

• 药材与资源 •

基于转录组挖掘球药隔重楼螺甾烷型重楼皂苷生物合成相关基因

曲别阿香^{1,2,3}, 曲别军长^{1,2,3}, 俸明康^{1,2,3}, 何斌^{1,2,3}, 何晓勇^{1,2,3}, 李娟^{2,3}, 冯景秋^{2,3}, 盛华春^{2,3}, 黄艳菲^{1,3,4}, 阎新佳^{2,3}, 刘圆^{2,3*}, 张绍山^{2,3*}

1. 西南民族大学 药学院, 四川 成都 610041
2. 四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 四川 成都 610225
3. 青藏高原民族药用资源保护与利用国家民委重点实验室, 四川 成都 610225

摘要:目的 以球药隔重楼 *Paris fargesii* 根茎、茎和叶为材料, 探究螺甾烷型重楼皂苷的生物合成基因。方法 采用 HPLC 分析 6 个螺甾烷型重楼皂苷含量, 进一步利用 Illumina HiSeq X Ten 平台进行转录组测序, 结合定量和转录组数据进行生信分析。结果 6 个螺甾烷型重楼皂苷在球药隔重楼根茎、茎和叶中的含量具有显著差异。Illumina 转录组测序共获得 61 755 条非冗余 unigenes, 其中 30 263 条 (49.0%) 被成功注释。催化生成薯蓣皂苷元的 31 个关键基因均被成功鉴定, 且基因表达模式与皂苷的积累水平总体一致, 其中 *IDI*、*8,7SI-4*、*CYP90G4*、*SMO2-2*、*C5-SD1*、*CYP51G*、*C14-R-2*、*HMGCR*、*CPI-5*、*CYP94DI08*、*CAS*、*HMGCS*、*SMO1-3*、*SSRI-3*、*SQS*、*ispH* 和 *DXR* 等基因与重楼皂苷的积累呈显著正相关。共获得了 61 条尿苷二磷酸糖基转移酶 (*UGT*) 基因, 其中 30 条潜在参与重楼皂苷的糖基化修饰。结论 球药隔重楼根茎、茎和叶中皂苷合成基因表达模式与皂苷积累规律存在一致性, 鉴定的基因可指导该类活性产物的生物合成途径解析。

关键词: 球药隔重楼; 转录组; 螺甾烷型重楼皂苷; 生物合成途径; 尿苷二磷酸糖基转移酶

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)20-6798-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.20.023

Identification of genes involved in biosynthesis of spirostane-type polyphyllin in *Paris fargesii* based on transcriptome analysis

QUBIE A-xiang^{1,2,3}, QUBIE Jun-zhang^{1,2,3}, FENG Ming-kang^{1,2,3}, HE Bin^{1,2,3}, HE Xiao-yong^{1,2,3}, LI Juan^{2,3}, FENG Jing-qiu^{2,3}, SHENG Hua-chun^{2,3}, HUANG Yan-fei^{1,3,4}, YAN Xin-jia^{2,3}, LIU Yuan^{2,3}, ZHANG Shao-shan^{2,3}

1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China
2. Sichuan Technology and Engineering Laboratory of Qiang-Yi Medicinal Resources Protection and Utilization, Chengdu 610225, China
3. Key Laboratory of Tibetan Plateau Ethnic Medicinal Resources Protection and Utilization of National Ethnic Affairs Commission, Chengdu 610225, China

Abstract: Objective To investigate the biosynthetic genes of spirostane-type polyphyllins of *Paris fargesii*. **Methods** Based on the rhizome, stem and leaf materials of *P. fargesii*, the contents of six spirostane-type polyphyllins were analyzed by HPLC. The transcriptome sequencing was performed using Illumina HiSeq X Ten platform. The quantitative data and transcriptome data were combined for bioinformatics analysis. **Results** The content of six spirostane-type polyphyllins had significant differences in the rhizome, stem and leaf of *P. fargesii*. A total of 61755 non-redundant unigenes were obtained by Illumina sequencing, of which 30263 (49.0%) were successfully annotated. Thirty-one key genes in the biosynthesis pathway of diosgenin had been successfully identified, and the gene expression pattern was generally consistent with the accumulation level of spirostane-type polyphyllins. The accumulation level of spirostane-type polyphyllins were positively correlated with *IDI*, *8,7SI-4*, *CYP90G4*, *SMO2-2*, *C5-SD1*,

收稿日期: 2023-02-03

基金项目: 四川省自然科学基金资助项目 (22NSFC3136); 西南民族大学 2023 年研究生创新型项目资助硕士重点项目 (ZD2023459)

作者简介: 曲别阿香 (1999—), 女, 在读硕士, 主要从事民族药品品质评价及品质形成分子机理研究。E-mail: 1814910468@qq.com

*通信作者: 张绍山, 助理研究员, 主要从事民族药资源品质评价、生态栽培及次生代谢产物生物调控研究。

E-mail: shaoshanzhang_smu@qq.com

刘圆, 教授, 主要从事民族药资源品质评价研究。E-mail: 499769896@qq.com

CYP51G, C14-R-2, HMGCR, CPI-5, CYP94D108, CAS, HMGCS, SMO1-3, SSRI-3, SQS and *ispH*. A total of 61 uridine diphosphate glycosyltransferase (UGT) genes were obtained, of which 30 were potentially involved in the glycosylation modification of spirostane-type polyphyllins. **Conclusion** There was a consistency between the expression pattern of genes involved in the biosynthesis pathway of polyphyllins and the accumulation level of polyphyllins in the rhizome, stems and leaves of *P. fargesii*. The genes identified in this study can help to elucidate the biosynthetic pathway of this kinds of active products.

Key words: *Paris fargesii* Franch.; transcriptome; spirostane-type polyphyllins; biosynthesis pathway; uridine diphosphate glycosyltransferase

螺甾烷型重楼皂苷是著名中药材“重楼”的主要活性成分，具有显著的抗肿瘤、抗菌、止血等药理活性，该类皂苷也是历版《中国药典》重楼项下的质控成分^[1-3]。据螺甾烷型皂苷元 C-17 位上有无-OH，又分为薯蓣皂苷和偏诺皂苷，而偏诺皂苷又可在其 C-23、C-24 和 C-27 位加上-OH；除苷元母核的差异外，各皂苷结构的差异主要来自于苷元母核上连接的寡糖基^[3]。进一步的药理研究表明，螺甾烷型重楼皂苷元的结构修饰，对其抗肿瘤、抗菌、止血等药理活性有显著影响，如糖基化后形成的重楼皂苷 I、II、III、VII、H，抗菌活性显著增强，其中重楼皂苷 H 的止血活性亦显著增强^[3-5]。遗憾的是，自然界中，螺甾烷型重楼皂苷在重楼属植物中含量极低，外加重楼属植物生长缓慢，限制了该类化合物的开发利用^[6-7]。因此，研究该类化合物在重楼属植物中的合成代谢，对该药材的药效形成机制和品质提升等具有重要意义。

螺甾烷型重楼皂苷的生物合成途径复杂。首先通过细胞质中的甲羟戊酸途径 (mevalonate) 和质体中的甲基赤藓糖醇-4-磷酸途径 (methylerythritol 4-phosphate) 合成法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP)^[8-9]。FPP 在角鲨烯合成酶 (SQS)^[10]、角鲨烯单氧化酶 (SQE)^[11]、环阿屯醇合成酶 (CAS)^[12]、甾醇-4 α -甲基氧化酶 (SMO1-3 和 SMO2-2)^[13-14]、环桉烯醇环异构酶 (CPI-5)^[14-15]、甾醇-14 α -去甲基酶 (CYP51G)^[14-16]、甾醇-C₁₄-还原酶 (C₁₄-R-2)^[14,17]、胆甾烯醇 δ -异构酶 (8,7SI-4)^[14,18]、甾醇 C-5(6)去饱和酶 (C₅-SD1)^[14,19]、7-脱氢胆甾烯醇还原酶 (7-DR1)^[14,20] 和 δ (24)-甾醇还原酶 (SSRI-3)^[14,21] 的催化下，形成胆甾烯醇。目前，从重楼中鉴定了 3 种不同的 CYP 基因组合 (CYP90G4/CYP94D108、CYP90G4/CYP94D109、CYP90G4/CYP94D72A616)，可催化胆甾烯醇形成螺甾烷型皂苷元^[22]。皂苷元最终在糖基转移酶 (Uridine diphosphate glycosyltransferases, UGTs) 的糖基化下，主要在 C₃-OH 上连接不同种类 (主要为

