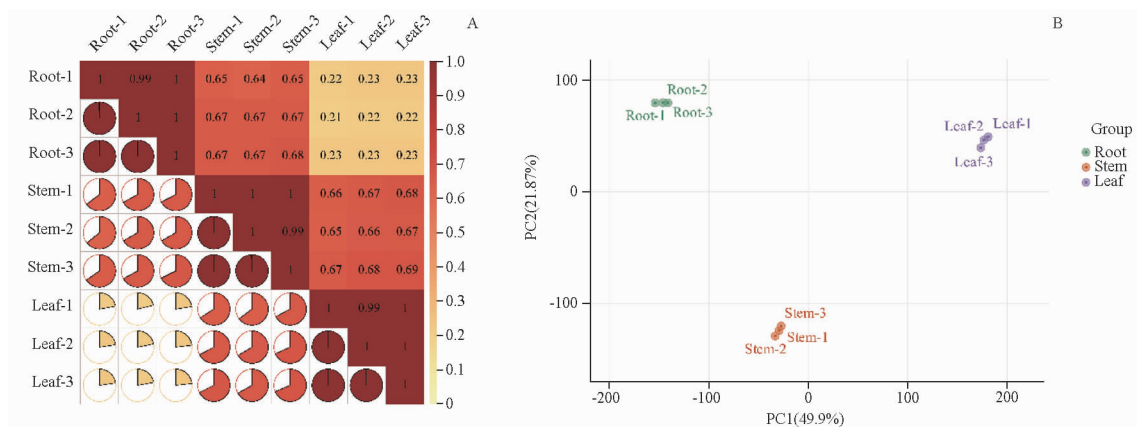
Tab. 2 Raw data from full-length transcriptome sequencing of *Cynanchum otophyllum*.

Statistics	Bases /Gb	Number	Average length/bp	N50
Polymerase reads	74.69	825 528	90 150	148 641
Subreads	72.11	34 592 446	2 085	2 531
Circular consensus sequence	1.60	662 413	2 418	2 722
Full-length non-chimeric	1.31	551 917	2 383	2 687
Consensus transcript	0.13	53 814	2 366	2 658
Isoforms	0.10	42 913	2 358	2 658

青阳参不同样本间的皮尔逊相关分析和主成分分析见图 3,样本相关热图显示,各生物学重复之间

具有高度相关性,主成分分析显示,9个样本被有效分为3个组别,与皮尔逊相关分析的结果一致。相同组织部位的3个生物学重复样本间的聚类显著高

于不同组织部位间的样本,证实了相同组织部位样本生物重复间的相关性和不同组织部位样本之间存在差异性。



PC1 - 第一主成分; PC2 - 第二主成分; 百分比表示该主成分对数据集的解释率; 图中的每个点表示一个样品; 同一个组的样品使用同一种颜色表示。  
PC1 - the first principal component; PC2 - the second principal component; the percentages indicate the interpretation rate of each principal component in the dataset; Each point in the plot represents a sample; Samples from the same group are represents by the same color.

图3 青阳参不同组织部位9个转录本的相关性分析(A)与PCA(B)

Fig. 3 Correlation analysis (A) and PCA (B) of nine transcriptomes from different tissue sites of *Cynanchum otophyllum*.

### 3.2 基因功能注释

将最终比对后获得的序列与KEGG、Nr、SwissProt、TrEMBL、KOG、GO和Pfam七大公共数据库进行比对。结果显示,有42 277(98.52%)条基因序列被七大数据库中的任意一个数据库注释,其中38 036(88.64%)条序列被注释到了Pfam数据库(表3)。

表3 青阳参七大公共数据库注释结果

Tab. 3 Seven public databases annotation results of *Cynanchum otophyllum*.

Databases	Numbers	Proportion/%
KEGG	34 956	81.46
Nr	42 038	97.96
SwissProt	34 901	81.33
TrEMBL	41 877	97.59
KOG	28 633	66.72
GO	38 585	89.91
Pfam	38 036	88.64
Annotated in at least one Database	42 277	98.52
Total	42 913	100

3.2.1 NCBI 非冗余蛋白数据库(Nr)注释 有42 038条序列被注释到Nr数据库,占97.96%,是七大数据库中注释最多的一个数据库(表3)。结果显示(图4A),青阳参与夹竹桃科长春花属(*Catharanthus G. Don*)长春花(*Catharanthus roseus*)的相似序列匹配度最高,共有29 567条序列比对到长春花,

占比70.33%,表明在已公布基因数据库的植物中,青阳参与长春花的同源关系最近。

3.2.2 基因本体论(GO)功能分类 将序列进一步比对到GO数据库中,有38 585条序列获得注释,主要分为生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组成(cellular component, CC)3个大类。在生物过程中,有28 244条序列聚集于细胞过程(cellular process),23 757条序列聚集于代谢过程(metabolic process);在分子功能中,有19 480条序列具有催化活性(catalytic activity),24 229条序列具有结合(binding)功能;而在细胞组成中,有33 825条序列聚集于细胞解剖实体(cellular anatomical entity),7 128条序列聚集于含蛋白复合物(protein containing complex)。

