

• 药材与资源 •

基于比较转录组的夏枯草组织差异表达分析

朱昀昊^{1,2}, 张梦佳¹, 李璐¹, 赵乐^{1,2}, 董诚明^{1,2*}

1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

2. 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 河南 郑州 450046

摘要:目的 分析夏枯草 *Prunella vulgaris* 果穗、茎、叶片转录组, 挖掘夏枯草次生代谢产物生物合成的功能及调节基因。方法 利用 Illumina 高通量测序技术对夏枯草不同组织进行转录组测序, 并从差异表达的基因中鉴定次生代谢物生物合成的相关酶基因。结果 在夏枯草的 3 个不同组织的转录本中, 共有 8 270 个 Unigenes 在至少 2 个样品间差异显著。对不同组织差异表达的基因进行 KEGG 富集分析, 结果表明, 不同组织中萜类生物合成的基因表达均有较大的变化。在夏枯草差异基因中分别搜索三萜类和酚酸类生物合成途径的关键酶, 共鉴定到 31 个三萜类生物合成相关的 Unigene, 16 个酚酸类生物合成相关的 Unigenes, 113 个 P450 相关的 Unigenes。结论 本研究为后续发掘夏枯草次生代谢物合成途径相关功能基因提供依据, 也为夏枯草次生代谢物的生物合成调控研究奠定基础。

关键词: 转录组; 夏枯草; 表达分析; Unigenes; P450; 果穗; 茎; 叶片

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)13-3523-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.13.021

Comparative transcriptome analysis of differential expression in different tissues of *Prunella vulgaris*ZHU Yun-hao^{1,2}, Zhang Meng-jia¹, LI Lu¹, ZHAO Le^{1,2}, DONG Cheng-ming^{1,2}

1. School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To compare and analyze the transcriptome of ears, leaves and stems of *Prunella vulgaris*, and excavate the key enzyme genes related to the secondary metabolism biosynthesis of *P. vulgaris*. **Methods** The transcriptome of ears, leaves and stems of *P. vulgaris* were sequenced by Illumina high-throughput sequencing technology. Additionally biosynthesis related enzyme gene of secondary metabolism were identified from differentially expressed genes. **Results** In the transcripts of three different tissues of *P. vulgaris*, a total of 8 270 Unigenes differed significantly between at least two tissues. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis of genes differentially expressed in different tissues showed that the expression of phenylpropanoid biosynthesis genes varied greatly. A total of 31 triterpenoid biosynthesis-related Unigenes, 16 phenolic acid biosynthesis-related Unigenes, and 113 P450s-related Unigenes were identified in the differentially expressed genes. **Conclusion** This study provides a basis for the subsequent discovery of functional genes related to the secondary metabolism synthesis pathway of *P. vulgaris*, and plays a foundation for the regulation of secondary metabolism biosynthesis of *P. vulgaris*.

Key words: transcriptome; *Prunella vulgaris* L.; expression analysis; Unigenes; P450; ears; leaves; stems

夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 为唇形科夏枯草属多年生草本植物, 是一种传统而常用的中药, 其干燥果穗常作为凉茶配料, 有清热泻火、明目、散结消肿的功效。夏枯草中含多种三萜类及酚酸类等次

生代谢产物, 如熊果酸、齐墩果酸等五环三萜, 咖啡酸及迷迭香酸等, 具有镇静、抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗炎及抗病毒等多种生物学效应, 被广泛用于医药和化妆品等行业^[1]。目前夏枯草的化学、

收稿日期: 2020-01-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(81603232); 国家重点研发计划(2017YFC1702800); 河南省重大科技专项(171100310500); 河南中医药大学博士科研基金(BSJJ2015-13)

作者简介: 朱昀昊(1986—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为药用植物分子生物学。E-mail: guxinhan123@163.com