葡萄糖基、鼠李糖基、阿拉伯糖基)、不同数量 (主要为单糖、二糖、三糖和四糖) 和不同位置 (主要为 C-2、C-3 和 C-4 位的-OH) 的糖基，从而形成不同的螺甾烷型重楼皂苷，糖基化步骤中报道了葡萄糖基化皂苷元 C₃-OH 的 UGT73CR1、UGT80A40 和 UGT80A41，2'-O-鼠李糖基化的 UGT73CE1，以及 6'-O-葡萄糖基化的 UGT91AH1 和 UGT91AH2^[12,23]，而其他糖基化步骤的 UGTs 尚无研究报道。

球药隔重楼 *Paris fargesii* Franch. 为重楼属 *Paris* L. 多年生草本植物，为川渝地区珍稀品种，相较于重楼属其他物种，其同时富含薯蓣型和偏诺型重楼皂苷，是探究螺甾烷型重楼皂苷生物合成相关基因的理想材料^[24-25]。目前，关于螺甾烷型重楼皂苷的分子水平研究主要基于资源丰富的云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 或七叶一枝花 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara^[12,26]。2022 年，Hou 等^[27] 利用 Illumina NovaSeq 6000 平台对七叶一枝花、云南重楼、球药隔重楼、狭叶重楼 *P. polyphylla* var. *stenophylla* Franch. 和毛重楼 *P. mairei* H. Léveillé 的根茎和叶分别做了转录组测序，以云南重楼为参照，在叶中检测到了 14 815 个球药隔重楼特异性表达的基因，是其他 3 组中最多的，且在根茎中也检测到了 6030 个特异性表达基因，这说明球药隔重楼相比其他重楼品种，有着自身独特的遗传背景。

因此，本研究利用前期繁育的 7 年生球药隔重楼，基于 RNA-Seq 技术对其根茎、茎、叶进行转录组分析，进一步结合根茎、茎、叶中螺甾烷型重楼皂苷的含量数据，鉴定该类皂苷生物合成途径基因，为该皂苷生物合成途径解析和优良重楼品种的分子育种提供科学支撑。

1 材料

1.1 植物和取样

通常重楼皂苷在重楼中的积累于 7~8 年时丰度最高^[28]，故本研究选择 7 年生无病害的球药隔重楼，于 2022 年 8 月采自四川省阿坝藏族羌族自治州

汶川县水磨镇西南民族大学药材繁育试验基地,由西南民族大学刘圆教授和张绍山博士鉴定为球药隔重楼 *P. fargesii* Franch.。将植株均分为3份,每份4株,取每份植株的根茎、茎、叶,按组织部位混匀后,一半40℃烘干,粉碎,过40目筛,干燥器保存,用于螺甾烷型重楼皂苷含量分析;一半装于洁净的离心管中,迅速用液氮固定,-80℃保存,用于转录组分析。

1.2 试药

对照品重楼皂苷 I (批号 RP200523)、重楼皂苷 II (批号 RP190315)、重楼皂苷 H (批号 RP190528)、重楼皂苷 V (批号 RP191217)、重楼皂苷 VI (批号 RP220807) 购自成都麦德生科技有限公司,重楼皂苷 VII (批号 MUST-18062201) 购自成都曼斯特生物有限公司。色谱级甲醇和乙腈均购于赛默非世尔科技有限公司;水为屈臣氏蒸馏水;其余试剂为分析纯。

2 方法

2.1 螺甾烷型重楼皂苷含量测定

2.1.1 色谱条件 Agilent 1260 Infinity II 色谱仪; Diamonsil-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱: 0~20 min, 30%~40% A; 20~45 min, 40%~60% A; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30℃; 进样体积 10 μL; 检测波长 203 nm。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取重楼皂苷 I、II、V、VI、VII 和 H 对照品适量, 加色谱甲醇制成含重楼皂苷 I 0.478 mg/mL、重楼皂苷 II 0.285 mg/mL、重楼皂苷 V 0.500 mg/mL、重楼皂苷 VI 0.514 mg/mL、重楼皂苷 VII 0.240 mg/mL 和重楼皂苷 H 0.375 mg/mL 的混合对照品溶液, 摇匀后经 0.45 μm 滤膜滤过。

2.1.3 供试品溶液的制备 取不同部位球药隔重楼样品粉末约 0.5 g, 精密称定, 按料液比 1:25 精密加入甲醇, 密封, 称定质量, 超声 60 min (功率 500 W, 频率 40 kHz), 放冷至室温, 再称定质量, 加甲醇补足缺失的质量, 摇匀后经 0.45 μm 滤膜滤过。

2.1.4 线性方程的绘制 取对照品适量, 配制成重楼皂苷 I、重楼皂苷 II、重楼皂苷 V、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII、重楼皂苷 H 的对照品储备液, 使其质量浓度分别为 0.478、0.285、0.500、0.514、0.240、0.375 mg/mL, 取混合对照品溶液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 于 5 mL 量瓶中加入甲醇定容至刻

度, 按上述梯度洗脱条件, 分别精密吸取供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。以 6 种甾体皂苷的进样浓度为横坐标 (X), 相应峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 对应的对照品重楼皂苷 I、重楼皂苷 II、重楼皂苷 H、重楼皂苷 V、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII 的线性方程分别为 $Y=3\ 333.6 X+72.454$ 、 $Y=3\ 003.1 X+3.740\ 4$ 、 $Y=3\ 051.7 X+5.760\ 4$ 、 $Y=3\ 500.8 X+169.78$ 、 $Y=3\ 575.3 X+26.1$ 、 $Y=10\ 330 X+31.919$; 对应的线性范围分别为 0.015~0.478、0.009 5~0.285 0、0.012~0.375、0.016~0.500、0.017~0.514、0.008~0.240 mg/mL; R^2 分别为 0.999 9、0.999 9、1.000 0、0.994 3、0.999 9、0.999 9。结果表明各成分在相应范围内呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密称取“2.1.2”项下混合对照品一份, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 针, 测得各指标成分色谱峰的峰面积, 结果表明样品中 6 种指标成分峰面积 RSD 值在 0.98%~1.70%。

2.1.6 重复性试验 精密称取球药隔重楼样品粉末, 按“2.1.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样 10 μL, 测得各指标成分色谱峰的峰面积, 结果表明样品中 6 种指标成分质量分数的 RSD 值在 1.01%~1.92%。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取同一份球药隔重楼样品粉末供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件分别于制样后 0、2、6、8、12、24 h 进样, 测得各指标成分色谱峰的峰面积, 结果表明样品中 6 种指标成分峰面积的 RSD 值在 1.05%~1.74%, 表明供试品溶液在制备后 24 h 内稳定。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取球药隔重楼样品粉末 0.25 g, 精密加入等量的对照品, 按“2.1.3”项下供试品溶液制备方法平行制备 6 份样品溶液, 测定 6 个指标性成分的含量, 计算加样回收率, 加样回收率均在 95.72%~110.20%, RSD 为 0.99%~1.82%, 符合定量分析要求。

2.1.9 样品含量测定 将“2.1.3”项下制得的 9 批 (每个组织部位 3 个生物学重复) 供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定。

2.2 转录组测序和分析

2.2.1 文库构建和测序 利用 mirVana miRNA Isolation Kit (Cat. AM1561, InVtrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., 美国) 分别提取根茎、茎和叶的总 RNA。RNA 用琼脂糖凝胶电泳检测降解和污

染情况, NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 美国) 检测 RNA 的纯度和浓度, Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, 美国) 评估 RNA 的完整性。符合高通量测序质量要求后, 委托上海欧易生物医学科技有限公司采用 Illumina HiSeq X Ten platform (Illumina, 美国) 进行测序, 文库的构建采用 TruSeq Stranded mRNA LTSample Prep Kit (Illumina, 美国) 试剂盒。

2.2.2 数据质量控制与 *de novo* 组装 首先使用 Trimmomatic 软件进行质控并去除接头, 在此基础上过滤掉低质量碱基以及 N 碱基, 最终得到高质量的 clean reads。使用 Trinity (version: 2.4) 软件 paired-end 的拼接方法, 将 clean reads 拼接得到 transcript 序列, 根据序列相似性及长度, 挑选出最长的 1 条作为 unigene。最终, 利用 CD-HIT (identify=98%) 软件聚类去冗余得到非冗余的 unigenes。