3.2.3 通过KEGG分析鉴定C<sub>21</sub>甙体类生物合成通路相关基因 青阳参转录组中分别有34 956条序列被注释到了KEGG数据库中,涉及147条通路,主要包括5个大的类别,且以新陈代谢(metabolism)为主。其中,萜类化合物骨架生物合成(skeleton biosynthesis of terpenoids)、类固醇生物合成(steroid biosynthesis)、倍半萜和三萜的生物合成(sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis)是C<sub>21</sub>甙体类生物合成的主要3条代谢途径,且以萜类化合物骨架生物合成和类固醇生物合成为主。通过对

注释到的相关 KEGG 通路进行整理后发现(图 4B),青阳参中有 269 条序列注释到了上述的 3 条通路,且从注释到的基因数量来看,主要为萜类化合物骨架生物合成和类固醇生物合成。其中有 117 条

序列注释到了萜类化合物骨架生物合成途径,有 30 条序列注释到了倍半萜和三萜的生物合成途径,还有 122 条基因序列注释到了类固醇生物合成途径(图 4B)。

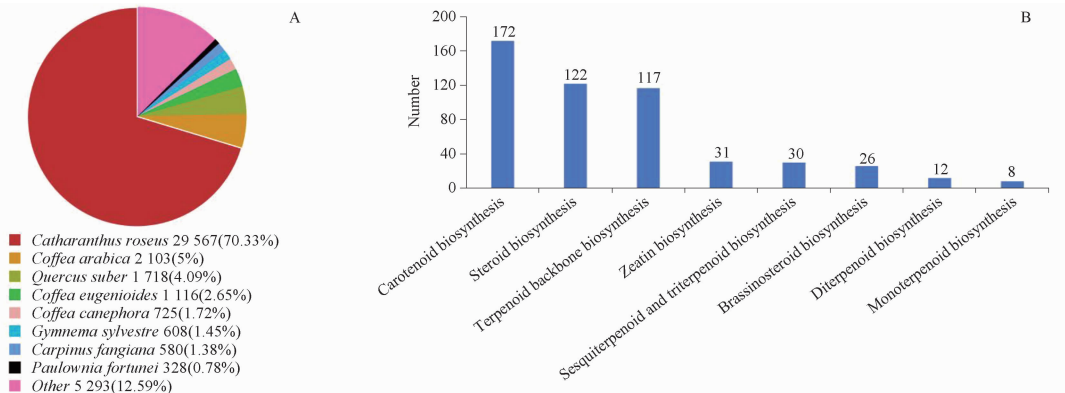


图 4 青阳参同源序列物种比对(A)和青阳参中基因序列的 KEGG 注释(B)

Fig. 4 Species distribution annotated in the NR database for *Cynanchum otophyllum* (A) and KEGG annotation of gene sequences in *Cynanchum otophyllum* (B)

### 3.3 差异表达基因分析

对青阳参各比较组间上下调相关的差异表达基因进行了数量统计分析,结果见图 5A。在 3 个比较组中,根和叶比较组的差异表达基因数量最多,表明根和叶的差异较大,有 19 217 条基因序列存在显著差异,其中有 11 835 条基因序列在根中的表达量较低,7 382 条基因序列在根中的表达量较高。在叶和茎比较组中,有 12 480 条基因序列存在显著差异,其中有 4 603 条基因序列在叶中的表达量低,7 877 条基因序列在叶中的表达量高。此外,在根和茎比较组的 DEGs 数量最少,且与叶

和茎(Stem vs leaf)比较组的 DEGs 数量接近,其中有 10 121 条基因存在显著差异,且有 6 251 条基因在根中的表达量较低,有 3 870 条基因在根中的表达量较高。

使用韦恩图对上述 3 个比较组的 DEGs 进行了分析,在根和叶比较组中,鉴定出了 3 793 条特有的 DEGs,在叶和茎比较组中,鉴定出了 1 127 条特有的 DEGs,在根和茎比较组中,鉴定出了 1 253 条特有的 DEGs。此外,有 3 377 条基因序列的表达水平在 3 个比较组中均存在显著差异,是其共有的 DEGs。见图 5B。

