

调控甘松中倍半萜类化合物积累的转录因子分析

何 斌^{1,2,3}, 曲别阿香^{1,2,3}, 李 敏^{1,2,3}, 罗梦婷^{1,2,3}, 青 贤⁴, 刘十祎⁴, 苏 琪⁴, 李 莹^{2,3}, 陈 晨^{2,3}, 刘 圆^{2,3}, 阎新佳^{2,3}, 李文兵^{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
4. 四川香原珍稀中药科技开发有限公司, 四川 马尔康 624011

摘要: **目的** 筛选参与调控甘松 *Nardostachys jatamansi* 主要活性倍半萜类化合物积累的 bHLH、bZIP、MYB 家族转录因子。**方法** 利用甘松全长转录组数据库注释信息获取 bHLH、bZIP、MYB 家族转录因子, 利用 WGCNA 分析潜在能正向调控主要倍半萜类化合物积累的转录因子, 利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 进一步确认候选转录因子是否影响甘松主要活性倍半萜类化合物的积累, 利用 MEME 在线网站分析候选 bHLH、bZIP、MYB 基因家族成员的保守基序。**结果** 在甘松全长转录组数据中分别筛选出 bHLH 家族 893 个、bZIP 家族 416 个、MYB 家族 436 个, WGCNA 分析筛选能正向调控萜类化合物生物合成的转录因子共 458 个, qRT-PCR 确认候选转录因子的表达水平与甘松主要活性倍半萜类化合物的积累水平高度正相关。**结论** 甘松主要倍半萜类化合物的积累可能受到本研究筛选的 458 个转录因子的正向调控作用, 可作为甘松主要药效物质生物合成调控机制研究的潜在靶基因。

关键词: 甘松; 转录因子; WGCNA; qRT-PCR; 倍半萜类

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)15-5222-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.15.021

Analysis of transcription factors regulating accumulation of sesquiterpenoids in *Nardostachys jatamansi*

HE Bin^{1,2,3}, QUBIE Axiang^{1,2,3}, LI Min^{1,2,3}, LUO Mengting^{1,2,3}, QING Xian⁴, LIU Shiyi⁴, SU Qi⁴, LI Ying^{2,3}, CHEN Chen^{2,3}, LIU Yuan^{2,3}, YAN Xinjia^{2,3}, LI Wenbing^{2,3}, ZHANG Shaoshan^{2,3}

1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China
2. Sichuan Technology and Engineering Laboratory of QiangYi 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
4. Sichuan Xiangyuan Rare Chinese Medicine Technology Development Co., Ltd., Maerkang 624011, China

Abstract: Objective To screen transcription factors (TFs) of bHLH, bZIP, MYB family involved in regulating the accumulation of major active sesquiterpenoids in Gansong (*Nardostachys jatamansi* DC.). **Methods** The TFs of bHLH, bZIP, and MYB families were obtained by the annotation information of the full-length transcriptome database of *N. jatamansi*. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was used to analyze potential TFs that can positively regulate the accumulation of major sesquiterpenoids. Using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) to further confirm whether candidate TFs affect the accumulation of active sesquiterpenoids in *N. jatamansi*. MEME online website was used to analyze the conserved motifs of bHLH, bZIP, and MYB gene family members. **Results** A total of 893 members of bHLH

收稿日期: 2024-01-02

基金项目: 四川省自然科学基金资助项目 (24ZDYF1401); 四川省药品检验研究院/国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室开放课题资助 (中成药-2024-KFKT-001); 中央高校基本科研业务费专项资金研究类项目 (2023NYXXS082)

作者简介: 何 斌 (2000—), 男, 硕士研究生, 主要从事民族药品质评价及品质形成分子机制研究。E-mail: 892731051@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

family, 416 members of bZIP family, and 436 members of MYB family were screened from the full-length transcriptome of *N. jatamansi*; 458 TFs that can positively regulate the accumulation of sesquiterpenoids were obtained by WGCNA, and qRT-PCR confirmed that the expression levels of candidate TFs were highly positively correlated with the accumulation levels of the major active sesquiterpene compounds of *N. jatamansi*. **Conclusion** The accumulation of major sesquiterpenoids in *N. jatamansi* may be positively regulated by the 458 TFs screened in this study, which can be used as potential target genes for the study of the biosynthesis regulation mechanism of major sesquiterpenoids in *N. jatamansi*.

Key words: *Nardostachys jatamansi* (D. Don) DC.; transcription factor; WGCNA; qRT-PCR; sesquiterpenoids

甘松 *Nardostachys jatamansi* (D. Don) DC. 为败酱科甘松属植物, 主产于四川、甘肃、云南、西藏等地区。《中国药典》2020 年版收载其药用部位为根和根茎, 具有理气止痛、开郁醒脾的功效^[1]。同时, 甘松也可作为常用芳香药材在印度、日本等其他传统医学体系中使用^[2-4], 其精油提取物在日化品行业具有广阔的应用价值^[5]。随着甘松的市场需求与日俱增, 致使甘松的野生资源遭到严重破坏, 被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》1979、2007、2013、2023 年版附录II中, 《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》(IUCN 2020 年) 以及《国家重点保护野生植物名录》(2021 年) 二级保护植物^[6-8]。因此, 为了可持续利用甘松资源, 开展其资源保护与品质形成机制等研究至关重要。