*通信作者 董诚明, 男, 教授, 学士, 研究方向为中药材规范化种植。E-mail: dcm371@sohu.com

药理学研究已有较多报道^[1-2], 学者也从种质资源评价^[3]、种子质量标准^[4]、栽培技术^[5-7]等多方面解决了夏枯草规范化种植中出现的问题, 但夏枯草分子生物学方面的研究进展也较为缓慢, 针对夏枯草转录组的研究数据相对比较缺乏, 尤其是对夏枯草活性次生代谢成分分子生物合成相关基因发掘和利用仍鲜有报道^[8], 仅有迷迭香酸生物合成途径中迷迭香酸合成酶^[9]、苯丙氨酸解氨酶^[10]等相关基因被克隆。

转录组具有显著的时空特异性特征。转录组测序技术是近期快速发展起来的用于研究功能基因组学的转录组分析技术^[11-12]。通过建立药用植物多种不同器官的转录组数据库, 可为药用植物种质资源评价、分子标记开发、次生代谢产物的生物合成调控等领域提供分子基础^[13]。随着转录组测序技术的飞速发展和测序成本的大幅下降, 越来越多的药用植物完成了转录组相关研究, 极大地丰富了药用植物的分子生物学基础^[14-15]。《中国药典》2015 年版规定, 夏枯草以干燥果穗入药, 而古代医药学家常以带穗全草入药^[16], 而带穗全草不仅包含了药典规定的果穗, 还包括了茎和叶片。现代化学分析表明, 夏枯草不同部位中次生代谢产物积累的类型和产量均有所差异^[17], 而其化学成分的差异是由基因决定的, 尤其是次生代谢相关基因的表达。因此, 通过分析次生代谢产物含量不同的夏枯草不同叶片、果穗和茎, 将有利于从差异表达基因中寻找与次生代谢产物生物合成密切相关的酶基因, 也为夏枯草次生代谢物的生物合成调控研究奠定基础。

1 材料与仪器

夏枯草种子采自河南省确山县夏枯草 GAP 种植基地。将种子种植于河南中医药大学中药植物园中, 经河南中医药大学董诚明教授鉴定为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L.。生长至 20 cm 时随机采集生长状态一致的新鲜夏枯草, 将样品分为叶片、果穗和茎, 用水清洗干净后, 滤纸吸干水分, 一部分置 60 °C 烘箱中, 干燥至恒定质量, 粉碎过 4 号筛, 装入自封袋中, 放干燥器中保存供含量测定使用; 另一部分置液氮中速冻后, 放 -80 °C 超低温冰箱保存供转录组测序使用。

2 方法

2.1 转录组测序

采用植物 RNA 提取试剂盒 (康为世纪生物科技有限公司, 北京) 提取不同组织的总 RNA。使用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集 mRNA, 随后将 mRNA

打断成短片段, 以 mRNA 为模板, 反转录成 cDNA, 构建夏枯草不同组织的 cDNA 文库。文库构建完成后, 使用 HiSeq 2500 高通量测序平台进行测序。采用针对 Trinity 软件进行进行 de novo 组装, 获得单基因簇 (Unigene)。对得到的 Unigene 进行基因功能注释, 基因功能注释使用的数据库有以下 6 个: NR、Swiss-Prot、GO、KOG、COG、KEGG。

2.2 差异表达分析

采用 Bowtie 将夏枯草果穗、叶和茎测序所得的 Reads 与 Unigene 库进行比对, 根据比对结果, 结合 RSEM 软件进行表达量水平估计。利用 FPKM 值表示对应 Unigene 的表达丰度。使用 EBSeq 软件进行差异表达分析, 获得 2 个样品之间的差异表达基因集。在差异表达分析过程中采用 Benjamini-Hochberg 方法对原有假设检验得到的显著性 *P* 值 (*P*-value) 进行校正, 并最终采用校正后得到的 FDR 值作为差异表达基因筛选的关键指标, 以降低对大量基因的表达值进独立的统计假设检验带来的假阳性。在筛选过程中, 将 $FDR < 0.01$ 且差异倍数 ≥ 2 作为筛选标准。