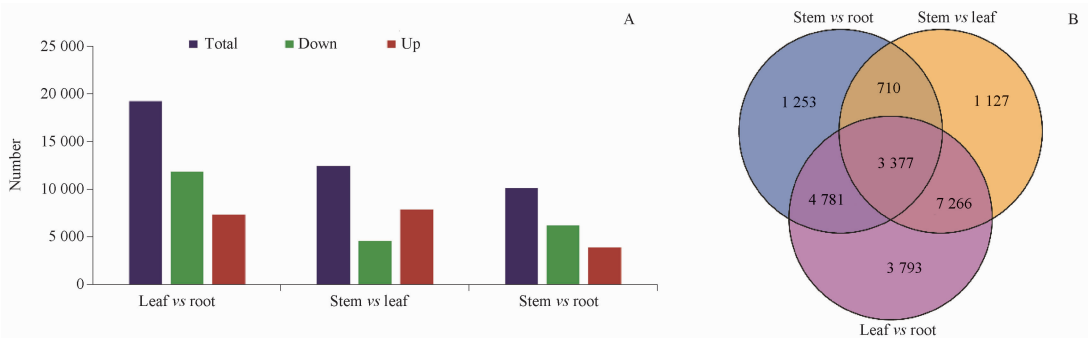


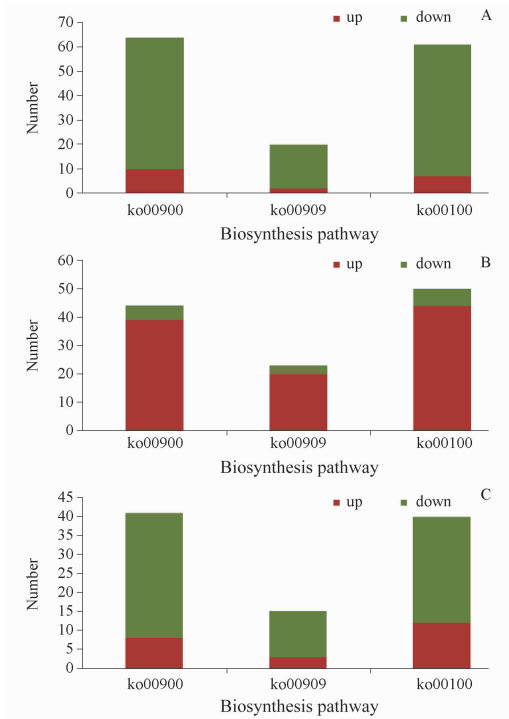
图 5 青阳参不同组织部位差异表达基因的分布图(A)和韦恩图(B)

Fig. 5 Distribution of differentially expressed genes in different tissues of *Cynanchum otophyllum* (A) and Venn diagram (B)

利用 KEGG 数据库对 DEGs 的生物学功能进行注释后发现,在根和叶比较组中,有 145 条 DEGs 注释到了 C<sub>21</sub> 甾体类相关生物合成途径,其中有 64 条 DEGs 注释到了萜类化合物骨架生物合成,有 20 条

DEGs 注释到了倍半萜和三萜生物合成,还有 61 条 DEGs 注释到了类固醇生物合成,且在根和叶比较组中,共有 19 条 DEGs 在根中上调(图 6)。在叶和茎比较组中,有 117 条 DEGs 涉及 C<sub>21</sub> 甾体类相关生

物合成途径, 分别有 44、23 和 50 条 DEGs 注释到了萜类化合物骨架生物合成、倍半萜和三萜生物合成以及类固醇生物合成, 且在叶和茎比较组中, 共有 103 条 DEGs 在叶中上调(图 6)。在根和茎比较组中, 有 96 条 DEGs 涉及 C<sub>21</sub> 甾体类生物合成, 分别有 41、15、40 条 DEGs 注释到了萜类化合物骨架生物合成、倍半萜和三萜生物合成以及类固醇生物合成, 且在根和茎比较组中, 共有 23 条 DEGs 在根中上调(图 6)。



A - 根和叶比较组; B - 叶和茎比较组; C - 根和茎比较组; 红色 - 上调; 绿色 - 下调。

A - leaf vs root group; B - stem vs leaf group; C - stem vs root group; Red - up-regulation; Green - down-regulation.

图 6 青阳参不同比较组中 C<sub>21</sub> 甾体类生物合成途径中差异表达基因的数量

Fig. 6 Number of differentially expressed genes in the C<sub>21</sub> steroids biosynthesis pathway among different comparison groups of *Cynanchum otophyllum*

### 3.4 生物合成途径中编码关键酶的基因分析

在青阳参的整个 C<sub>21</sub> 甾体类的相关合成通路中共筛选出了 87 条相关的 DEGs, 编码 18 个代谢酶, 其中有 43 条是在萜类化合物骨架合成途径中筛选出的 DEGs, 涉及 11 个代谢酶, 有 44 条是在类固醇生物合成途径中的筛选出的 DEGs, 涉及 7 个代谢酶(表 4)。分析发现, 在 MVA 途径中, 编码 AACT、HMGR、MVD 以及 IPPI 酶的 DEGs 分别有

2、8、2 和 2 条。而在 MEP 途径中, 编码 DXS、DXR、MCT、MDS、HDS 以及 HDR 酶的 DEGs 分别有 4、2、1、2、6 和 7 条。且在 MVA 和 MEP 两条途径的交汇处, 有 7 条 DEGs 编码 FPPS 酶。此外, 青阳参在类固醇生物合成途径中, 分别有 7、4、22、2、2、4 和 3 条 DEGs 编码 SS、SM、CYP51、FK、DWF1、SC5DL 以及 DWF5 酶。