迄今为止, 从甘松中分离和鉴定了许多具有广泛生物活性的化合物, 例如木脂素、生物碱、新木脂素、香豆素、倍半萜及其衍生物, 其中, 倍半萜类化合物是甘松根和根茎的主要化学成分, 与甘松的不同药用目的直接相关^[9-11]。对广泛用于制药和化妆品行业的甘松精油的物质基础分析表明, 其含有 β -eudesmol、elemol、 α -广藿香、 β -广藿香、calalene、广藿香醇、缬草醛、nardostachnol、seychellene、seychelane、nardostachone 等多种倍半萜化合物^[10-12]。非挥发性成分中, 甘松新酮类倍半萜化合物是甘松的重要活性成分, 药理研究表明, 甘松新酮类物质具有显著的神经保护、心脏保护、抗炎等活性, 在治疗细菌感染、牙周炎、心脏病、神经退行性疾病和癌症方面具有巨大潜力^[13-15], 这类倍半萜化合物中, 甘松新酮的含量最高, 根茎中的积累水平超过 2%^[16]。甘松新酮也是《中国药典》2020 年版中甘松项下唯一的指标成分。

萜类化合物生物合成过程中会受到转录因子的调控作用。研究表明, basic helix-loop-helix (bHLH) 家族转录因子在调控非青蒿素倍半萜化合物生物合成中具有重要作用^[17], 也在响应冷胁迫方面发挥重要功能^[18], 同时可作为 MEP 通路的正向调节因子

发挥作用^[19]; basic leucine zipper (bZIP) 家族转录因子在植物生长发育方面发挥着重要作用^[20], 同时能够影响植物次生代谢产物的积累^[21]; MYB 家族转录因子可以正向调控萜类化合物的合成, 如在黄花蒿 *Artemisia annua* L. 中正向调控倍半萜过氧化物“青蒿素”的合成^[22], 以及正向调控白桦 *Betula platyphylla* Suk. 中三萜类化合物的合成^[23]。因此, 本研究利用课题组前期得到的甘松二代和三代转录组数据库, 从中筛选注释为 bHLH、bZIP、MYB 家族的转录因子, 利用基因表达水平与主要倍半萜代谢物积累水平的共表达分析和实时荧光定量分析 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR), 挖掘潜在正向调控甘松中倍半萜类化合物的转录因子, 为甘松品质形成分子机制研究提供依据。

1 材料

1.1 样品

本研究所用甘松植株均采自四川省红原县西南民族大学青藏高原甘松种植基地, 经西南民族大学草地资源学院刘圆教授和张绍山博士鉴定为甘松 *N. jatamansi* (D. Don) DC.。随机挑选种植基地长势均匀的两年生甘松 15 株, 均分为 3 组, 取每组植株的花、叶、花柄、根各装于洁净的自封袋中, 迅速用液氮固定, 于 -80 °C 冻存。

1.2 试剂与仪器

RNA 提取试剂盒 FastPure® Universal Plant Total RNA Isolation Kit、RNA 反转录试剂盒 HiScript® II QRT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) Kit、qRT-PCR 试剂盒 2 × Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix Kit 均购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司。NanoPhotometer® N60 超微量紫外-可见光分光光度计 (IMPLEN 公司, 德国), QuantStudio™ 5 荧光定量 PCR 仪 (Thermo 公司, 美国)。