2.3 次生代谢产物测定

夏枯草样品中熊果酸、齐墩果酸含量参考方罗等方法^[18]进行, 以含 1% 甲酸的 75% 乙醇溶液超声提取, 采用等度洗脱, 流动相为乙腈-0.1% 氨水 70 : 30, 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 210 nm。

夏枯草样品中咖啡酸、迷迭香酸含量参考张兰珍等^[19]方法进行, 以含 75% 乙醇溶液超声提取采用梯度洗脱, 流动相为 0.01% 磷酸水溶液-乙腈 82 : 18, 体积流量 1 mL/min, 柱温 20 °C, 检测波长 330 nm。

3 结果与分析

3.1 测序数据与组装结果

经过测序质量控制, 从夏枯草果穗、叶、茎 3 个测序样本中共获得 19.16 Gb Clean Data, 且各样品 Q30 碱基百分比均不小于 92.78%, 说明测序获得的数据质量较高。利用 Trinity 软件对 3 个夏枯草样品的测序数据进行合并组装。将各样品的 Clean Data 与组装得到的转录组库进行序列比对, 能定位到转录组库中的 reads 称为 Mapped Reads。果穗、叶、茎 3 个样本中各有 18 949 065、21 328 376、19 985 528 条 reads 能够匹配到转录组库中, 匹配度均达到 76% 以上, 说明该测序数据 Trinity 组装效果较好, 大多数 reads 均已组装。具体结果见表 1。

表 1 测序数据与组装结果统计分析

Table 1 Summary of transcriptome sequencing data and assembly results

样品名称	Clean Read 数量	总碱基数	GC/%	≥Q30/%	Mapped Reads	Mapped Ratio/%
果穗	24 651 602	6 202 376 510	50.79	92.78	18 949 065	76.87
叶	26 256 420	6 604 827 312	47.04	93.54	21 328 376	81.23
茎	25 244 197	6 352 679 538	47.64	92.91	19 985 528	79.17

3.2 夏枯草转录本的差异表达及注释

差异表达分析寻找到的基因集合叫做差异表达基因集。根据 2 样品之间表达水平的相对高低，差异表达基因可以划分为上调基因和下调基因。上调基因在后者样品中的表达水平高于前者样品中的表达水平；反之为下调基因。在夏枯草的 3 个不同组织的转录本中，共有 8 270 个 Unigenes 显示在至少 2 个样品间差异表达量超过 2 倍。差异表达最为显著的显示为果穗和叶，共有 5 344 个 Unigenes，其中 2 006 个 Unigenes 表达量上调，3 338 个 Unigenes 表达量下调；其次为果穗和茎，共有 4 766 个 Unigenes，其中 2 121 个 Unigenes 表达量上调，2 645 个 Unigenes 表达量下调；在叶和茎中，共有 4 181 个 Unigenes，其中 2 656 个 Unigenes 表达量上调，1 525 个 Unigenes 表达量下调。由差异表达韦恩图图 1-A 可见，分别有 890、1 200 和 734 个 Unigenes 仅在 1 个差异表达基因集中出现，分别有 1 414、992、2 465 个 Unigenes 在 2 个差异表达基因集中出现，共有 575 个 Unigenes 在 3 个差异表达基因集中均出现。细胞色素 P450 (CYP450) 通过氧化反应（如羟基、酮基、羧基和双键等不饱和基团）在三萜母核的不同位置 and 不同数量进行结构修饰，极大地提高了所生成三萜结构的多样性、生物活性。由图 1-B 可知，共有 113 个 CYP450 基因在至少 2 个样品间差异表达量超过 2 倍，其中分别有 7、16、6 个 Unigenes 仅在 1 个差异表达基因集中出现，分别有 19、12、38 个 Unigenes 在 2 个差异表达基因集中出现，共有 15 个 Unigenes 在 3 个差异表达基因集中均出现。