2.2.3 Unigenes 功能注释和定量分析 利用 diamond 软件将 unigenes 的蛋白序列比对到 NR、KOG、GO、Swiss-Prot、eggNOG、KEGG 数据库, 以及利用 HMMER 软件比对到 Pfam 数据库, 对 unigenes 进行功能注释分析。使用软件 bowtie2 获取每个样本中比对到 unigenes 上的 reads 数, 同时使用 eXpress 软件来计算 unigenes 在各样本中的基因表达量 (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM) 值。

2.2.4 差异基因分析 利用 DESeq2 R package 软件包筛选各样本间的差异基因 (differentially expressed genes, DEGs), 筛选差异的条件为 $P < 0.05$ 且差异倍数 (foldchange) > 2 , 对差异表达基因做 KEGG 通路显著性分析。

2.3 螺甾烷型重楼皂苷生物合成相关基因的筛选和分析

以 unigene 序列集为数据库, 利用已发表三萜甾体皂苷生物合成途径基因序列, 进行 blast 检索, 鉴定球药隔重楼中的同源基因, 采用 pearson 相关性算法, 计算上述同源基因与螺甾烷型重楼皂苷积累水平的关系。对尚未解析皂苷母核糖基修饰的 UGTs, 首先依据 UGT 的隐马尔可夫模型 (HMM) 文件 (PF00201) 进行 UGT 基因家族鉴定和功能分析, 结合上游已鉴定基因的表达模式和重楼皂苷定量分析结果, 筛选参与皂苷母核糖基修饰的候选 UGTs。运用 TBtools 绘制基因不同组织相对表达量热图; 运用

MEGA7 软件, 选取 neighbor-joining 方法, bootstrap 为 1000 个重复, 构建 UGTs 的系统发育进化树。

2.4 qRT-PCR

利用 RNA 提取试剂盒“FastPure® Universal Plant Total RNA Isolation kit (Vazyme, China)”从 9 份 RNA-seq 材料中提取 RNA, 质量经检测符合要求后, 利用 HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) KitRNA 反转录试剂盒获取 cDNA, Primer6.0 软件设计引物, RT-PCR 检查引物特异性。qRT-PCR 实验采用 2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix kit (Vazyme) 试剂盒, 具体操作按说明书进行。qRT-PCR 体系为 10.0 μL: 2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 5.0 μL, 上游引物 0.20 μL, 下游引物 0.20 μL, cDNA 1.0 μL, ddH₂O 3.6 μL, 配制过程在冰上完成。PCR 扩增程序为 95 °C、30 s; 95 °C、5 s, 53 °C、30 s, 共 40 个循环; 95 °C、15 s, 60 °C、60 s, 95 °C、15 s。以 *actin* 为内参基因, 每个样品设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复。

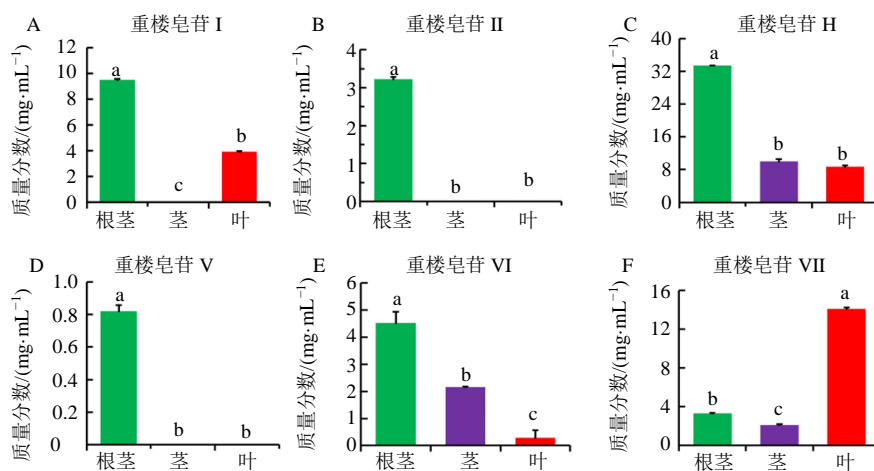
3 结果

3.1 不同组织部位 6 个螺甾烷型重楼皂苷含量测定

经对建立的高效液相色谱 (High-performance liquid chromatography, HPLC) 方法学考察, 结果表明各方法学均符合要求, 方法可用于相关重楼皂苷的定量分析。含量测定结果表明, 球药隔重楼中含有薯蓣皂苷 (重楼皂苷 I、II 和 V) 和偏诺皂苷 (重楼皂苷 H、VI 和 VII); 重楼皂苷 I 在茎中没有检测到; 重楼皂苷 II 和 V 仅在根茎中检测到; 重楼皂苷 H、VI 和 VII 在 3 个组织部位均检测到, 重楼皂苷 H 在根茎中的质量分数超过了 30.0 mg/g, 除重楼皂苷 H 在茎和叶中差异不显著外, 其余皂苷在各组织部位间的含量差异显著 ($P < 0.05$); 此外, 除重楼皂苷 VII 在叶中含量最高外, 其余皂苷均在根茎中积累水平最丰富 (图 1)。以上结果表明球药隔重楼的根茎、茎和叶是揭示螺甾烷型重楼皂苷生物合成通路的理想材料。

3.2 转录组测序和 *de novo* 组装

球药隔重楼根茎、茎和叶的 9 个 cDNA 文库经 Illumina HiSeq X Ten 平台测序, 获得了 66.78 Gb raw reads (数据 NCBI 查询号: PRJNA915171), 质控后得到 64.15 Gb clean reads, 所有文库 raw_bases 中 Q phred 数值大于 30 (Q₃₀) 的碱基数占总碱基的百分比均超过 93%, 表明所有样本文库均获得了高



不同字母表示差异显著, $P < 0.05$

Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$

图1 6个螺甾烷型重楼皂苷在球药隔重楼根茎、茎和叶中的含量

Fig. 1 Total content of six spirostane-type polyphyllins in rhizome, stem and leaf tissues of *P. fargesii*

质量的 raw reads。由于缺乏参考基因组, 数据经 *de novo* 拼接和去冗余后, 最终获得 61 755 条非冗余 unigenes, 平均长度为 971.5 bp, N_{50} 值为 1399 bp, 其中 38 070 条 (61.65%) 的长度大于 500 bp, 19 867 条 (32.19%) 的长度大于 1000 bp。BUSCO 评估转录本完整性, 结果表明本课题组获得的 unigenes 集覆盖了 BUSCO 库中的 87.9%, 其中完全匹配且匹配上一个 (complete and single-copy BUSCOs, S) 的比例为 77.2%。Raw reads 质量和 BUSCO 评估结果表明, 本研究获得的转录组数据是可靠和有效的。

3.3 转录本注释和功能归类

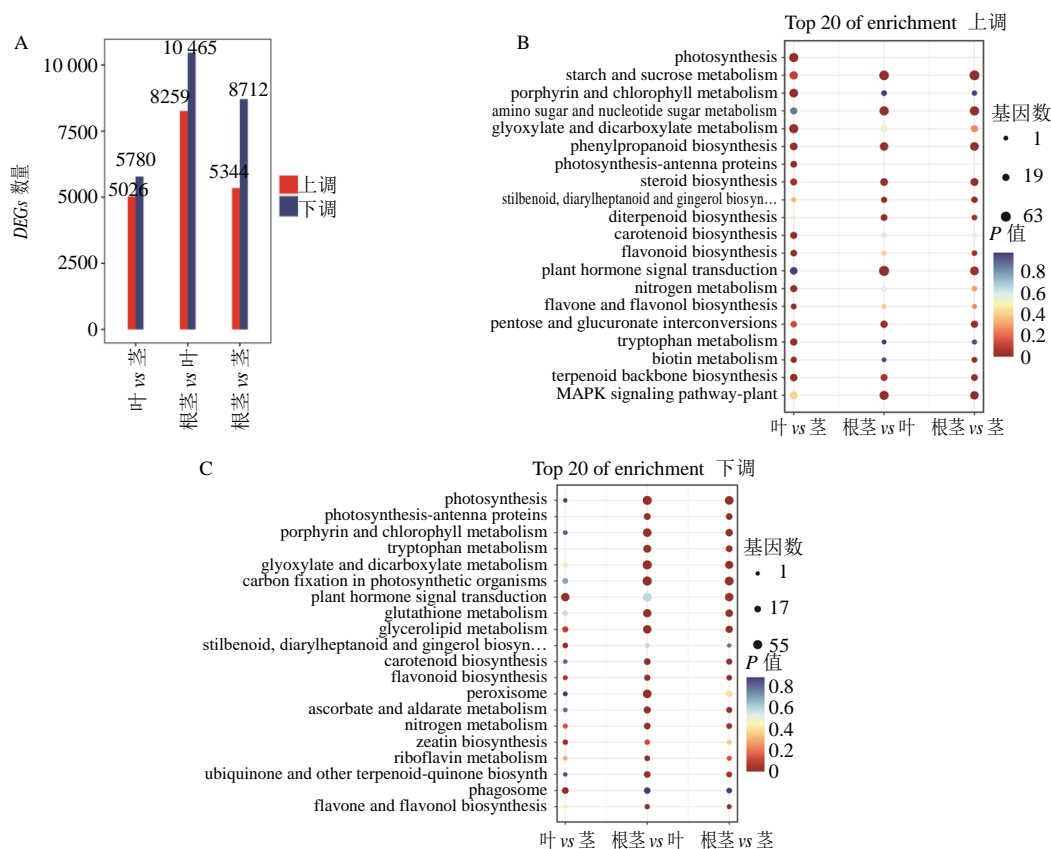
61 755 条非冗余 unigenes 中 29 837 条 (48.32%)、21 328 条 (34.54%)、6467 条 (10.47%)、17 726 条 (28.70%)、26 812 条 (43.42%)、18 557 条 (30.05%)、16 641 条 (26.95%) 分别注释到 NR、Swissprot、KEGG、KOG、eggNOG、GO 和 Pfam 库。经去冗余分析, 共 30 263 条 (49.0%) unigenes 至少在 1 个数据库中被成功注释到, 3234 条 (5.23%) unigenes 在 7 个数据库中均注释到。目前, 重楼属植物所在目百合目 (Liliales) 中没有一个物种进行过基因组测序, 因此本研究中超过 50% 的 unigenes 不能被成功注释是可以理解的, 这些未注释的基因可能涉及未知的功能。