表 4 青阳参中 C<sub>21</sub> 甾体类相关生物合成通路中关键酶编码基因数量

Tab. 4 Number of key enzyme genes in the biosynthesis of C<sub>21</sub> steroid in *Cynanchum otophyllum*

Enzyme (abbreviation)	EC number	Number
Acetoacetyl-CoA transferase (AACT)	2.3.1.9	2
3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR)	1.1.1.34	8
Mevalonate diphosphate decarboxylase (MVD)	4.1.1.33	2
1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS)	2.2.1.7	4
1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR)	1.1.1.267	2
2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase (MCT)	2.7.7.60	1
2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (MDS)	4.6.1.12	2
4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (HDS)	1.17.7.1	6
4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (HDR)	1.17.7.4	7
Isopentenyl-diphosphate isomerase (IPPI)	5.3.3.2	2
Farnesyl diphosphate synthase (FPPS)	2.5.1.10	7
Squalene synthase (SS)	2.5.1.21	7
Squalene monooxygenase (SM)	1.14.14.17	4
Sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51)	1.14.15.36	22
$\delta$ 14-Sterol reductase (FK)	1.3.1.70	2
$\delta$ 24-Sterol reductase (DWF1)	1.3.1.72	2
$\delta$ 7-Sterol 5-desaturase (SC5DL)	1.14.19.20	4
7-Dehydrocholesterol reductase (DWF5)	1.3.1.21	3

上述各代谢酶的编码基因在青阳参 3 个组织部位的相对表达水平以聚类热图的形式展现(图 7), 从总体上看, 编码代谢酶的 DEGs 的相对表达量在叶中比较高。且通过差异代谢物与差异表达基因的关联分析发现, 在青阳参中有 37 个 DEGs 与青阳参苷元相关联, 其中正相关和负相关的 DEGs 分别有 10 和 27 个(图 8)。其中编码 AACT、MVD、IPPI、FK 和 DWF1 的 DEGs 分别有 2、1、1、1 和 2 个, 且都与青阳参苷元呈正相关, 编码 SS、SM、DXS、DXR、MDS、HDR、GCPE 和 SC5DL 的 DEGs 分别有 2、1、2、2、1、4、2 和 2 个, 且均是与青阳参苷元呈负相关。而编码 FPPS 和 CYP51 的 DEGs 分别有 4 和 10 个, 其中编码 FPPS 的 DEGs 中有 2 个与青阳参苷元呈正相关, 2 个与之呈负相关, 编码 CYP51 的 DEGs 中有 1 个与青阳参苷元呈正相关, 另外 9 个与之呈负相关。

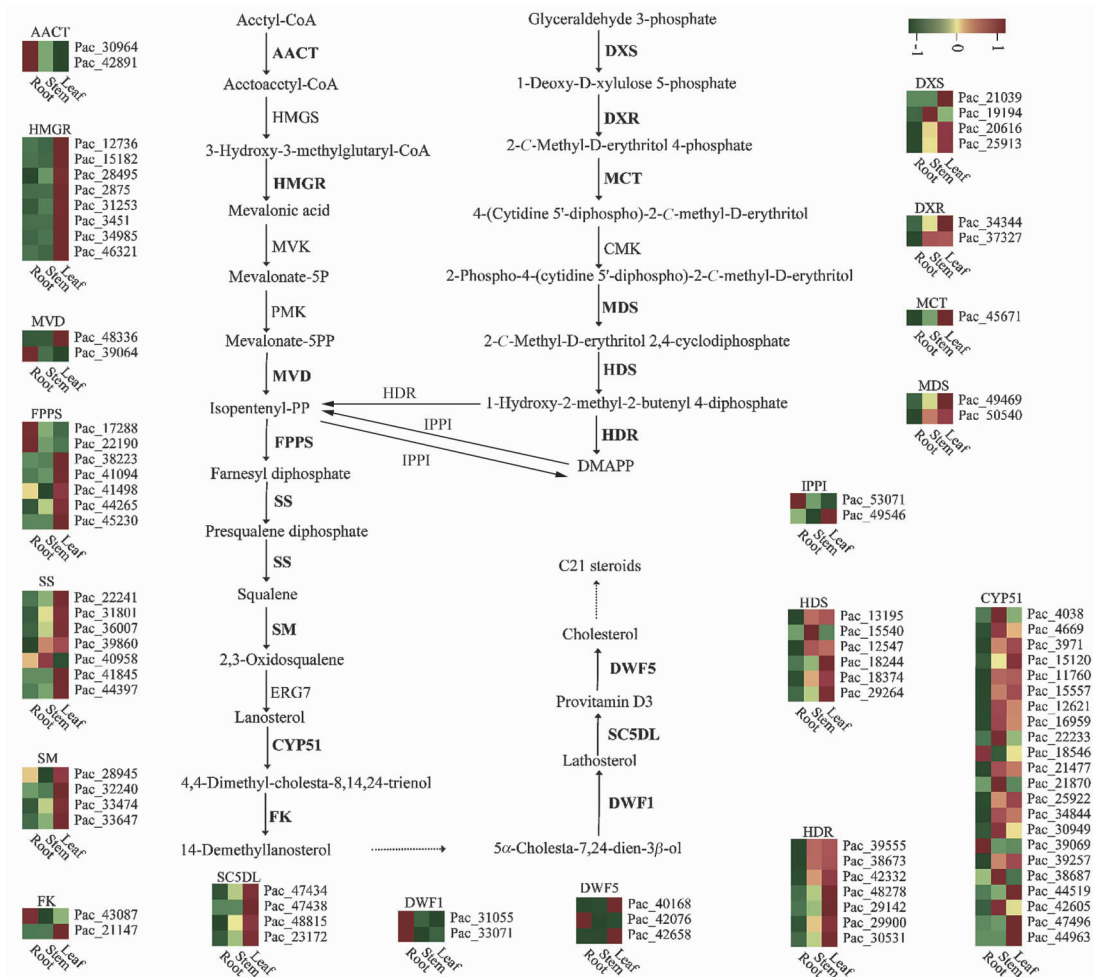
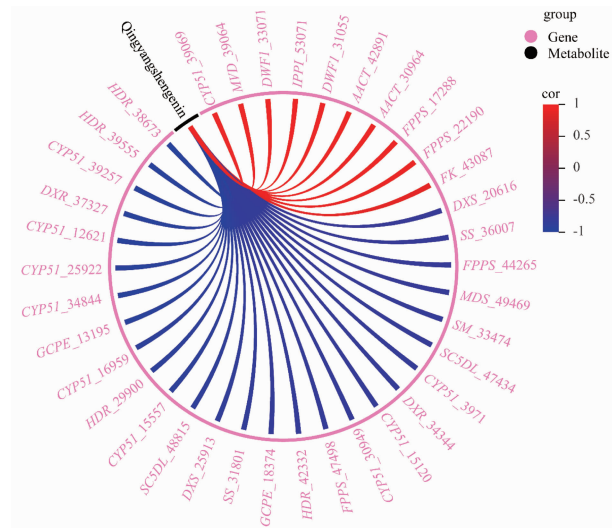