对识别到的差异表达基因进行功能注释，各差

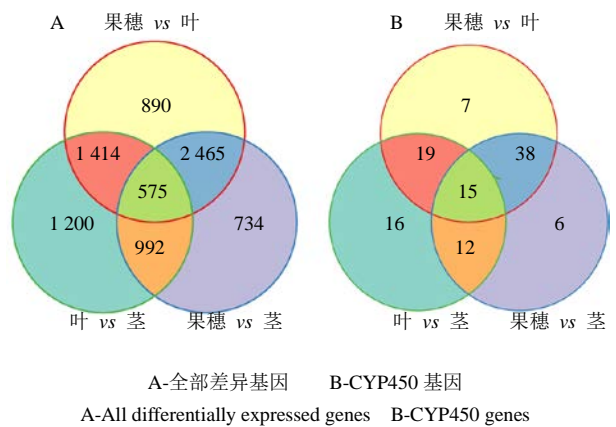


图 1 各差异表达基因集韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of differentially expressed genes

异表达基因集注释到的基因数量统计结果见表 2，在果穗和叶、果穗和茎、叶和茎之间的差异表达基因集中，分别有 4 837 (79.72%)、4 396 (80.10%)、3 771 (80.54%) 个 Unigenes 被 Nr 数据库注释。

3.3 差异表达基因 KEGG 代谢通路富集分析

在生物体内，不同的基因产物相互协调来行使生物学功能，对差异表达基因的代谢通路 (Pathway) 注释分析有助于进一步解读基因的功能。KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库是关于代谢通路的公共数据库。分析差异表达基因在某一通路上是否过表达即为差异表达基因的代谢通路富集分析。利用富集因子 (Enrichment Factor) 分析代谢通路的富集程度，并利用 Fisher 精确检验方法计算富集显著性。

在果穗和叶、果穗和茎的差异表达基因集中，光合天线蛋白和光合作用相关的代谢通路均被显

表 2 夏枯草中差异表达基因功能注释

Table 2 Number of differentially expressed genes with functional annotation in *P. vulgaris*

差异表达基因集名称	COG	GO	KEGG	KOG	Pfam	Swiss-Prot	Nr
果穗 vs 叶	1 641	2 557	900	2 262	3 681	3 857	4 838
果穗 vs 茎	1 456	2 282	842	2 005	3 351	3 521	4 396
叶 vs 茎	1 276	1 917	585	1 739	2 912	3 037	3 771

著富集,且除了光系统 II 中 psbD 基因和参与光合电子传递的 Pet F 基因外,其他基因均呈现出上调趋势,即在果穗中的表达量均低于叶片和茎中,这可能是由于果穗属于繁殖器官,仅花萼部分能够进行光合作用,花冠呈紫色缺乏叶绿素,光合能力较弱,而叶片和茎中均为绿色的营养器官,光合能力较强。在 3 个差异表达基因集中苯丙素类生物合成和苯丙氨酸代谢相关的代谢通路均被显著富集,表明在夏枯草 3 个不同组织中涉及苯丙素类生物合成和苯丙氨酸代谢相关的基因的表达均有较大的变化,也暗示了夏枯草 3 个不同组织中以苯丙氨酸为底物的次生代谢产物的种类和含量可能均有较大的变化。在叶和茎中类黄酮、玉米素、二萜等次生代谢产物生物合成途径的相关基因的表达也出现了差异。结果见表 3。

表 3 差异表达基因的 KEGG 富集部分结果

Table 3 Enrichment KEGG analysis of differentially expressed genes

样品	代谢通路	KEGG 通路编号	富集因子	Unigene 个数
果穗 vs 叶	光合天线蛋白	ko00196	0.17	18
	光合作用	ko00195	0.23	24
	苯丙氨酸代谢	ko00360	0.32	34
	光合生物碳固定	ko00710	0.41	45
	苯丙素类生物合成	ko00940	0.35	32
果穗 vs 茎	光合天线蛋白	ko00196	0.14	21
	光合作用	ko00195	0.19	28
	脂肪酸生物合成	ko00061	0.3	20
	苯丙氨酸代谢	ko00360	0.37	28
	植物激素信号转导	ko04075	0.54	55
叶 vs 茎	类黄酮生物合成	ko00941	0.12	16
	苯丙素类生物合成	ko00940	0.24	28
	苯丙氨酸代谢	ko00360	0.28	24
	玉米素生物合成	ko00908	0.18	13
	二萜生物合成	ko00904	0.15	10