18557 条注释到了 GO 数据库的 unigenes 中, 注释到 “metabolic process” 和 “catalytic activity” 的条数占比相对高于其他 GO 子类别 (图 2-A), 这表明球药隔重楼中相当一部分基因参与物质代谢。

6467 条注释到了 KEGG 数据库的 unigenes 中, 4066 条 (62.87%) 注释为 “Metabolism”, 其中归类为 “Metabolism of terpenoids and polyketides” 的条数为 213, 进一步分析发现, 70 条注释为参与萜类化合物骨架的生成, 39 条注释为参与三萜的生物合成, 这些基因可能与螺甾烷型重楼皂苷的生物合成相关 (图 2-B)。

3.4 差异基因分析

根茎 vs 茎组有 14 056 个 *DEGs*, 其中 5344 个上调, 8712 个下调; 根茎 vs 叶组有 18 724 个 *DEGs*, 其中 8259 个上调, 10 465 个下调; 叶 vs 茎组有 10806 个 *DEGs*, 其中 5026 个上调, 5780 个下调 (图 3-A)。分别对上调和下调的 *DEGs* 进行 KEGG 富集分析, 结果表明, “photosynthesis” “porphyrin and chlorophyll metabolism” “photosynthesis-antenna proteins” 等植物光合作用、生长发育相关途径的基因, 主要在叶和茎中富集; “flavonoid biosynthesis” “flavone and flavonol biosynthesis” “carotenoid-biosynthesis pathway” 等次生代谢途径基因, 也主要在叶和茎中富集 (图 3-B、C)。而与萜类化合物上游代谢密切相关的 “terpenoid backbone biosynthesis” 的 *DEGs*, 主要在根茎中富集, 与三萜重楼甾体皂苷下游代谢密切相关 “steroid biosynthesis” 的 *DEGs*, 也主要在根茎中富集 (图 3-B、C), 这与重楼皂苷主要在根茎中积累一致 (图 1)。这些结果表明, 球药隔重楼中螺甾烷型重楼皂苷生物合成密切相关的基因可能属于这些 *DEGs*。



A-DEGs 统计柱状图 B-表达上调 DEGs 的 KEGG 注释 C-表达下调 DEGs 的 KEGG 注释

A-statistical histogram of DEGs B-KEGG functional classification of up-regulation DEGs C-KEGG functional classification of down-regulation DEGs

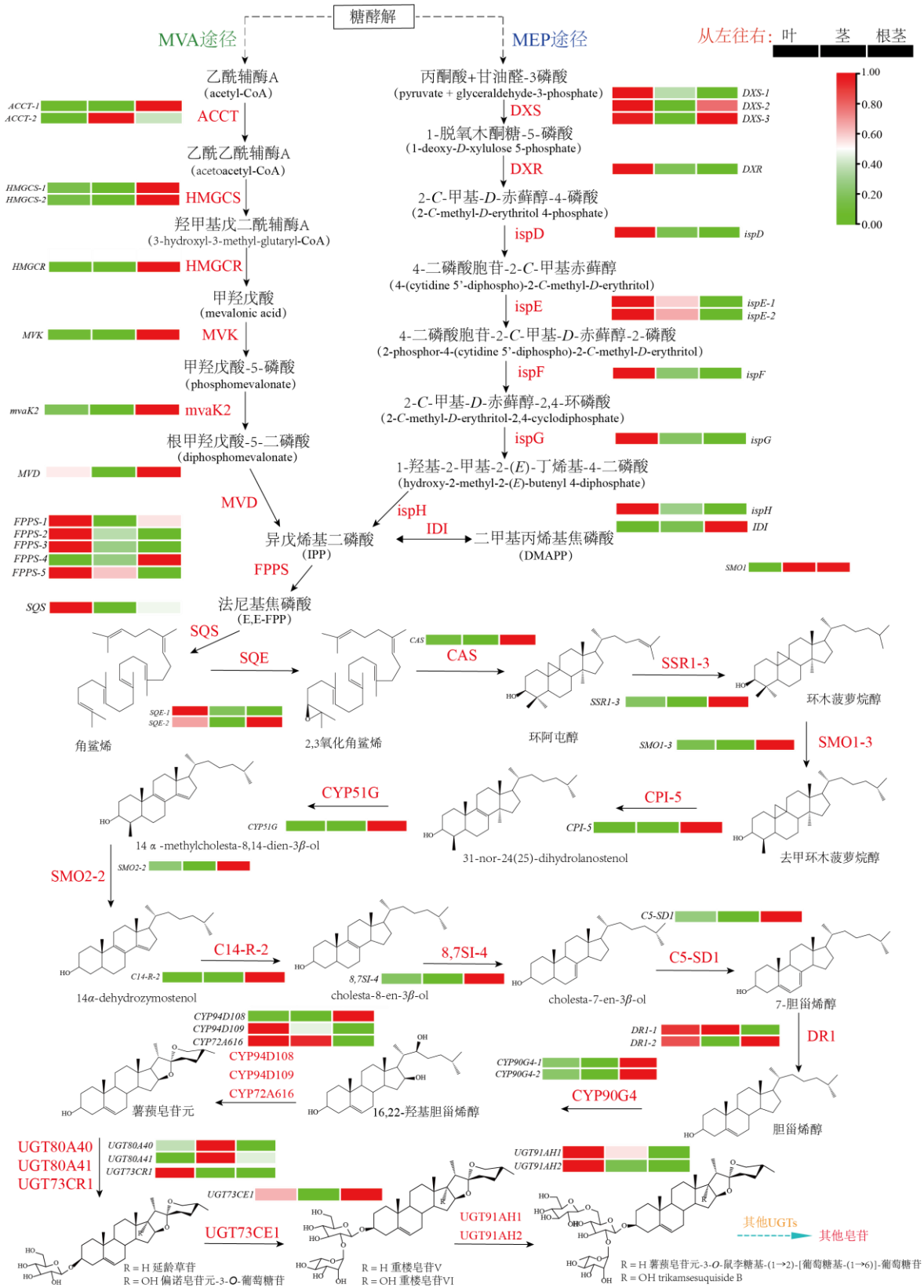
图3 DEGs 分析

Fig. 3 Analysis of DEGs

甲基丁-2-烯基二磷酸还原酶 [(E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase, ispH], 这 7 个关键酶最终催化形成 IPP 和二甲基丙烯基二磷酸 (dimethylpropyl diphosphate, DMAPP); 此外, 还包括了 1 条 IDI, 该基因可使上述 MEP 和 MVA 途径生成的 IPP 与 DMAPP 间相互转化, 以及 5 条法呢基焦磷酸合酶 (farnesyl diphosphate synthase, FPPS), FPPS 可利用 IPP 与 DMAPP 为底物, 生成倍半萜的共同前体 FPP, 最终 2 分子的 FPP 在 SQS 的催化下, 形成植物三萜类化合物共同前体角鲨烯, 本研究注释到了 1 条 SQS 基因 (图 4)。基因表达量结果表明, MVA 途径基因和 IDI 基因在根茎中的表达量显著高于茎和叶, 而 MEP 途径基因在叶中高度表达, 而螺甾烷型重楼皂苷主要在根茎中富集, 这表明球药隔重楼中螺甾烷型重楼皂苷生物合成所需的 IPP 和 DMAPP 可能主要来自 MVA 途径, 这与三萜类化合物生物合成主要由 MVA 途径参与的结果一致^[29]。

