

转录组分析揭示杯茎蛇菰三萜酯生物合成途径的关键基因

李翠霞^{1,2,3,4}, 王益娜^{1,2,3,4}, 赵 秀^{1,2,3,4}, 向贵生^{2,3,4}, 张广辉^{1,2,3,4*}, 杨生超^{1,2,3,4,5*}

1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201

2. 云南农业大学 西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心, 云南 昆明 650201

3. 云南农业大学 云南省药用植物生物学重点实验室, 云南 昆明 650201

4. 云南特色植物提取实验室, 云南 昆明 650106

5. 红河学院生物科学与农学院, 云南 蒙自 661199

摘要: **目的** 探究杯茎蛇菰 *Balanophora subcupularis* 中五环三萜酯生物合成途径的关键酶基因, 为其生物合成机制及蛇菰属药用植物资源开发利用奠定了一定的研究思路和理论基础。 **方法** 对杯茎蛇菰花柄、根茎和花序 3 个组织进行转录组测序与分析, 通过 PfamScan 搜索三萜酯生物合成候选酶基因, 并构建了 *BsubOSC*s 基因的酵母表达载体, 将其导入酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 羊毛甾醇合成酶基因 (*erg7*) 缺陷突变株 GIL77 中以表征其功能。 **结果** 从杯茎蛇菰转录组中挖掘到可能参与五环三萜酯生物合成的相关酶基因共 87 条, 其中大多数基因在花序中表达量最高, 说明花序可能是五环三萜酯的主要合成部位。 2 条 *BsubOSC*s 基因的酶功能表征发现 *BsubOSC2* 能够催化 2,3-氧化鲨烯生成 β -香树脂醇, 并没有检测到 *BsubOSC1* 的催化产物。 **结论** 通过转录组分析发现了杯茎蛇菰五环三萜酯的生物合成关键酶基因, 其中 *BsubOSC2* 为 β -香树脂醇合成酶基因, 是蛇菰素 A 生物合成的关键酶基因之一。为进一步解析蛇菰素等三萜酯化合物的生物合成途径提供了基因资源, 促进了杯茎蛇菰分子育种的研究。

关键词: 杯茎蛇菰; 转录组; 三萜酯生物合成; 氧化鲨烯环化酶; 酰基转移酶

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)01-0282-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.01.025

Transcriptome analysis revealing key genes of triterpene ester biosynthetic pathway in *Balanophora subcupularis*

LI Cuixia^{1,2,3,4}, WANG Yina^{1,2,3,4}, ZHAO Xiu^{1,2,3,4}, XIANG Guisheng^{2,3,4}, ZHANG Guanghui^{1,2,3,4}, YANG Shengchao^{1,2,3,4,5}

1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

2. National Local Joint Engineering Research Center for Germplasm Innovation and Utilization of Southwest Chinese Medicinal Materials in Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

3. Yunnan Key Laboratory of Medicinal Plant Biology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

4. Yunnan Characteristic Plant Extraction Laboratory, Kunming 650106, China

5. College of Biological and Agricultural Sciences, Honghe University, Mengzi 661199, China

Abstract: Objective To explore the key enzyme genes of the pentacyclic triterpene esters biosynthesis pathway in *Balanophora subcupularis*, which lays a certain research idea and theoretical foundation for its biosynthesis mechanism and the development and utilization of medicinal plant resources in the genus *Balanophora*. **Methods** Transcriptome sequencing and analysis was performed on the three tissues of the flowerstalk, rhizome and umbel of *B. subcupularis*, then searching the candidate enzyme genes involved in triterpene ester biosynthesis by PfamScan, constructing the yeast expression vector of *BsubOSC*s gene which was introduced into the *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol synthase gene (*erg7*)-deficient mutant strain GIL77 for functional characterization. **Results** A total of 87 candidate genes involved in pentacyclic triterpene esters biosynthesis were identified from the transcriptome of *B.*

收稿日期: 2025-08-06

基金项目: 云南特色植物提取实验室自主研究项目基金 (2022YKZY004)