3.4 夏枯草三萜和酚酸类成分生物合成相关差异表达基因的鉴定

夏枯草是我国常用的中药材,其富含的三萜类、酚酸类等多种类型的次生代谢产物可能是其发挥药理作用的物质基础。前期,课题组通过搜索夏枯草转录组数据,共注释得到 60 条 Unigene 可能编码三萜类骨架合成的 13 种关键酶,共注释得到 24 条 Unigene 可能编码迷迭香酸的生物合成途径的 7 种关键酶。通过在夏枯草 3 个差异表达基因集中分别

搜索三萜类和酚酸类生物合成途径相关的关键酶,共鉴定到 31 个三萜类生物合成相关的 Unigene,其中有 4 个 Unigene 编码参与萜类共同前体生成的甲羟戊酸途径(MVA)中的关键酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR);有 8 个 Unigene 编码参与萜类共同前体生成的甲基赤藓糖醇磷酸化途径(MEP)中的 4 个关键酶,包括 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶(DXS)、1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原酶(DXR)、4-羟基-3-甲基-2-烯基二磷酸合酶(ispG)、4-羟基-3-甲基-2-烯基二磷酸还原酶(ispH);有 19 个 Unigene 编码参与三萜骨架生物合成中间体合成的 6 个关键酶,包括柯巴基焦磷酸合酶(CPS)、牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶(GGPPS)、香叶醛二磷酸还原酶(chlP)、贝壳杉烯酸羟化酶(KAO)、赤霉素 2 双加氧酶(G2O)、赤霉素 20 氧化酶(G20O)等。共鉴定到 16 个酚酸类生物合成相关的 Unigene,其中包括 6 个苯丙氨酸解氨酶(PAL)、1 个肉桂酸-4-羟化酶(C4H)、3 个 4-香豆素辅酶 A 连接酶(4CL)、6 个酪氨酸氨基转移酶(TAT)。结果见表 4。

3.5 夏枯草三萜和酚酸类成分生物合成相关差异表达基因聚类分析

对筛选出的差异表达基因做层次聚类分析,将具有相同或相似表达行为的基因进行聚类,用于展示不同组织中基因集的差异表达模式。由图 2-A 可见,在萜类生物合成相关差异表达基因中,基因的表达模式大致可分为 3 类,第 1 类为在叶中表达量最高,第 2 类为在茎中表达量最高,第 3 类为在果穗中表达量最大。第 3 类又可分为 2 个亚类,第 1 个亚类中 3 个 Unigene 在茎中表达量高于叶,第 2 个亚类中 2 个 Unigene 在茎和叶中表达趋势较为一致。由图 2-B 可见,在酚酸类成分生物合成差异表达的 16 个 Unigene 中,呈现 3 大类不同的表达模式,其中第 1 类 4 个 Unigene 在茎中表达量最高,其次,叶中最低;第 2 类的 5 个 Unigene 在茎中表达量最高,而在果穗和叶中表达量差异不大;第 3 类中的 7 个 Unigene 在果穗中的表达量最高,而在茎和叶中较低。