图7 青阳参 C<sub>21</sub>甾体类物质生物合成途径

Fig. 7 Proposed pathways for C<sub>21</sub> steroidal biosynthesis in *Cynanchum otophyllum*



红色 - 正相关; 蓝色 - 负相关。

Red - positive correlation; While blue - negative correlation.

图8 青阳参基因与代谢物的相关性

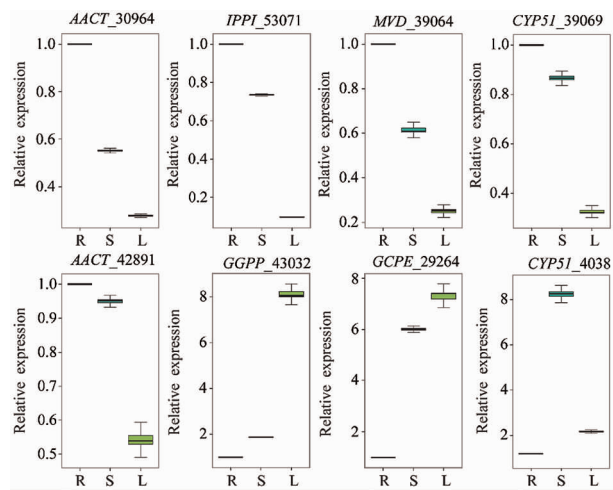
Fig. 8 Correlation between genes and metabolites in *Cynanchum otophyllum*

#### 4 qRT-PCR 结果

qRT-PCR 实验结果显示(图9),在挑选出的8条 DEGs 中,其中有5条基因序列能与代谢物青阳参苷元关联上,且都为正相关基因,分别为 *AACT* -42891、*AACT* -30964、*MVD* -39064、*IPPI* -53071 和 *CYP51* -39069 基因,且它们均在根中的表达量较高。而 *GGPP* -43032 和 *GCPE* -29264 基因在叶中的表达量较高,*CYP51* -4038 基因在茎中的表达量较高。上述8条基因的表达趋势均与对应转录组组的 FPKM 值结果一致,说明该转录组学数据的基因表达定量较为准确,筛选出的关键酶基因可供后续实验使用。

#### 5 讨论

青阳参作为云南省重要天然药物之一,其药用历史虽较为悠久,但除了化学成分和药理作用之外,我们对其知之甚少,其遗传资料甚为匮乏,对青阳参药效成分生物合成途径相关功能基因挖掘的研究也未见报道<sup>[2,27]</sup>。为了增加青阳参的遗传资料并解析



R - 根; S - 茎; L - 叶。

R - root; S - stem; L - leaf.