2 方法

2.1 bHLH、bZIP、MYB 家族基因的获取

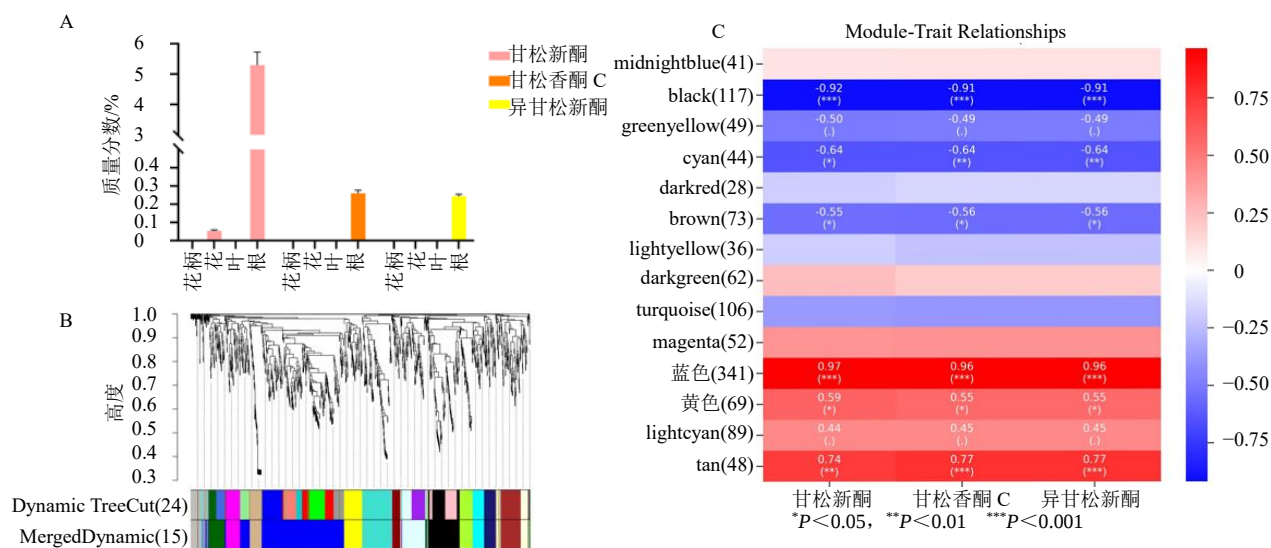
bHLH、bZIP、MYB 家族转录因子序列来源于

课题组前期建立的甘松全长转录组数据库, 原始数据 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 登录号为 PRJNA841858^[24]。根据全长转录组的注释信息筛选, 按家族分类保存相应蛋白序列。

2.2 参与主要倍半萜类化合物的 bHLH、bZIP、MYB 家族转录因子

甘松 bHLH、bZIP、MYB 家族转录因子的表达量矩阵来源于课题组前期数据 (图 1)^[24], 即将各甘松样本获得二代转录组 clean reads (NCBI 登录号为 PRJNA858921) 映射到全长转录组获取的 bHLH、bZIP、MYB 家族序列, 计算 bHLH、bZIP、MYB 在

各甘松样本中的 FPKM (Fragments per kilobase per million) 值。二代转录组测序各样本中主要倍半萜化合物: 甘松新酮、甘松香酮 C 和异甘松新酮的含量数据来源于前期数据库, 见图 1-A^[24]。使用 R 软件 (R version 3.4.4) 中的 WGCNA 包 (R version 1.6.6) 构建加权基因共表达网络。利用 WGCNA 包中的 pick Soft Threshold 函数计算权重值, 根据不同软阈值下的网络拓扑结构分析结果, 选择软阈值 power=26, 使用默认参数利用函数 blockwise Modules 构建无尺度网络。采用 R 语言的 WGCNA 包完成数据分析工作, 数据可视化部分, 由 R 语言和 Python 语言完成。



A-甘松根、花、叶、花柄中 3 种化学成分的含量测定结果; B-基因聚类树与样品分割; C-模块与含量的相关性分析。

A-determination of contents of three active sesquiterpenoids in roots, flowers, leaves and anthocaulus of *N. jatamansi*; B-gene clustering and module cutting; C-module-trait relationship.

图 1 WGCNA 分析候选转录因子

Fig. 1 WGCNA analysis of candidate transcription factors

2.3 qRT-PCR

2.3.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成 将-80 °C 冻存甘松材料放在液氮中暂存, 采用研钵充分研磨, 期间不断添加液氮使其保持低温状态, 然后按照植物总 RNA 提取试剂盒操作提取总 RNA。取约 500 ng 总 RNA 作为反转录模板, 采用反转录试剂盒反转录成 cDNA, 产物于-20 °C 保存。

2.3.2 基因筛选与引物合成 利用已报道的能正向调节萜类化合物积累的序列, 如拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. 中的 *AtMYC2*, 登录号为 AT1G32640^[25]; 拟南芥中的 *PIF5*, 登录号为 AT3G59060^[19]; 水稻 *Oryza sativa* L.^[26] 中的 *OsTGAP1*, 登录号为 AK073715^[21]; 拟南芥中的 *AtMYB61*, 登录号为 AT1G09540^[22]; 白桦中的

BpMYB21, 登录号为 MF574045^[23], blast 甘松全长转录组数据库, 将其蛋白序列与甘松的蛋白库进行同源比对, 设置阈值 $E\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$ 进行筛选, 获取其在甘松中的同源基因。所有同源基因通过 Primer Premier 6.0 软件设计引物, 引物由北京擎科生物科技有限公司合成 (表 1)。

2.3.3 qRT-PCR 按上述 qRT-PCR 试剂盒说明书进行。反应体系为 10.0 μL : 2 $\times$ 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 , 配制全过程在冰上完成。PCR 扩增程序: 95 °C、30 s; 95 °C、10 s, 55 °C、30 s, 共 40 个循环; 95 °C、15 s, 60 °C、60 s, 95 °C、15 s。每个样品设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复。以 *Actin* 作为内参基

表 1 引物核苷酸序列
Table 1 Nucleotide sequence of primers

名称	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
transcript_14687	TCATCCAGCCGCAAAGCTAA	CTGCCCATTTTGACAGTCGC
transcript_12507	TCTTCCCGGTCTGGCTTTTC	AGCTTTGAGCTTGTCTGGCT
transcript_19352	GACGAGCTCCAGAGCACAAAT	TTCCATGTTGAGCACCAGCA
transcript_28276	CGAAGGCTCGCTCAAAATCG	GCTGGAGCTCCTGTTCAAGT
transcript_27567	TGTAAGTGGCGAGGCGAAAT	ACGTCGCTGAAAGTCTCTGG
transcript_33422	CCTGCCGGTTAAGATGGTGT	AAGAGTCGGGCTATTGTGGC
<i>NjActin</i>	GGACCGCCGATTTTGAGACT	AGACCCTTCCATCAGGCAAAG