基于已发表催化形成螺甾烷型甾体母核的文献

报道 (表 1), 利用同源基因 blast 的检索方法, 去除不完整 ORF 及同源性 ≤ 80% 的 unigenes, 最终筛选到 17 条 unigenes 参与后续螺甾烷型重楼皂苷母核“薯蓣皂苷元”的生成, 其中 2 条 SQE、1 条 CAS、1 条 SMO1-3、1 条 CPI-5、1 条 CYP51G、1 条 C14-R-2、1 条 8,7SI-4、1 条 C5-SD1、2 条 7-DR1、1 条 SSR1-3、2 条 CYP90G4、1 条 CYP94D108、1 条 CYP94D109 和 1 条 CYP72A616, 在这些基因的共同催化下, 最终生成了薯蓣皂苷元 (图 4)。而参与皂苷元侧链寡糖基的催化基因, 报道了葡糖基化皂苷元 C₃-OH 的 UGT73CR1、UGT80A40 和 UGT80A41, 2'-O-鼠李糖基化的 UGT73CE1, 以及 6'-O-葡萄糖基化的 UGT91AH1 和 UGT91AH2, 本研究分别同源 blast 到了 1 条相关基因的同源序列。基因表达量结果表明, 下游基因主要在根茎中高表达, 这与螺甾烷型重楼皂苷主要在根茎中富集的结果一致; 而末端的 CYP94D109、CYP72A616、UGT73CR1、UGT80A40、UGT80A41、UGT91AH1



实线箭头为已验证的步骤，虚线为未验证步骤
Solid arrows are verified steps, dotted lines are unverified steps

图 4 螺甾烷型重楼皂苷生物合成途径及基因表达分析

Fig. 4 Biosynthetic pathway of spirostane-type polyphyllins and analysis of gene expression

表1 同源基因检索所用基因清单及相关信息

Table 1 List of genes used for homologous gene blast and relevant information.

基因名	查询号	物种	文献
<i>SQS</i>	UQX95164	<i>Paris polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	10
<i>SQE</i>	AT1G58440	<i>A. thaliana</i>	11
<i>CAS</i>	MN368727.1	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	12
<i>SMO1-3</i>	—	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	14
<i>SMO2-2</i>	—	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	14
<i>CPI-5</i>	—	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	14
<i>CYP51G</i>	—	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	14
<i>C14-R-2</i>	—	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	14
<i>8,7SI-4</i>	—	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	14
<i>C5-SD1</i>	—	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	14
<i>7-DR1-1</i>	—	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	14
<i>SSR1-3</i>	—	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	14
<i>CYP90G4</i>	MK636702.1	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	22
<i>CYP94D108</i>	MK636703.1	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	22
<i>CYP94D109</i>	MK636704.1	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	22
<i>CYP72A616</i>	MK636705.1	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	22
<i>UGT73CR1</i>	OL654231.1	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	12
<i>UGT80A40</i>	OP198194	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	23
<i>UGT80A41</i>	OP198195	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	23
<i>UGT73CE1</i>	OP198196	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	23
<i>UGT91AH1</i>	OP198197	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	23
<i>UGT91AH2</i>	OP198198	<i>P. polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	23

和 *UGT91AH2* 基因，在根茎中的表达量相对较低，可能是这些基因除参与螺甾烷型重楼皂苷合成外，还有其他更重要的生物学功能。此外，本研究在球药隔重楼中检索到的同源基因的编码区氨基酸序列，与在云南重楼中验证的同源基因高度同源，表明螺甾烷型重楼皂苷生物合成途径基因在重楼属植物中高度保守。

3.6 螺甾烷型重楼皂苷与其生物合成途径基因相关性分析

使用 pearson 相关性计算方法，对螺甾烷型重楼皂苷的积累水平与其生物合成途径基因表达水平进行了关联性分析，结果见图 5。由图可知，*IDI*、*8,7SI-4*、*CYP90G4*、*SMO2-2*、*C5-SD1*、*CYP51G*、*C14-R-2*、*HMGCR*、*CPI-5*、*CYP94D108*、*CAS*、*HMGCS*、*SMO1-3*、*SSR1-3*、*SQS*、*ispH* 和 *DXR* 等 17 个已知途径中的基因表达水平与螺甾烷型重楼皂苷的积累存在显著的正相关性，而 *ACCT* 基因的表达水平似乎负调控螺甾烷型重楼皂苷的积累。

3.7 螺甾烷型重楼皂苷生物合成途径中 UGT 的筛选与分析

螺甾烷型重楼皂苷的结构差异主要来自侧链的寡糖基，寡糖基的形成可能需要多个 *UGT* 基因

的参与，但仅 *UGT73CR1* 被研究报道^[12]。因此，我们结合上述皂苷的定量数据、转录组数据和已鉴定合成途径基因分析结果，筛选潜在参与螺甾烷型重楼皂苷糖基化的 *UGT* 基因。首先，基于球药隔重楼 unigenes 的 CDS 数据库和 *UGT* 的 HMM 文件 (PF00201)，共检索得到 75 条 *UGTs*，其中 61 条有完整的 ORF。在糖基转移酶 (GT) 命名系统指导下^[30]，结合拟南芥和玉米中 *UGTs* 的分类^[31-32]，对 61 条 *PfUGTs* 进行了系统命名和分类，最终将 *PfUGTs* 分类到 16 个 *UGT* 家族，即 *UGT72*、*UGT73*、*UGT74*、*UGT75*、*UGT78*、*UGT80*、*UGT83*、*UGT84*、*UGT85*、*UGT87*、*UGT88*、*UGT89*、*UGT90*、*UGT91*、*UGT92* 和 *UGT93*。其次，对 61 条 *PfUGTs* 在球药隔重楼根茎、茎和叶中的表达模式进行分析，结果表明，*PfUGTs* 的表达模式可分为根茎中相对高表达 (I 类)、茎中相对高表达 (II 类)、茎叶中均相对高表达 (III 类) 和叶中相对高表达 (IV 类) 4 类，分别有 15 条、12 条、8 条和 26 条基因 (图 5)。螺甾烷型重楼皂苷定量分析和皂苷母核合成途径基因表达分析结果表明，螺甾烷型重楼皂苷主要在根茎中积累 (图 1)，同时皂苷母核合成途径关键基因在根茎中相对高表达 (图 4)。因此，

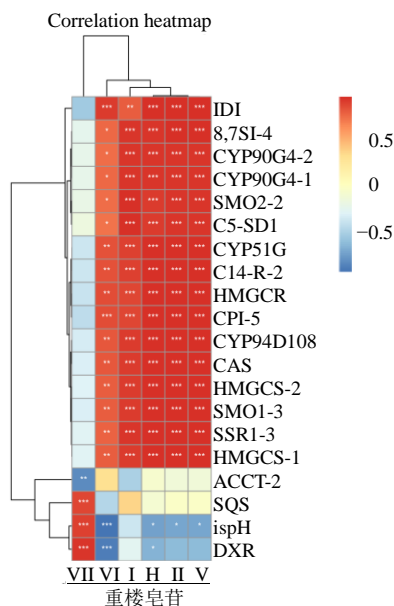
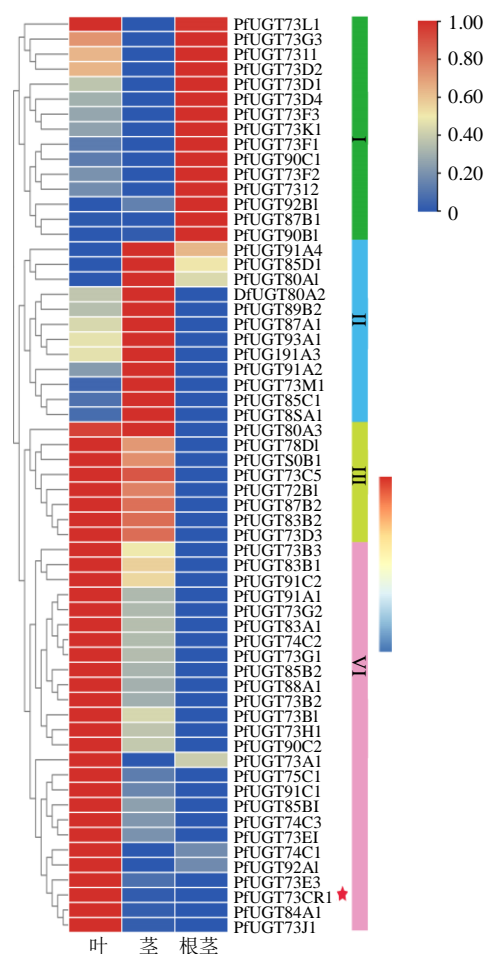