图9 8个基因在青阳参不同组织部位中的相对表达量

Fig. 9 The relative expression levels of 8 genes in different tissue parts of *Cynanchum otophyllum*

其药效成分合成途径,本研究首次通过高通量测序技术获得了青阳参的转录组数据,对其进行注释、差异基因分析并挖掘了 $C_{21}$ 甾体类相关生物合成途径的代谢酶基因。通过对青阳参的转录本进行注释后发现,其注释到Nr数据库的序列最多的,且在已公布的植物中,青阳参与长春花的同源关系最近。青阳参中有34 956条基因序列注释到了KEGG数据库,涉及147条通路,以新陈代谢为主。其中有269条基因序列注释到了甾体皂苷类化合物生物合成途径中的萜类化合物骨架合成、倍半萜和三萜生物合成以及类固醇类化合物合成这3条通路上。通过对上述3条通路的DEGs进一步分析,从中筛选出了87条与 $C_{21}$ 甾体类生物合成相关的DEGs,共编码18个相关的代谢酶。

$C_{21}$ 甾体皂苷类化合物是青阳参的主要活性成分,是一类甾体衍生物,具有多种生物活性<sup>[15, 28]</sup>,常作为甾体药物的前体在临床上广泛应用<sup>[17-18]</sup>。甾体皂苷类化合物的生物合成途径主要有MVA和MEP两条途径<sup>[19]</sup>,青阳参中的 $C_{21}$ 甾体皂苷类是甾体衍生物,其骨架合成也主要通过MVA和MEP两条途径合成<sup>[18]</sup>。MVA途径的起始物质是乙酰辅酶A,经AACT等酶催化形成3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA),HMG-CoA被HMG-CoA还原酶(HMGR)催化,转化为甲羟戊二酸(MVA),MVA经MVD、FPPS、SS、SM、CYP51、FK等一系列酶的催化作用生成14-去甲基鲨烯醇(14-Demethyllanosterol),再通过后续的酶催化反应

和修饰,形成 $C_{21}$ 甾体类化合物<sup>[29]</sup>。MEP途径是由8个酶连续反应来合成异戊烯基二磷酸(IPP)和二甲烯丙基二磷酸(DMAPP),第一个反应是由脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)催化丙酮酸和甘油醛-3-磷酸生成1-脱氧木酮糖-5-磷酸(DXP),也是第一个限速步骤,后续再在DXR、MCT、MDS、HDS等酶催化下合成IPP和DMAPP,最终经过一系列的酶催化反应,形成类固醇类化合物和 $C_{21}$ 甾体类化合物<sup>[30]</sup>。

本研究发现青阳参的重要成分青阳参苷元主要在根中积累,在 $C_{21}$ 甾体皂苷类化合物生物合成途径中与青阳参苷元呈正相关的基因中,编码AACT和DWF1酶的基因也在根中高表达,二者应对青阳参苷元合成具有重要的调控作用。AACT属于II型硫解酶家族,是MVA途径中的第一个关键酶<sup>[31]</sup>,具有重要研究价值,目前已有学者对滇龙胆、茅苍术、垂序商陆等药用植物中AACT基因进行了克隆与表达分析<sup>[32-34]</sup>。有研究发现AACT基因在滇龙胆的茎和根中高表达<sup>[33]</sup>,这与本研究中AACT基因在青阳参根中表达量高的结果相一致,可以看出,AACT酶作为MVA途径中的六大重要酶之一<sup>[35]</sup>,对该途径下游青阳参苷元的合成确实具有重要调控作用。DWF1是一种双功能蛋白,既可以催化 $\Delta^{24}$ 异构化反应以及随后进行的 $\Delta^{24(25)}$ 还原反应,又在将24-亚甲基胆甾醇(24-methylene-cholesterol)转化为菜油甾醇(campesterol)以及将异岩藻甾醇转化为谷甾醇(sitosterol)的过程中发挥着重要作用<sup>[36]</sup>。对睡茄(*Withania somnifera*)DWF1的研究表明,DWF1与植物甾醇合成呈正相关关系<sup>[37]</sup>。本研究首次发现了DWF1酶与青阳参苷元呈正相关,其应对青阳参苷元的合成具有重要调控作用,将来可对该酶在青阳参药效成分合成过程中的功能给予进一步研究。FPPS是植物萜类化合物合成的一个关键酶,可催化形成法尼基焦磷酸(FPP),FPP是植物体内多条代谢途径的重要中间产物<sup>[38]</sup>。青阳参苷元的合成通路上游共用萜类化合物合成通路,因此,FPPS对青阳参苷元的合成具有重要影响。CYP51作为生物甾醇合成过程中的关键酶<sup>[39]</sup>,也是青阳参苷元合成途径中的关键基因。除此之外,在与青阳参苷元正相关的基因中,MVD、IPPI以及FK基因也应对青阳参苷元的合成具有重要的影响,但目前对其研究较少,将来可在青阳参的药效成分合成研究中给予进一步关注。对于通路上与 $C_{21}$ 甾体皂苷类合成相关