因。2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达水平。

2.3.4 数据处理与分析 数据整理在 Excel 中进行, *t* 分析差异显著性检验, GraphPad Prism 8 中绘制图表。

2.4 候选 bHLH、bZIP、MYB 转录因子蛋白保守基序 (motif) 分析

利用 MEME (<https://memesuite.org/meme/tools/meme>) 分析 WGCNA 获取的 bHLH、bZIP、MYB 家族转录因子蛋白保守基序 (motif) 及其分布。

3 结果与分析

3.1 甘松 bHLH、bZIP、MYB 家族基因的获取

根据甘松全长转录组数据库中的注释结果, 获取到了 3 个家族共 1 745 个转录因子。其中, 893 个 bHLH 家族转录因子、416 个 bZIP 家族转录因子、436 个 MYB 家族转录因子。

3.2 WGCNA 筛选甘松转录因子

利用 WGCNA 包中的 good Samples Genes 函数检测并过滤掉 1 745 个转录因子中表达量变化波动较低 (标准偏差 ≤ 0.5) 的基因, 最终获得 1 194 个表达基因。利用 WGCNA 包内的 pick Soft Threshold 函数计算并选择权重值 $\beta=26$ ($R^2=0.8$), 实现所有基因构成的关系网络符合无尺度网络分布。按权重值 $\beta=26$, 计算并获得每 2 个基因间的拓扑重叠矩阵 (topological overlap matrix, TOM); 之后采用动态剪切算法进行共表达网络模块划分, 最终得到 15 个共表达模块 (图 1-B), blue 模块包含的基因最多, 有 341 个; darkred 模块包含的基因最少, 仅 28 个; blue、yellow、tan 3 个模块与 3 个倍半萜类成分含量呈显著正相关, 表明这些模块中的 458 个转录因子可作为研究正向调控甘松倍半萜类成分积累的转录因子 (图 1-C)。对 3 个模块中的 458 个

转录因子分析, 214 个归类为 bHLH 家族, 110 个归类为 bZIP 家族, 134 个归类为 MYB 家族。

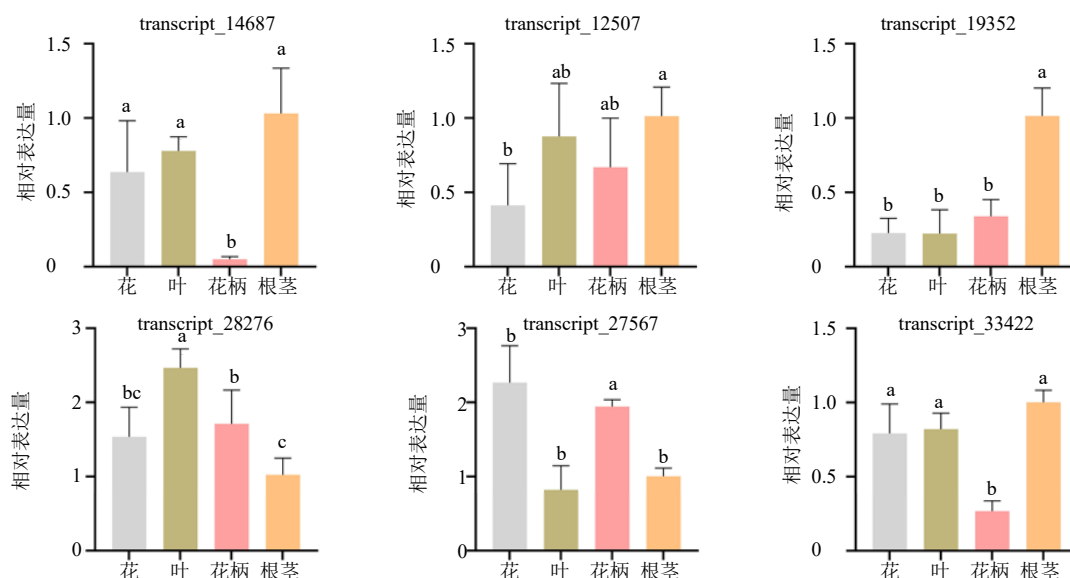
3.3 qRT-PCR 验证 WGCNA 分析结果

为了进一步确认 WGCNA 分析结果的可靠性, 检索已报道能对萜类化合物有正向调控作用的转录因子, 主要选择了以下 6 个: 调控拟南芥中倍半萜合酶基因表达的 *AtMYC2*; 调控拟南芥中 MEP 途径的 *PIF5*; 调控青蒿中青蒿素合成的 *AabZIP1*; 调控水稻 *Oryza sativa* L. 中二萜类化合物合成的 *OsTGAPI*; 调控拟南芥中萜类合成的 *AtMYB61*; 调控白桦中三萜化合物合成的 *BpMYB21*。在甘松中这 6 个基因的同源基因分别为 transcript_14687、transcript_12507、transcript_19352、transcript_28276、transcript_27567、transcript_33422。