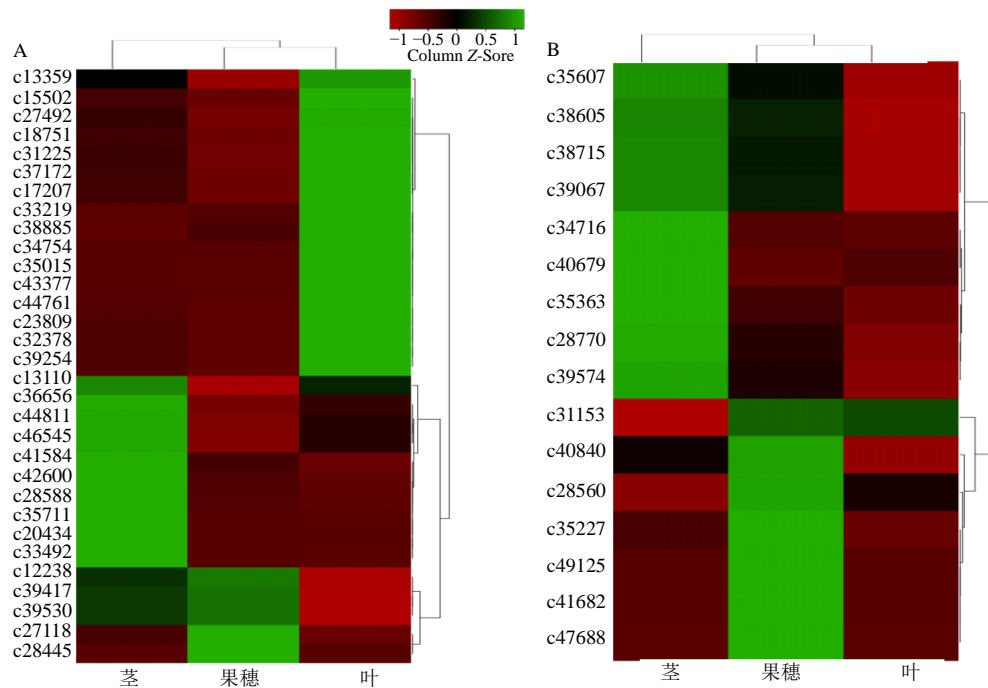
3.6 次生代谢产物测定

如表 5 所示,夏枯草不同组织中齐墩果酸、熊果酸等 4 种次生代谢产物含量均不相同,整体上来说,果穗中 4 种次生代谢产物含量最高,其次是叶,茎中最低。

表 4 夏枯草三萜和酚酸类成分生物合成相关差异表达基因

Table 4 Differentially expressed genes related to triterpene and phenolic acids biosynthesis of *P. vulgaris*

基因简称	英文名称	Unigene 编号
HMGR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	c18751、c27118、c32378、c33219、c36656
DXS	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	c35015、c39254、c39417、c39530
DXR	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase	c27492
HDS	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase	c37172
HDR	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	c38885
chIP	geranylgeranyl diphosphate reductase	c13110、c13359
GGPPS	geranylgeranyl pyrophosphate synthase	c15502、c31225、c41584、c42600
CPS	copalyl diphosphate synthase	c17207、c34754、c43377、c44761、c23809、c28588
KAO	ent-kaurenoic acid hydroxylase	c35711
G2O	gibberellin 2 ioxxygenase	c28445、c20434
G2O0	gibberellin 20 oxidase	c12238、c33492、c44811、c46545
PAL	phenylalanine ammonia-lyase	c28770、c34716、c38605、c38715、c39067、c40679
C4H	einnamieacid-4-hydroxylase	c35607
4CL	hydroxycinnamate: coenzyme A ligase	c35363、c39574、c40840
TAT	tyrosine aminotransferase	c28560、c31153、c35227、c41682、c47688、c49125



不同的列代表不同的样品，不同的行代表不同的基因。颜色代表了基因在样品中的表达量 FPKM 均一化后的 Score 值

Different columns represent different samples, and different rows represent different genes. The color represents the score value after FPKM normalization of the gene expression in the samples

图 2 夏枯草三萜类 (A) 和酚酸类 (B) 成分生物合成相关差异表达基因聚类分析

Fig. 2 Expression profiles clustering of differentially expressed genes among triterpene (A) and phenolic acids (B) biosynthesis of *P. vulgaris*