的其他差异显著基因中, HMGR 是 MVA 途径中的限速酶,在不同的物种中有不同的表达模式,编码 HMGR 的基因在青阳参叶中高表达,其在滇龙胆叶中的表达量也最高,本研究结果与之一致<sup>[40]</sup>。DXS 是 MEP 途径中的第一个限速酶,DXS 基因在青阳参茎、叶中高表达,DXS 在滇龙胆中叶中的表达远高于根,本研究结果与 DXS 基因在滇龙胆中的表达模式较为一致<sup>[41]</sup>。本研究筛选出的负相关基因 DXS、DXR、MDS、HDR 是 MEP 途径中的重要酶基因<sup>[35]</sup>,应与植物甾体皂苷以 MVA 途径为主相关<sup>[19]</sup>。以上基因均为本次研究首次发现与青阳参成分合成相关的基因,过去的研究表明它们是甾体类生物合成过程相关的酶,但其在青阳参苷元合成过程中的具体功能还有待于进一步研究。

综上,本研究通过对青阳参的转录组数据进行了分析及 DEGs 的注释分析,筛选出了与 C<sub>21</sub>甾体类生物合成相关的代谢酶,并对其通路进行了简单解析。分析发现,注释得到的关键酶主要是上游通路相关的酶,这与目前关于 C<sub>21</sub>甾体类的相关生物合成研究较为缺乏有关。就甾体皂苷而言,下游具体途径和涉及的基因功能验证相关研究也较少,下游生物合成途径还有待阐明<sup>[42]</sup>。所以,还需深入研究其下游途径,但在此之前,对其上游相关途径进行更多解析也将为未来的研究提供数据支持和奠定理论基础。

## REFERENCES

- [ 1 ] Editorial Committee of Flora of China. *Flora of China* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1977: 377.
- [ 2 ] ZHU Z Y. *Yunnan Important Natural Medicine* (云南重要天然药物) [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2006: 246-252.
- [ 3 ] LI W L, HE J, HE J, et al. Determination of the dissolution of Qingyangshen Dispersible Tablets[J]. *J China Pharm* (中国药房), 2009, 20(15): 1153-1155.
- [ 4 ] QIAN X C, YANG C, QI S J, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of Qingyangshen [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2022, 44(5): 1553-1562.
- [ 5 ] HE Z Y, LI Y, XIANG C, et al. Antiepileptic Efficacy of Qingyangshen Saponins Based on Semicompartment Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model[J]. *J Kunming Univ Sci Technol (Nat Sci)* (昆明理工大学学报 自然科学版), 2023, 48(1): 131-141.
- [ 6 ] LONG X, DAI F C, XIAO X H, et al. Research on otophyllum glycosides right brain damage seizures neuroprotective role[J]. *Jilin Med J* (吉林医学), 2014, 35(19): 4135-4137.
- [ 7 ] ZHANG M, GAO B, LI Y H, et al. Effects of Qingyangshen Glycosides on Depression in Social Defeat Stress Model of Rats [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族民间医药), 2018, 27(15): 17-20.
- [ 8 ] YU C Y, LI N, ZHANG J J. Effect of Qingyangshen glycosides on Depression in Chronic Unpredictable Mild Stress Rats[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2015, 21(13): 87-90.
- [ 9 ] LI X S, YANG X M, DING W J, et al. New C<sub>21</sub>-steroidal aglycones from the roots of *Cynanchum otophyllum* and their anticancer activity[J]. *Fitorapia*, 2021, 149:104833.
- [ 10 ] DONG, JINRUN, PENG, et al. C<sub>21</sub> steroidal glycosides with cytotoxic activities from *Cynanchum otophyllum* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(9): 1520-1524.
- [ 11 ] TAO J, YANG J, CHEN C Y, et al. Study on anti-HIV activity and mechanism of Qingyangshen glucan sulfate *in vitro*[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36(18): 2548-2551.
- [ 12 ] ZHAN Z J, BAO S M, ZHANG Y, et al. New Immunomodulating Polyhydroxypregnane Glycosides from the Roots of *Cynanchum otophyllum* C. K. Schneid[J]. *Chem Biodivers*, 2019, 16(6): e1900062.
- [ 13 ] SUN S K, TIAN H S, LI X P. Mechanism of Qingyangshen glycosides (QYS) treating on liver injury in mice[J]. *Ningxia Med J* (宁夏医学杂志), 2010, 32(2): 120-122, 195.
- [ 14 ] ZHOU J K, LV J, ZHOU P. On the study of chemical constituents and pharmacological activities form of *Cynanchum otophyllum* Schneid. [J]. *J Guizhou Educ Univ* (贵州师范学院学报), 2010, 26(12): 23-26.
- [ 15 ] ZAN K, GUO L N, ZHENG J, et al. Chemical constituents of ethnic medicine *Cynanchum otophyllum*[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2016, 41(1): 101-105.
- [ 16 ] LI L Y, YIN Z Q, ZHANG Q W, et al. Research progression the Yunnan's folk medicine: *Cynanchum otophyllum* [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2011, 23(4): 1-5.
- [ 17 ] KUANG H X, SHI R B, DONG X P, et al. *Chemistry of Chinese medicine* (中药化学) [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 2011: 287-288.
- [ 18 ] FERNÁNDEZ-CABEZÁN L, GALÁN B, GARCÍA J L. New insights on steroid biotechnology[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 958.
- [ 19 ] ZHANG X, WANG X F, ZHAO R H, et al. Biosynthesis of Steroidal Saponins in Herbs[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2020, 26(14): 225-234.
- [ 20 ] ZHANG G J, MIAO J, GUO L Y, et al. Application of multi-omics combination in mechanism studies of traditional Chinese medicine[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52(10): 3112-3120.
- [ 21 ] FRAGA C G, CLOWERS B H, MOORE R J, et al. Signature-discovery approach for sample matching of a nerve-agent precursor using liquid chromatography-mass spectrometry, XCMS, and chemometrics[J]. *Anal Chem*, 2010, 82(10): 4165-4173.
- [ 22 ] BUCHFINK B, XIE C, HUSON D H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. *Nat Methods*, 2015, 12(1): 59-60.
- [ 23 ] LI B, DEWEY C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 323.