作者简介: 李翠霞, 硕士研究生, 研究方向为药用植物合成生物学。Tel: 18487183726 E-mail: 2082554237@qq.com

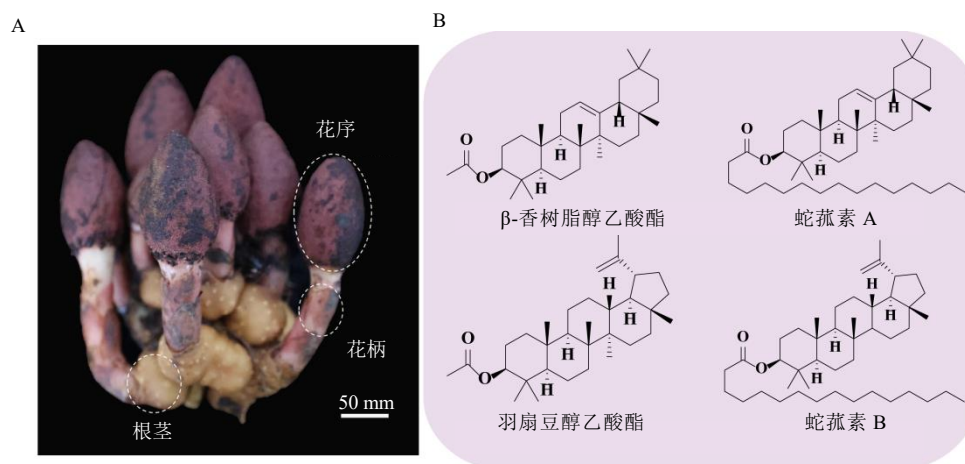
*通信作者: 杨生超, 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物资源评价与利用的研究工作。E-mail: shengchaoyang@163.com

subcupularis, most of them were highly expressed in umbel, suggesting that umbel may be the main site of synthesis of pentacyclic triterpene esters. The enzyme function of two *BsubOSC* genes were characterized, which was found that *BsubOSC2* could catalyze 2, 3-oxidosqualene to form β -amyrin, but no catalytic product of *BsubOSC1* was detected. **Conclusion** Based on transcriptome analysis, the key enzyme genes involved in pentacyclic triterpene esters biosynthesis were found in *B. subcupularis*, and *BsubOSC2* is a β -amyrin synthetase gene, and is one of the key enzyme genes for the biosynthesis of balanophorin A. This study provides gene resources for further analysis of the biosynthesis pathway of triterpene ester compounds such as balanophorins, and facilitate the research on molecular breeding of *B. subcupularis*.

Key words: *Balanophora subcupularis* P. C. Tam; transcriptome; triterpene ester biosynthesis; oxidosqualene cyclase; acyltransferase

蛇菰属 *Balanophora* J. R. et G. Forst. 是多年生肉质全寄生植物^[1], 分布于亚洲和大洋洲热带和亚热带地区, 我国云南、广东、广西、江西、湖南和福建等省和自治区均有分布^[2]。蛇菰属植物主要寄生于密林中的大果榕 *Ficus auriculata* Lour.、天仙果 *F. erecta* Thunb. 等植物^[3], 生长条件十分特殊, 尚未实现人工栽培。迄今为止, 已从蛇菰属植物中分离出 159 种化学成分, 具有抗氧化、神经保护、保护胃、细胞毒

性、止血等药理活性^[4]。蛇菰属植物含有特殊的五环三萜酯类化合物, 包括蛇菰素 A (β -香树脂醇棕榈酸酯)、蛇菰素 B (羽扇豆醇棕榈酸酯)、 β -香树脂醇乙酸酯和羽扇豆醇乙酸酯^[5-7] (图 1)。研究表明, 这类化合物具有降胆固醇^[8]、调血脂^[9]、抗糖尿病^[10]、抗肿瘤^[11-13]、保肝^[14]等多种生物活性。但目前对于蛇菰属植物中五环三萜酯的生物合成机制知之甚少。



A-杯茎蛇菰全株; B-蛇菰属植物中 4 个五环三萜酯类化合物结构。

A-whole plant of *Balanophora subcupularis* P. C. Tam; B-structures of four pentacyclic triterpene ester compounds in the genus *Balanophora* plants.