表 5 不同组织中次生代谢产物的含量

Table 5 Content of secondary metabolites in different tissues

组织	齐墩果酸/%	熊果酸/%	咖啡酸/%	迷迭香酸/%
果穗	0.144 0±0.010 7	0.436 0±0.043 1	0.095 0±0.005 7	3.665 0±0.015 0
叶	0.116 0±0.001 6	0.266 0±0.007 8	0.041 0±0.002 4	3.089 0±0.013 0
茎	0.030 0±0.002 0	0.088 0±0.000 7	0.004 0±0.000 1	2.699 0±0.147 0

4 讨论

夏枯草为唇形科夏枯草属多年生草本植物,是我国常用的药食两用中药材。经陈宇航等^[16]考证发现传统夏枯草药用部位是带穗全草,在民国以后逐渐将果穗单独入药,而 1963 年至今各个版本《中国药典》均以半枯或成熟果穗作为夏枯草药用部位。同时,古代医药学家以带穗全草入药是经过长期临床实践经验总结而得,其疗效已被广泛认可,因此对夏枯草茎叶进行化学成分和药理作用的研究有重要的意义。本研究利用高通量测序技术对夏枯草果穗、茎、叶 3 个组织进行了转录测序,发现不同组织的转录本中均存在着一定的差异,尤其是在苯丙素类、萜类、类黄酮类等次生代谢产物生物合成相关基因的表达差异较为显著,这可能暗示着不同夏枯草组织中次生代谢产物的组成和含量也具有一定的差异,也从基因表达的层面揭示了夏枯草次生代谢产物的复杂性和差异性,为后续开展夏枯草全草化学成分、药理作用的研究奠定了理论基础。

夏枯草中含有丰富的三萜类化合物,其中熊果酸和齐墩果酸的含量较高,具有抗肿瘤、调节血脂等药理活性。王玉霞等^[17]研究发现夏枯草中熊果酸含量总体呈现果穗>叶>茎的趋势,而果穗中齐墩果酸含量与叶中大致相等,远高于茎中含量。刘萍等^[20]研究发现夏枯草果穗中熊果酸含量高于叶,叶高于茎,而齐墩果酸含量在 3 个组织中则变化不大,与本研究的结果相似。在夏枯草三萜类成分生物合成相关的差异基因中,并未发现与熊果酸和齐墩果酸含量变化十分一致的基因。这可能是由于文献中所使用样品和本研究不一致,从而导致次生代谢产物含量的差异;此外,也可能与本研究所筛选的差异基因主要是三萜合成中上游的相关基因有关。在以后的研究中,应采用转录组同批次样品进行含量测定,并扩大筛选范围,通过基因表达量与次生代谢产物含量的共表达分析进一步挖掘夏枯草中参与调控三萜生物合成的功能基因和一些重要的转录因子。

以迷迭香酸为代表的酚酸类成分具有抗病毒、抗炎、抗抑郁活性等药理活性,是夏枯草中的有效成分之一。张兰珍等^[21]和刘萍等^[20]研究均表明夏枯草植物不同部位中咖啡酸和迷迭香酸含量差别较大,咖啡酸和迷迭香酸均在果穗中含量最高,茎中含量最低。酪氨酸氨基转移酶是酪氨酸代谢的一个限速酶,其可将酪氨酸的氨基转移至戊邻酮二酸盐并形成 4-羟基苯丙酮酸^[22],为后续迷迭香酸的合成

提供前体。在丹参毛状根中过表达 TAT 基因可使酚酸类成分的含量显著提高^[23]。在本研究中,一个酪氨酸氨基转移酶(TAT, c28560)的表达量与酚酸类的含量变化较为一致,推测其可能是调控夏枯草中酚酸类成分的关键基因。