甘松中 6 个同源基因的荧光定量结果见图 2。6 个转录因子在甘松不同部位的表达量中, transcript_14687、transcript_12507、transcript_19352、transcript_33422 在甘松根茎中的表达量最高, 前期研究表明甘松中倍半萜类成分在根茎中含量高, 这 4 个转录因子的表达水平与化合物积累趋势一致。检索 WGCNA 分析获得的 458 个候选转录因子数据库, 发现了这 4 个转录因子, 这支持了 WGCNA 分析结果的可靠性。另外 2 个转录因子 transcript_28276 和 transcript_27567 的表达量与甘松中倍半萜类成分积累规律不一致, 且本研究在 458 个候选转录因子数据库中没有检索到 transcript_28276 和 transcript_27567, 这进一步验证了 WGCNA 分析结果的可靠性。

3.4 候选转录因子蛋白保守基序分析

利用 MEME 在线软件分析了 WGCNA 获取的候选转录因子蛋白的保守基序。214 个 bHLH 蛋白的 10 个基序 (motif1~motif10), 长度为 29~50 aa,



不同字母表示差异显著 $P < 0.05$ 。

Different letters indicate significant differences $P < 0.05$.

图 2 6 个转录因子在甘松不同部位的表达量

Fig. 2 Expression of six TFs in different parts of *N. jatamansi*

其中 motif5 (ERKRREKJNDRFKALRAVVP-NISKMDKASLLGDTIKYMNEL) 在 bHLH 中出现的次数较多 (图 3), 且含有 bHLH 蛋白保守结构域的特征基序 (HX3ERXRRX9LX4PX3KXDX14L) (X 表示任意氨基酸残基, 数字表示此处的氨基酸数目), 这与黄花蒿中 bHLH 转录因子家族研究结果相似^[27]。110 个 bZIP 蛋白的 10 个基序 (motif1~motif10), 长度为 41~50 aa, 其中 motif5 (EKKKKKIKEVSHEWELVNKQKPIWLRKPEEITKEEYAAFYK) 和 motif10 (WEEPLAVKHFSAEQGVEFKAVLFVPPRAPFDLFDTKKKPNK) 在 bZIP 中出现的次数较多 (图 4), 且包含了高度保守的氨基酸残基 (N-X7-R/K), 推测可能是甘松 bZIP 家族转录因子的保守基序, 这与苹果 *Malus × domestica* Borkh. 中 bZIP 转录因子研究结果相似^[28]。134 个 MYB 蛋白的 10 个基序 (motif1~motif10), 长度为 29~50 aa, 其中 motif1 (RAIAKAGFS-KPTPIQAQSWPIALQGRDIIGIAKTGSGKTLAFLJPALEHL) 在 MYB 中出现的次数较多 (图 5), 且具有保守的色氨酸残基, 这与漆树 *Toxicodendron vernicifluum* (Stokes) F. A. Barkl. 中 MYB 转录因子的研究结果相似^[29]。

4 讨论

bHLH、bZIP、MYB 家族转录因子与植物多项

生理活动密切相关, 且萜类化合物在植物对抗和适应生态环境的过程中发挥重要作用。拟南芥中 bHLH 转录因子 *POPEYE* (*PYE*) 在缺铁条件下会正向调控植物的生长发育, 通过调节维持铁稳定的基因和其他参与转录、发育的基因的表达来维持铁稳态^[30]。小麦 *Triticum aestivum* L. 中的 *TabHLH1* 通过转录调控编码磷酸盐转运蛋白、硝酸根转运蛋白和抗氧化酶, 提高其表达量, 从而介导营养胁迫下磷和氮的摄取, 对磷和氮缺失的土壤小麦种植具有一定的指导意义^[31]。bZIP 转录因子 *PqbZIP1* 在烟草 *Nicotiana tabacum* L. 中表达, 发现茉莉酸、水杨酸和脱落酸的含量增加^[32]。苹果 *Malus domestica* Mill. 中的 *MdZIP44* 可以增强下游靶点基因的启动子来促进脱落酸处理下的花青素的积累^[33]。源于苦荞 *Fagopyrum esculentum* (L.) Gaertn. 的 *FtMYB13* 转录因子可以改善拟南芥的耐盐性和耐旱性^[34]。番红花 *Crocus sativus* L. 转录因子 *CstMYB1* 和 *CstMYB1R2* 可以调节类胡萝卜素的生物合成^[35]。值得注意的是, 在调节植物的生命活动时, 在很多情况下, 不同家族转录因子之间会相互影响, 共同发挥调控作用。如云南红梨 *Pyrus pyrifolia* L. 中的 *PyMYB10*、*PybHLH* 和 *PyWD40* 转录因子形成三元复合物来调控花青素的生物合成和积累^[36]。薄荷 *Mentha piperita* L. 中的 bHLH、bZIP、MYB 家族的转录因子通过调控