图 1 杯茎蛇菰及五环三萜酯结构

Fig. 1 *B. subcupularis* and structure of pentacyclic triterpene esters

三萜酯(酰基化三萜)是植物三萜的主要形式之一^[15]。五环三萜在自然界中分布广泛, 其中羽扇豆烷、齐墩果烷和乌苏果烷型占五环三萜酯已知构型的 95% 以上^[15]。根据其酰基配体的类型, 三萜酯可分为脂肪酸酯、糖基酯和芳香族三萜酯^[16], 其中大多数酰基配体为脂肪酸, 而且超过一半(56%)的脂肪酸酰基配体是非短链脂肪酸($C \geq 6$), 其主要酰化位点是三萜骨架上的 C-3^[15]。植物三萜的生物合成起始于 6 个异戊二烯单元连接形成的角鲨烯, 在真核生物中, 它最初被激活成 2, 3-氧化鲨烯, 然后被氧化鲨烯环化酶(oxidosqualene cyclases,

OSCs) 环化成多种三萜骨架^[17]。随后不同的修饰酶, 如细胞色素 P450 酶(cytochrome P450s, CYPs)、UDP-糖基转移酶(uridine diphosphate-dependent glycosyltransferases, UGTs)和酰基转移酶(acyltransferases, ACTs)进一步修饰这些三萜骨架, 并将其转化为三萜酯^[15]。

目前已知与三萜酯生物合成相关的酰基转移酶(triterpene ester synthesis-related acyltransferases, TEsACTs)属于 3 个酰基转移酶家族。第 1 种是 BAHD 酰基转移酶(BAHD acyltransferase, BAHD-AT)家族, 其中包括莽醇 O-乙酰转移酶

(benzylalcohol *O*-acetyltransferase, BEAT)、花青素 *O*-羟基肉桂酰转移酶 (anthocyanin *O*-hydroxycinnamoyltransferase, AHCT)、邻氨基苯甲酸 *N*-羟基肉桂酰-/苯甲酰转移酶 (anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl-/benzoyl transferase, HCBT) 和去乙酰长春鸟苷 4-*O*-乙酰转移酶 (deacetyl-vindoline 4-*O*-acetyltransferase, DAT)。第 2 种是丝氨酸羧肽酶样酰基转移酶 (serine carboxypeptidase-like acyltransferase, SCPL-AT) 家族^[18-19]。第 3 种是膜结合 *O*-酰基转移酶 (membrane-bound *O*-acyltransferase, MBOAT) 超家族。BAHD-ATs 是植物中最常见的酰基转移酶超家族,其主要底物是辅酶 A^[19],而 SCPL-ATs 的酰基供体一般来源于 UGTs 的产物葡萄糖酯, MBOAT 蛋白家族包含多个跨膜结构域,并共享组氨酸和天冬酰胺 2 个活性位点残基^[20]。BAHD 超家族含有大量的酶,目前已报道有 14 个催化三萜骨架上酰基化的 TEsACT 被发现和功能鉴定^[15],包括葫芦素酰基化酶^[21-23],以及拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 的烷醇酰基转移酶 (alkanol acyltransferase, THAA)^[24-25]等。但是,目前在 BAHD 家族中发现的催化三萜酯合成的 TEsACT 均为乙酰基转移酶,即以乙酰辅酶 A 为酰基供体^[15],尚未发现催化长链脂肪酸三萜酯合成的 BAHD 家族酰基转移酶。然而,尽管 SCPL 家族的酰基转移酶在多个物种中已有报道,但仅鉴定出了 SCPL 家族的一种功能性 TEsACT (AsSCPL1),是燕麦 *Avena sativa* L. 中燕麦素生物合成的关键酶^[26], AsSCPL1 在液泡中催化酰基供体和受体的转移,产生燕麦素 (avenacins) 类化合物^[27-28]。而膜结合 *O*-酰基转移酶 (MBOAT) 家族是一类新的酰基转移酶家族,莴苣 *Lactuca sativa* L. 中 LsTAT1^[29]催化 β -香树脂醇和羽扇豆醇乙酸酯的生成,拟南芥中 AtASAT1^[30]以饱和脂肪酰基辅酶 A ([¹⁴C]16:0-CoA) 作为酰基供体酰化甾醇,并对甾醇底物如环阿屯醇具有一定程度的特异性,催化环阿屯醇棕榈酰化生成环阿屯醇酯;根据蛇菰属植物中三萜酯的分子结构^[5-7],推断其存在催化五环三萜骨架 β -香树脂醇和羽扇豆醇合成的关键 OSC 基因,以及催化三萜骨架酰基化的 BAHD 或 MBOAT 家族基因,能够催化 C-3 位羟基的乙酰基化或棕榈酰基化生成特殊的五环三萜酯。尽管蛇菰属植物中杯茎蛇菰的基因组已经完成测序^[31],但其三萜酯生物合成相关酶与基因却一直缺乏研究。本研究挖掘了杯茎蛇菰 *Balanophora subcupularis* P. C. Tam 转录