参考文献

- [1] Ryu S Y, Oak M H, Yoon S K, *et al.* Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris* [J]. *Planta Med* 2000, 66(4): 358-360.
- [2] 柏玉冰,李春,周亚敏,等.夏枯草的化学成分及其三萜成分的抗肿瘤活性研究[J].*中草药*, 2015, 46(24): 3623-3629.
- [3] 陈宇航,郭巧生,王澄亚,等.夏枯草形态学性状的遗传变异、相关及主成分分析[J].*中国中药杂志*, 2009, 34(15): 1886-1889.
- [4] 郭巧生,张贤秀,王艳茹,等.夏枯草种子品质检验及质量标准初步研究[J].*中国中药杂志*, 2009, 34(7): 812-816.
- [5] 于曼曼,刘丽,郭巧生,等.氮素不同形态对比对夏枯草苗期生长及光合特性的影响[J].*中国中药杂志*, 2011, 36(5): 530-534.
- [6] 郭巧生,周黎君,武征,等.不同水分处理对夏枯草花期生长和生理特性的影响[J].*中草药*, 2010, 41(10): 1715-1719.
- [7] 郭巧生,陈宇航,刘丽,等.优化施肥对夏枯草果穗干物质及其产量的效应分析[J].*中国中药杂志*, 2011, 36(21): 2932-2936.
- [8] 朱响昊,张梦佳,李璐,等.夏枯草三萜和酚酸类合成相关的 MYB 转录因子的挖掘及分析[J].*中草药*, 2019, 50(5): 2165-2171.
- [9] 汝梅.夏枯草迷迭香酸生物合成途径酪氨酸支路关键酶基因的克隆与功能研究[D].北京:中国科学院教育部水土保持与生态环境研究中心, 2017.
- [10] 许锋,曹腾,宁迎晶,等.夏枯草苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与表达分析[J].*华北农学报*, 2012(1): 39-44.
- [11] 王尧龙,黄璐琦,袁媛,等.药用植物转录组研究进展[J].*中国中药杂志*, 2015, 40(11): 2055-2061.
- [12] 朱响昊,张梦佳,李璐,等.夏枯草的转录组测序与次生代谢产物生物合成相关基因的挖掘[J].*中草药*, 2019, 50(9): 1220-1226.
- [13] Xiao M, Zhang Y, Chen X, *et al.* Transcriptome analysis based on next-generation sequencing of non-model plants producing specialized metabolites of biotechnological interest [J]. *J Biotechnol*, 2013, 166(3): 122-134.
- [14] Liu Y, Wang Y, Guo F, *et al.* Deep sequencing and transcriptome analyses to identify genes involved in

- secoiridoid biosynthesis in the Tibetan medicinal plant *Swertia mussotii* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43108-43118.
- [15] Ha J, Lee T, Kim M Y, *et al.* Comprehensive transcriptome analysis of *Lactuca indica*, a traditional medicinal wild plant [J]. *Mol Breed*, 2017, 37(9): 112-119.
- [16] 陈宇航, 郭巧生, 王澄亚. 夏枯草本草及其入药部位变化的考证 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 242-246.
- [17] 王玉霞, 尹金宝, 郭巧生, 等. 夏枯草不同部位活性成分含量动态研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 741-745.
- [18] 方 罗, 林能明, 吴永江. 高效液相色谱同时测定夏枯草药材中 4 种活性成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(5): 616-619.
- [19] 张兰珍, 秦 雯, 张小华, 等. 夏枯草不同部位中咖啡酸和迷迭香酸的含量测定方法研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(5): 343-345.
- [20] 刘 萍, 袁保刚, 尹丹丹, 等. 夏枯草不同器官主要药用成分积累规律 [J]. 西北农业学报, 2010, 19(10): 137-140.
- [21] 张兰珍, 巴寅颖, 季思伟, 等. RP-HPLC 测定夏枯草不同部位熊果酸和齐墩果酸含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(9): 1547-1549.
- [22] De-Eknamkul W, Ellis B E. Tyrosine aminotransferase: The entrypoint enzyme of the tyrosine-derived pathway in rosmarinic acid biosynthesis [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(7): 1941-1946.
- [23] Xiao Y, Zhang L, Gao S, *et al.* The *c4h*, *tat*, *hppr* and *hppd* genes prompted engineering of rosmarinic acid biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29713.