图5 螺甾烷型重楼皂苷与合成途径基因表达相关性分析
Fig. 5 Correlation analysis among spirostane-type polyphillins and related biosynthesis pathway gene expression

推测参与皂苷母核糖基修饰的 *PfUGTs* 可能也在根茎中相对高表达,故 I 类中的 15 条 *PfUGTs* 可能参与了皂苷母核后期的糖基化修饰。此外,重楼皂苷 I、H 和 VII 在叶片中也有较高的积累水平,特别是重楼皂苷 VII 在叶中积累最高,且在重楼属植物中功能验证的 *UGT73CR1*、*UGT73CE1*、*UGT91AH1* 和 *UGT91AH2* 基因在叶片中高表达,故认为在叶片中相对高表达且与 *UGT73CR1*、*UGT73CE1*、*UGT91AH1* 和 *UGT91AH2* 存在相同表达模式的 34 条 III 和 IV 类 *PfUGTs*,也是潜在的候选基因。植物源 UGT 的研究表明,参与三萜类化合物糖基化的 UGTs 主要属于 A 组的 UGT91 和 UGT94、D 组的 UGT73、E 组的 UGT71、L 组的 UGT74 和 UGT75、P 组的 UGT720 家族^[32]。上述筛选到的 49 条 *PfUGTs* (I、III 和 IV 类)中,有 2 条属于 UGT91 家族,有 24 条属于 UGT73 家族,有 3 条属于 UGT74 家族,有 1 条属于 UGT75 家族 (图 6)。

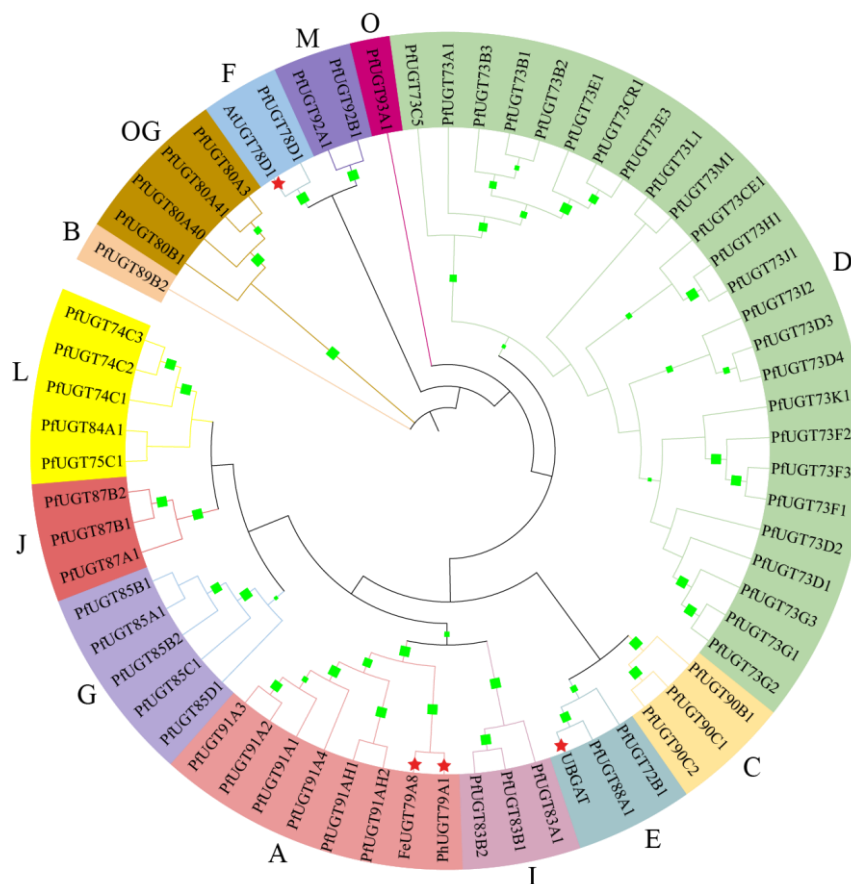
进一步将 61 条 *PfUGTs* 与其他物种中已鉴定功能的 UGTs 构建混合系统发育树,发现来自苦荞麦 *Fagopyrum esculentum* L. 和矮牵牛花 *Petunia hybrida* L. 能识别 UDP-鼠李糖作为糖基供体的 *FeUGT79A8*^[33] 和 *PhUGT79A1*^[34], 来自黄芩 *Scutellaria baicalensis* L. 能利用 UDP-葡萄糖醛酸作为糖供体的 *UBGAT*^[35], 以及来自拟南芥可利用



各组织表达量为 3 个重复的平均值; 红星号的为重楼属植物中功能验证的 *UGT* 基因
Expression values for each tissue are the average of three replicates; Red asterisks are functionally verified *UGT* genes in the plant in Paris

图6 *PfUGTs* 在根茎、茎和叶中的热图分析
Fig. 6 Heatmap of *PfUGTs* in rhizome, stem and leaf tissues

UDP-木糖作为糖供体的 *AtUGT78D1*^[36], 与 *PfUGTs* 成功构建了混合发育树 (图 7)。这表明与 *FeUGT79A8* 和 *PhUGT79A1* 高度聚合的 A 组 *PfUGT91* 家族基因,可能是球药隔重楼中其他识别 UDP-鼠李糖作为糖基供体的 UGTs; 与 *UBGAT* 高度聚合的 E 组 *PfUGT72* 和 *PfUGT88* 家族基因可能是识别 UDP-葡萄糖醛酸的 UGTs; 与 *AtUGT78D1* 高度聚合的 F 组 *PfUGT78D1* 基因可能是识别 UDP-木糖的 UGTs。有趣的是,螺甾烷型重楼皂苷的糖基化十分复杂,包括葡萄糖基化、鼠李糖基化、木糖化等,故这些家族的基因也是值得关注的。



红色星号标识的是来自其他物种的 UGT，绿色正方形表示 bootstrap 值超过 50%

The red asterisk identifies UGT genes from other species, and the green square indicates a bootstrap value of more than 50%

图 7 PfUGTs 系统发育树分析

Fig. 7 Phylogenetic tree of PfUGTs

3.8 qRT-PCR 验证基因表达的可靠性

为了确认 RNA-seq 结果的可靠性，选取了螺蛳旋型重楼皂苷合成途径中的 5 个关键酶基因 (*CAS*、*DXR*、*HMGCR*、*SQE* 和 *SQS*)，以及筛选的 3 个 UGTs 基因 (*PfUGT73CR1*、*PfUGT73B1* 和 *PfUGT75C1*) 进

行 qRT-PCR 定量分析。qRT-PCR 的引物见表 3。

实验结果表明，8 个基因的 qRT-PCR 定量结果和转录组测序获得的 FPKM 值在球药隔重楼中根茎、茎和叶中的表达趋势相似 (图 8)，这表明转录组测序结果是可靠的。

表 3 qRT-PCR 引物序列及产物大小

Table 3 List of primer sequences for qRT-PCR and product size

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')	产物长度/bp
<i>Actin</i>	TTGTGCTCGATTCCGGTGAT	CAGAGGAAGTCTCTTCGCA	255
<i>CAS</i>	GCGAAGGAGAATCCGGTTGA	CTTCTGCATAGCCCGTCA	400
<i>DXR</i>	TGAAGCAGGACGCAAGTCAT	CTGTGACAGCATCTGGGTGT	317
<i>HMGCR</i>	GCTGGGAGGAATCTCTACGC	GCAATGAAGATGGCGGACAC	374
<i>PfUGT73B1</i>	CCTGATCGGATCGAGCTCAC	GATTAGCTGCGGATTGTGG	360
<i>PfUGT75C1</i>	CCCGTAAGCTGGTAAGCTCC	GAGGAGATGCCGAGGTCTTG	310
<i>SQE</i>	TCTCCTTAAGCCGTTGCCTG	GCGAAGGGAATGGCAGTAGT	323
<i>SQS</i>	TCCCCAGATCATGGCAATCG	GGCGAGAATGGCAAACAAGA	358
<i>PfUGT73CR1</i>	CTACGCGAAGGCGATAGGTT	TGTCACGAATCCTCCAACCG	397