- [24] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with bowtie 2:4[J]. *Nat Methods*, 2012, 9(4): 357-359.
- [25] VARET H, BRILLET-GUÉGUEN L, COPPÉE J Y, *et al.* SAR-Tools: a deseq2-and edger-based rpipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq data[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157022.
- [26] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2: 12[J]. *Genome Biol*, 2014, 15(12):550.
- [27] GENG Y M, ZHOU X Q, ZHANG T C, *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of chloroplast genome of *Cynanchum wallichii* and *Cynanchum otophyllum*[J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59(3): 764-774.
- [28] CHEN G, LI Z F, ZHANG Q H, *et al.* C<sub>21</sub> steroidal glycosides from *Cynanchum wallichii* Wight[J]. *Chin J Med Chem (中国药物化学杂志)*, 2009, 19(2): 140-143.
- [29] XU Z X, LI M J, MEN X, *et al.* Progress in metabolic pathway bypass regulation strategies of the mevalonate pathway[J]. *Bioprocess (生物加工过程)*, 2020, 18(1): 44-51.
- [30] ZHANG S T, CHEN H L, CUI H, *et al.* Metabolic regulation mechanisms of MEP pathway in plant[J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin (西北植物学报)*, 2012, 32(7): 1500-1504.
- [31] DYER J H, MAINA A, GOMEZ I D, *et al.* Cloning, expression and purification of an acetoacetyl coa thiolase from sunflower cotyledon[J]. *Int J Biol Sci*, 2009, 5(7): 736-744.
- [32] LIU Y L, ZHU Y H, SHENG Z W, *et al.* Cloning and expression analysis of PaAACT gene from *Phytolacca americana* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2019, 25(21): 124-131.
- [33] ZHANG X D, LI C X, WANG L C, *et al.* Cloning and expression analysis of acetyl-CoA transferase gene from *Gentiana rigescens*[J]. *Jiangsu Agric Sci (江苏农业科学)*, 2016, 44(6): 94-98.
- [34] CHEN L, CHEN L N, WANG M, *et al.* Cloning and sequence analysis of acetyl-CoA acetyltransferase gene (*AACT*) from *Attractylodes lancea*[J]. *Chin Med Mater (中药材)*, 2021, 44(3): 574-579.
- [35] LIAO P, HEMMERLIN A, BACH T J, *et al.* The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production[J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(5): 697-713.
- [36] KLAHRE U, NOGUCHI T, FUJIOKA S, *et al.* The Arabidopsis *DIMINUTO/DWARF1* gene encodes a protein involved in steroid synthesis[J]. *Plant Cell*, 1998, 10(10): 1677-1690.
- [37] RAZDAN S, BHAT W W, DHAR N, *et al.* Molecular characterization of *DWF1* from *Withania somnifera* (L.) Dunal; its implications in withanolide biosynthesis[J]. *J Plant Biochem Biotechnol*, 2017, 26(1): 52-63.
- [38] LI Q. Research on the *FPPS* gene cloning and increasing the content of medicinal component in *Alismatis Rhizoma* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2014.
- [39] LIU X, DU H X, ZUO N, *et al.* Identification of obtusifoliol 14 $\alpha$ -demethylase gene *TaCYP51H6d* from wheat and its response to propionazole treatment[J]. *Plant Physiol J(植物生理学报)*, 2021, 57(10): 2033-2042.
- [40] XU Y Y, SUN Y Y, XU R, *et al.* Cloning and analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase *PpHMGR* gene in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. [J]. *Mol Plant Breed (分子植物育种)*, 2019, 17(14): 4610-4616.
- [41] ZHANG H C, LI C X, WANG Y Z, *et al.* Cloning and expression analysis of gene encoding 1-deoxy-dxylulose 5-phosphate synthase in *Gentiana rigescens*[J]. *Biotechnol Bull (生物技术通报)*, 2016, 32(4): 128-136.
- [42] YIN Y, GUAN H Y, ZHANG X N. Review on Enzymes and Genes Related to the Biosynthesis of Steroidal Saponins[J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2016, 28(8): 1332-1336.

(收稿日期:2024-06-26)