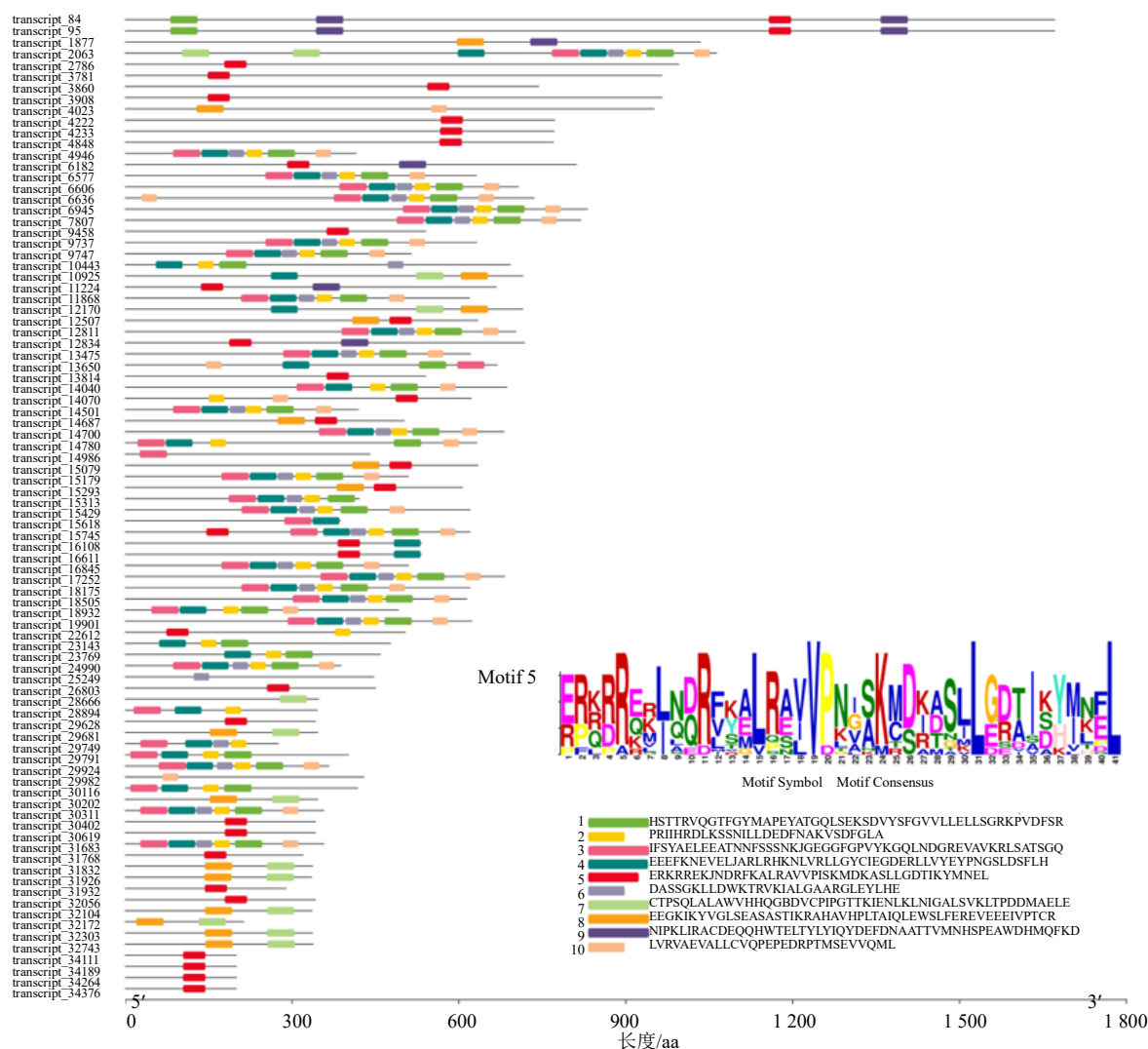


图 3 候选 bHLH 转录因子家族 motif 分布及主要保守基序的氨基酸残基 logo 图

Fig. 3 Motif analysis of candidate bHLH TFs in *N. jatamansi* and logo map of major conserved motif