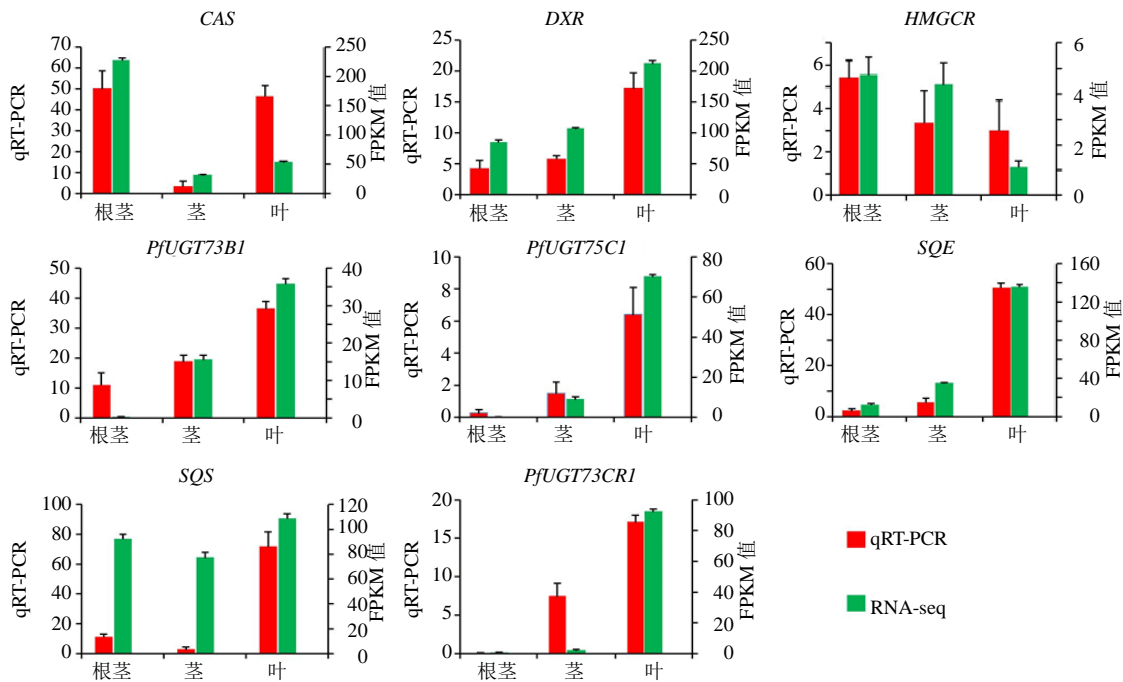


图8 qRT-PCR 验证转录组测序数据

Fig. 8 qRT-PCR validation of RNA sequencing data

4 讨论

通常，植物合成特定的次生代谢产物帮助其适应逆境，如食草动物损伤和微生物感染可以刺激植物防御类化合物的积累^[37]。三萜皂苷类次生产物具抗菌、杀虫、抗草食、植物毒性等广泛的生物活性^[1,3,38]。相比其他重楼属植物，球药隔重楼更喜生长于易被微生物和蚊虫感染的阴湿环境，富含螺甾烷型三萜皂苷类成分可能是其遗传特性和环境互作的结果。参与螺甾烷型三萜皂苷生物合成的基因表达和该类成分的 HPLC 定量结果，反映了球药隔重楼茎、叶和根茎在该类皂苷生物合成和积累中的不同作用。本研究中，螺甾烷型三萜皂苷总体上在根茎中积累水平比较高，这与云南重楼等其他同属植物测定结果一致^[6-7,26]，但偏诺皂苷在球药隔重楼中积累更加丰富，如其他重楼中很难检测到的重楼皂苷 VI^[7,39]。此外，茎和叶中也积累了一定数量的三萜皂苷，特别是重楼皂苷 VII。因此，球药隔重楼是偏诺皂苷类成分来源的理想植物材料，同时，地上部分具有资源替代利用的潜力。

2010 年，Pellicer 等^[40]用流式细胞仪分析日本重楼 *Paris japonica*，发现其基因组大小高达约 150 Gb，是最大的真核生物基因组之一，可见重楼属植物在植物进化过程中占有举足轻重的作用，巨大的

基因组也制约了该属植物基因组的获取，因此，关于该属植物基因层面的研究主要集中于转录组和叶绿体基因组等。Gao 等^[26]利用 RNA-seq 技术对云南重楼营养期和果期的叶和根茎分别进行转录组测序，拼接获得了 85 677 条 unigenes，N50 为 668 bp，仅 34 020 条 (39.71%) unigenes 被成功注释。Yang 等^[41]同样利用 RNA-seq 对华重楼花期的根、根茎、茎、叶和花进行转录组测序，获得了 57 537 条 unigenes，N50 为 664 bp，平均长度为 992 bp，有 33 449 条 (58.13%) 被成功注释。本研究获得了球药隔重楼的 61755 条非冗余 unigenes，平均长度为 971.5 bp，N50 为 1399 bp，30 263 条 (49.0%) unigenes 被成功注释，三萜皂苷生物合成途径基因分析中，除 3-SR 基因未检测到外，其余通路基因均同源 blast 到，以上结果表明本研究的 RNA-seq 转录组数据，用于研究重楼三萜皂苷合成途径基因是科学可靠的，亦可为今后该品种分子研究提供一定的数据支撑。

三萜重楼甾体皂苷下游合成密切相关的“steroid biosynthesis”的 DEGs 主要在根茎中富集，合成途径下游关键基因也主要在根茎中表达；“terpenoid backbone biosynthesis”途径和“steroid biosynthesis”途径不仅是三萜重楼甾体皂苷生物合

成的中间步骤,也是类胡萝卜素生物合成不可缺少的步骤^[42],而类胡萝卜素生物合成相关基因主要在叶和茎中高表达。此外,油菜素甾醇代谢途径(brassinosteroid biosynthesis)也需要消耗三萜甾体途径的中间产物^[43],而“Brassinosteroid biosynthesis”途径基因主要在叶和茎中高表达。这些因素可能限制了叶片和茎生物合成重楼甾体皂苷的能力。三萜甾体皂苷生物合成途径中的关键酶基因研究表明,MVA途径中的HMGCR和甾体类化合物下游代谢总开关的CAS为代谢途径上的限速酶^[44];此外,最近在本氏烟草中异源合成胆甾烯醇的研究表明,SSR1-3、SMO1-3、CPI-5、CYP51G、SMO2-2和C5-SD1对胆甾烯醇的合成有显著影响^[44];而本研究中除上述8个关键酶外,发现IDI、8,7SI-4、CYP90G4、C14-R-2、CYP94D108、HMGCS、SQS、ispH和DXR也可能显著影响着重楼三萜甾体皂苷的积累,这些关键酶可作为实现人工精准调控重楼皂苷积累的潜在靶标基因。Hua等^[12]利用PacBio三代测序平台对云南重楼进行了全长转录组测序,从39 875条unigenes中鉴定到了199条UGTs,系统发育分析将其分到11个不同的组(A~E、I、J、L、O、P和OG),其中D组的UGT73家族成员最多。本研究中,仅鉴定到61条UGTs,这可能是重楼属UGT基因在不同生长期的转录水平有巨大差异导致(本研究仅检测了果期,而全长转录组检测多个时期),也可能是因球药隔重楼和云南重楼的遗传背景差异所致。此外,本研究中61条UGTs划分到了13个不同的组(A~G、I、J、L、M、O和OG),较云南重楼多了F、G和M组,缺失了P组,这表明球药隔重楼UGT基因较云南重楼发生了明显的分化,可能是该植物三萜皂苷较同属其他植物差异的原因之一,球药隔重楼中D组UGT73家族的成员也是最多的,这与前人研究结果一致^[12, 32]。已有研究表明,OG组的UGT成员主要负责修饰甾醇和脂类化合物^[45-46],螺甾烷型重楼皂苷属于三萜甾醇类皂苷,因此该组的UGT基因(即UGT80家族)也是值得重点关注的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Gupta D D, Mishra S, Verma S S, et al. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of diosgenin enriched *Paris polyphylla* rhizome extract of Indian Himalayan landraces [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021,

270: 113842.

- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 108.
- [3] Puwein A, Thomas S C. An overview of *Paris polyphylla*, a highly vulnerable medicinal herb of eastern Himalayan region for sustainable exploitation [J]. *Nat Prod J*, 2020, 10(1): 3-14.
- [4] Ding Y G, Zhao Y L, Zhang J, et al. The traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties of *Paris L.* (Liliaceae): A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 278: 114293.
- [5] 管鑫, 李若诗, 段宝忠, 等. 重楼属植物化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. *中草药*, 2019, 50(19): 4838-4852.
- [6] Man S L, Gao W Y, Zhang Y J, et al. Qualitative and quantitative determination of major saponins in *Paris* and *Trillium* by HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(29): 2943-2948.
- [7] 刘巨钊, 马苗苗, 田晓黎, 等. 基于文献计量学的重楼研究现状及热点分析 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(11): 2347-2356.
- [8] Tholl D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2015, 148: 63-106.
- [9] Wang J F, Li S Y, Xiong Z Q, et al. Pathway mining-based integration of critical enzyme parts for *de novo* biosynthesis of steviolglycosides sweetener in *Escherichia coli* [J]. *Cell Res*, 2016, 26(2): 258-261.
- [10] Gao J X, Chen Y G, Li D S, et al. Cloning and functional characterization of a squalene synthase from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Chem Biodivers*, 2021, 18(7): e2100342.
- [11] Laranjeira S, Amorim-Silva V, Esteban A, et al. *Arabidopsis* squalene epoxidase 3 (SQE3) complements SQE1 and is important for embryo development and bulk squalene epoxidase activity [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(7): 1090-1102.
- [12] Hua X, Song W, Wang K Z, et al. Effective prediction of biosynthetic pathway genes involved in bioactive polyphyllins in *Paris polyphylla* [J]. *Commun Biol*, 2022, 5(1): 50.
- [13] Darnet S, Bard M, Rahier A. Functional identification of sterol-4 α -methyl oxidase cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by complementation of a yeast *erg25* mutant lacking sterol-4 α -methyl oxidation [J]. *FEBS Lett*, 2001, 508(1): 39-43.
- [14] Yin X, Liu J, Kou C X, et al. Deciphering the network of cholesterol biosynthesis in *Paris polyphylla* laid a base

- for efficient diosgenin production in plant chassis [J]. *Metab Eng*, 2023, 76: 232-246.
- [15] Lovato M A, Hart E A, Segura M J, *et al.* Functional cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding cycloeucaleanol cycloisomerase [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(18): 13394-13397.
- [16] Kushiro M, Nakano T, Sato K, *et al.* Obtusifoliol 14 α -demethylase (CYP51) antisense *Arabidopsis* shows slow growth and long life [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 285(1): 98-104.
- [17] Schrick K, Mayer U, Horrichs A, *et al.* FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(12): 1471-1484.
- [18] Grebenok R J, Ohnmeiss T E, Yamamoto A, *et al.* Isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* C-8, 7 sterol isomerase: Functional and structural similarities to mammalian C-8, 7 sterol isomerase/emopamil-binding protein [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 38(5): 807-815.
- [19] Husselstein T, Schaller H, Gachotte D, *et al.* Delta7-sterol-C₅-desaturase: Molecular characterization and functional expression of wild-type and mutant alleles [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 39(5): 891-906.
- [20] Lecain E, Chenivresse X, Spagnoli R, *et al.* Cloning by metabolic interference in yeast and enzymatic characterization of *Arabidopsis thaliana* sterol delta 7-reductase [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(18): 10866-10873.
- [21] Choe S, Dilkes B P, Gregory B D, *et al.* The *Arabidopsis* dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 1999, 119(3): 897-907.
- [22] Christ B, Xu C C, Xu M L, *et al.* Repeated evolution of cytochrome P450-mediated spiroketal steroid biosynthesis in plants [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3206.
- [23] Chen Y, Yan Q, Ji Y, *et al.* Unraveling the serial glycosylation in the biosynthesis of steroidal saponins in the medicinal plant *Paris polyphylla* and their antifungal action [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 5: 33.
- [24] Zhao W S, Gao W Y, Huang L Q, *et al.* Study on the chemical constituents of the *Paris fargesii* [J]. *Natl Prod Res Devel*, 2011, 23(6): 1017-1020.
- [25] 汪瑶, 薛丹, 文飞燕, 等. HPLC 测定球药隔重楼中的 5 种重楼皂苷 [J]. 华西药学杂志, 2015, 30(4): 469-470.
- [26] Gao X Y, Zhang X, Chen W, *et al.* Transcriptome analysis of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* illuminates the biosynthesis and accumulation of steroidal saponins in rhizomes and leaves [J]. *Phytochemistry*, 2020, 178: 112460.
- [27] Hou L X, Zhang F R, Yuan X C, *et al.* Comparative transcriptome analysis reveals key genes for polyphyllin difference in five *Paris* species [J]. *Physiol Plant*, 2022, 174(6): e13810.
- [28] 尹显梅, 张开元, 蒋桂华, 等. 华重楼皂苷类成分的动态分布规律对药材质量的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1199-1204.
- [29] Kempinski C, Chappell J. Engineering triterpene metabolism in the oilseed of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17(2): 386-396.
- [30] MacKenzie P I, Owens I S, Burchell B, *et al.* The UDP glycosyltransferase gene superfamily: Recommended nomenclature update based on evolutionary divergence [J]. *Pharmacogenetics*, 1997, 7(4): 255-269.
- [31] Li Y, Baldauf S, Lim E K, *et al.* Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(6): 4338-4343.
- [32] Wilson A E, Tian L. Phylogenomic analysis of UDP-dependent glycosyltransferases provides insights into the evolutionary landscape of glycosylation in plant metabolism [J]. *Plant J*, 2019, 100(6): 1273-1288.
- [33] Koja E, Ohata S, Maruyama Y, *et al.* Identification and characterization of a rhamnosyltransferase involved in rutin biosynthesis in *Fagopyrum esculentum* (common buckwheat) [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018, 82(10): 1790-1802.
- [34] Brugliera F, Holton T A, Stevenson T W, *et al.* Isolation and characterization of a cDNA clone corresponding to the Rt locus of *Petunia hybrida* [J]. *Plant J*, 1994, 5(1): 81-92.
- [35] Nagashima S, Hirotsani M, Yoshikawa T. Purification and characterization of UDP-glucuronate: Baicalein 7-O-glucuronosyltransferase from *Scutellaria baicalensis* Georgi. cell suspension cultures [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53(5): 533-538.
- [36] Pandey R P, Malla S, Simkhada D, *et al.* Production of 3-O-xylosyl quercetin in *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(5): 1889-1901.
- [37] Yang C Q, Fang X, Wu X M, *et al.* Transcriptional regulation of plant secondary metabolism [J]. *J Integr Plant Biol*, 2012, 54(10): 703-712.
- [38] Waller G R, Yamasaki K. *Saponins used in traditional and modern medicine* [M]. Berlin: Springer Science & Business Media, 2013.

- [39] 张绍山, 刘璇, 王景富, 等. UPLC 法测定云南省不同地区云南重楼及多芽品系中 7 种甾体皂苷量及其指纹图谱建立 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4257-4263.
- [40] Pellicer J, Fay M F, Leitch I J. The largest eukaryotic genome of them all? [J]. *Bot J Linn Soc*, 2010, 164(1): 10-15.
- [41] Yang Z Y, Yang L F, Liu C K, et al. Transcriptome analyses of *Paris polyphylla* var. *chinensis*, *Ypsilandra thibetica*, and *Polygonatum kingianum* characterize their steroidal saponin biosynthesis pathway [J]. *Fitoterapia*, 2019, 135: 52-63.
- [42] Sandmann G. Diversity and origin of carotenoid biosynthesis: Its history of coevolution towards plant photosynthesis [J]. *New Phytol*, 2021, 232(2): 479-493.
- [43] Hou L X, Yuan X C, Li S, et al. Genome-wide identification of *CYP72A* gene family and expression patterns related to jasmonic acid treatment and steroidal saponin accumulation in *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20): 10953.
- [44] 尹艳, 关红雨, 张夏楠. 甾体皂苷生物合成相关酶及基因研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(8): 1332-1336.
- [45] Paquette S, Møller B L, Bak S. On the origin of family 1 plant glycosyltransferases [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(3): 399-413.
- [46] Stucky D F, Arpin J C, Schrick K. Functional diversification of two UGT80 enzymes required for sterol glucoside synthesis in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2015, 66: 189-201.

[责任编辑 时圣明]