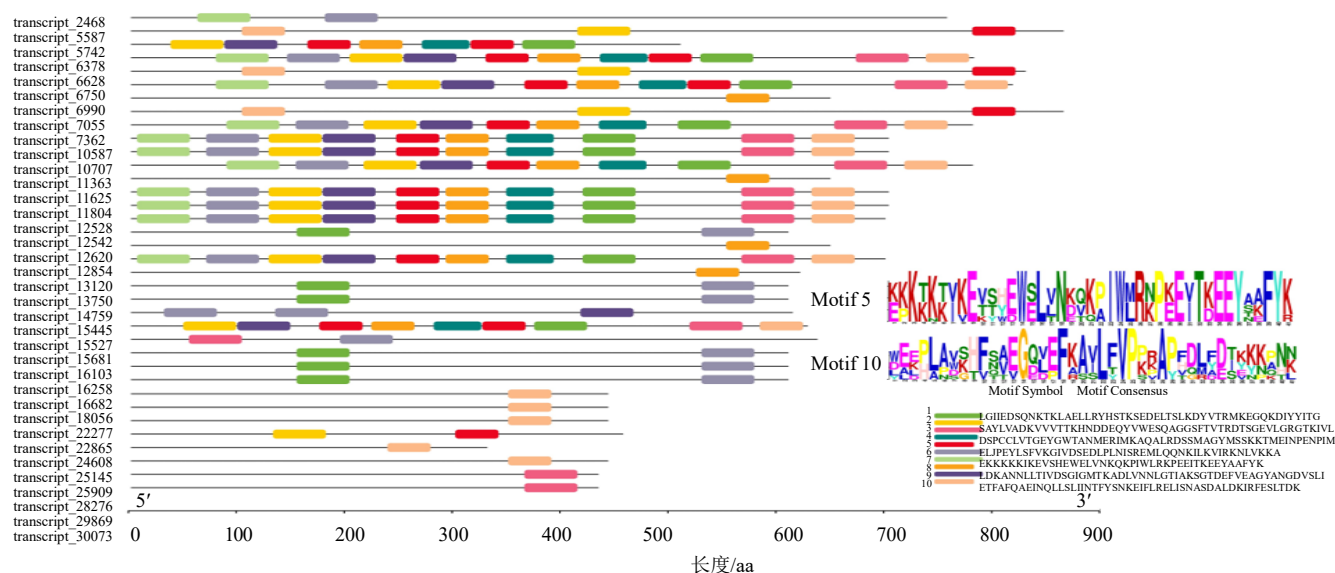


图 4 候选 bZIP 转录因子家族 motif 分布及主要保守基序的氨基酸残基 logo 图

Fig. 4 Motif analysis of candidate bZIP TFs in *N. jatamansi* and logo map of major conserved motifs



图 5 候选 MYB 转录因子家族 motif 分布及主要保守基序的氨基酸残基 logo 图

Fig. 5 Motif analysis of candidate MYB TFs in *N. jatamansi* and logo map of major conserved motif

(+)-柚酮还原酶 (PR) 和(-)-薄荷醇脱氢酶 (MD) 以及(-)-柠檬烯 6-羟化酶的表达模式来调控单帖化合物的积累和化学构型^[37]。目前, 尚未有甘松中影响倍半萜类主要活性成分的转录因子研究报道, 本研究首次分析了甘松 bHLH、bZIP、MYB 家族的转录因子, 并通过 WGCNA 分析和实时荧光定量实验验证, 建立了 458 个潜在对甘松中萜类成分的生物合成具有正向调控作用的转录因子数据库, 将为解析甘松萜类化合物生物合成途径和调控过程提供数据支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 87.
- [2] Venugopalan Nair S N, Ved D K, Ravikumar K, *et al.* Indian medicinal plants database (IMPLAD) and threatened medicinal plants of India [J]. *Conservat Utilizat Threat Med Plants*, 2020, 72: 63-92.
- [3] Chen K K, Mukerji B (Eds). Pharmacology of oriental plants: proceedings of the first international pharmacological meeting [J]. *Stockholm*, 1961, 8: 22-25.
- [4] Dhiman N, Bhattacharya A. *Nardostachys jatamansi* (D.

Don) DC.-Challenges and opportunities of harnessing the untapped medicinal plant from the Himalayas [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 246: 112211.

- [5] 马铃, 胡涛, 郭川川, 等. 盐析辅助水蒸气蒸馏法提取甘松精油及其挥发性香气成分分析 [J]. *中国酿造*, 2023, 42(3): 235-240.
- [6] 李世晋, 李波, 罗世孝. 濒危野生动植物种国际贸易公约中国重点植物 [M]. 北京: 北京日报出版社, 2020: 59.
- [7] Ved D, Saha D, Ravikumar K, *et al.* *Nardostachys jatamansi* [J]. *IUCN Red List Threat Speci*, 2015, e.T50126627A50131395.
- [8] Dhiman N, Kumar A, Kumar D, *et al.* De novo transcriptome analysis of the critically endangered alpine Himalayan herb *Nardostachys jatamansi* reveals the biosynthesis pathway genes of tissue-specific secondary metabolites [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 17186.
- [9] Kaur H, Lekhak M M, Chahal S, *et al.* *Nardostachys jatamansi* (D. Don) DC.: An invaluable and constantly dwindling resource of the Himalayas [J]. *S Afr N J Bot*, 2020, 135: 252-267.
- [10] Nautiyal O H. Anti-fungal activity of *Nardostachys*

- jatamansi* essential oil beneficial for treating (dermatophytosis) ringworm [J]. *Natural Products*, 2013, 9: 241-244.
- [11] Ram G, Bhatt M, Kothiyal P, *et al.* A review article on phytochemistry and pharmacological profiles of *Nardostachys jatamansi* DC-medicinal herb [J]. *J Pharmacogn Phytochem*, 2015, 3: 102-106.
- [12] Paudyal M P, Rajbhandari M, Basnet P, *et al.* Quality assessment of the essential oils from *Nardostachys jatamansi* (D. Don) dc and *Nardostachys chinensis* Batal obtained from Kathmandu valley market [J]. *Sci World*, 2012, 10(10): 13-16.
- [13] Wen J W, Wu J, Yu H Q, *et al.* Correlation analysis between genetic and chemical differences of *Nardostachys jatamansi* from different habitats in Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture, Sichuan Province, China [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2020, 92: 104133.
- [14] 崔琪, 俸明康, 丰日落, 等. 基于转录组信息的甘松 MADS-box 转录因子家族分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(3): 898-906.
- [15] Niu C G, Xiao F, Yuan K Y, *et al.* Nardosinone suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and attenuates lipopolysaccharide-induced alveolar bone resorption [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 626.
- [16] 薛静文, 万国慧, 李佳园, 等. 基于肠-脑轴理论探讨甘松对帕金森大鼠运动功能障碍的改善作用及机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(9): 2822-2831.
- [17] 周琪. AabHLH106 调控青蒿素倍半萜生物合成的功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2022.
- [18] 刘凯, 李洋, 张强, 等. 核桃 JrbHLH 转录因子家族鉴定与响应冷胁迫基因表达分析 [J]. *河北农业大学学报*, 2023, 46(5): 50-62.
- [19] Mannen K, Matsumoto T, Takahashi S, *et al.* Coordinated transcriptional regulation of isopentenyl diphosphate biosynthetic pathway enzymes in plastids by phytochrome-interacting factor 5 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(2): 768-774.
- [20] 张瑜, 原淑佳, 李瑞锋, 等. 植物 bZIP 转录因子生物学功能研究进展 [J]. *山西中医药大学学报*, 2023, 24(02): 221-225.
- [21] Okada A, Okada K, Miyamoto K, *et al.* OsTGAP1, a bZIP transcription factor, coordinately regulates the inductive production of diterpenoid phytoalexins in rice [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(39): 26510-26518.
- [22] Matías-Hernández L, Jiang W M, Yang K, *et al.* AaMYB1 and its orthologue AtMYB61 affect terpene metabolism and trichome development in *Artemisia annua* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2017, 90(3): 520-534.
- [23] 孙璐, 杨杰, 王思瑶, 等. 白桦 BpMYB21 基因的克隆及其表达模式分析 [J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2018, 42(4): 119-126.
- [24] Feng M K, Chen C, Qu-Bie J Z, *et al.* Metabolome and transcriptome associated analysis of sesquiterpenoid metabolism in *Nardostachys jatamansi* [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 1041321.
- [25] Hong G J, Xue X Y, Mao Y B, *et al.* *Arabidopsis* MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(6): 2635-2648.
- [26] Zhang F Y, Fu X Q, Lv Z Y, *et al.* A basic leucine zipper transcription factor, AabZIP1, connects abscisic acid signaling with artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(1): 163-175.
- [27] 甘雨, 吴端, 张栋, 等. 黄花蒿 bHLH 转录因子基因家族鉴定及光调控分析 [J]. *中国现代中药*, 2021, 23(3): 441-452.
- [28] 孙明岳, 周君, 谭秋平, 等. 苹果 bZIP 转录因子家族生物信息学分析及其在休眠芽中的表达 [J]. *中国农业科学*, 2016, 49(7): 107-127.
- [29] 谢冬冬, 王武萍, 何学高, 等. 基于转录组的漆树 MYB 转录因子的筛选及分析 [J]. *西北林学院学报*, 2021, 36(1): 108-116.
- [30] Long T A, Tsukagoshi H, Busch W, *et al.* The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in *Arabidopsis* roots [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(7): 2219-2236.
- [31] Yang T R, Hao L, Yao S F, *et al.* TabHLH1, a bHLH-type transcription factor gene in wheat, improves plant tolerance to Pi and N deprivation via regulation of nutrient transporter gene transcription and ROS homeostasis [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 104: 99-113.
- [32] Yang S S, Zhang X X, Zhang X M, *et al.* A bZIP transcription factor, PqbZIP1, is involved in the plant defense response of American ginseng [J]. *Peer J*, 2022, 10: e12939.
- [33] An J P, Yao J F, Xu R R, *et al.* Apple bZIP transcription factor MdbZIP44 regulates abscisic acid-promoted anthocyanin accumulation [J]. *Plant Cell Environ*, 2018, 41(11): 2678-2692.
- [34] Huang Y J, Zhao H X, Gao F, *et al.* A R2R3-MYB transcription factor gene, FtMYB13, from Tartary buckwheat improves salt/drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2018, 132: 238-248.
- [35] Bhat Z Y, Mohiuddin T, Kumar A, *et al.* *Crocus* transcription factors CstMYB1 and CstMYB1R2 modulate apocarotenoid metabolism by regulating carotenogenic genes [J]. *Plant Mol Biol*, 2021, 107(1/2): 49-62.
- [36] Cui D L, Zhao S X, Xu H N, *et al.* The interaction of MYB, bHLH and WD40 transcription factors in red pear (*Pyrus pyrifolia*) peel [J]. *Plant Mol Biol*, 2021, 106(4/5): 407-417.
- [37] An X, Wan J, Jiang H, *et al.* Transcriptome analysis of transcription factors and enzymes involved in monoterpenoid biosynthesis in different chemotypes of *Mentha haplocalyx* Briq [J]. *Peer J*, 2023, 11: e14914.

[责任编辑 时圣明]