组中五环三萜酯生物合成相关的关键酶基因,并功能表征了 OSC 酶基因功能,为了解蛇菰素等三萜酯化合物的生物合成机制奠定了基础。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

杯茎蛇菰采自云南省普洱市思茅区,采摘同一生活环境下、长势一致的杯茎蛇菰植株,与中国科学院昆明植物研究所标本馆标本进行对照,经中国科学院昆明植物研究所种子库何俊博士鉴定为杯茎蛇菰 *B. subcupularis* P. C. Tam, 取其根茎、花序、花柄 3 个组织,每个组织各 3 个生物学重复。所有样本在采集后立即在液氮中冷冻,保存于超低温冰箱,直至进一步分析。

反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司;高保真 DNA 聚合酶 (2×Phanta Max Master Mix) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司;质粒小提试剂盒 (TIANprep Mini Plasmid Kit) 购自北京天根生化科技有限公司;DH5 α 感受态购自北京全式金生物科技有限公司;对照品 β -香树脂醇 (批号 BBP00551),质量分数大于 98%,购自云南西力生物技术股份有限公司。

1.2 仪器

A24812 型 PCR 扩增仪购自美国 Thermo Fisher Scientific; LX-B50L 型高压蒸汽灭菌锅购自河南信陵仪器设备有限公司;UV-2450 型紫外可见分光光度计购自岛津分析技术研发 (上海) 有限公司;ZDP-250 型恒温培养摇床购自浙江纳德科学仪器有限公司;7890A/5975C 型 GC-MS 气质联用仪购自美国 Agilent technologies 公司。

2 方法

2.1 转录组测序与分析

样品总 RNA 使用 Trizol Kit 试剂 (Promega 公司,美国) 提取后,分别检测其纯度和完整性。经检测合格后,委托天津诺禾致源科技有限公司完成转录组文库构建、测序及数据分析。使用 SkrTools (version 1.0) 计算测序产生的原始数据,通过 Trimmomatic v0.39 和 RiboDetector v0.2.4^[32-33]过滤原始序列与去除原始数据中的 rRNA 序列后,获得高质量的 clean reads;基于杯茎蛇菰全基因组的编码序列^[31],使用 Salmon^[34]软件计算基因的表达量;使用 DIAMOND v2.1.9^[35]将 10 932 条基因与本地京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of

gene and genomes, KEGG)、真核生物直系同源组 (eukaryotic ortholog groups, KOG)、非冗余蛋白质序列 (non-redundant protein sequences, Nr)、欧洲分子生物学实验室核苷酸序列翻译 (translation of EMBL nucleotide sequence, TrEMBL)、瑞士蛋白质序列 (Swiss-Prot protein sequence, SwissProt)、蛋白质家族比对与隐马尔可夫模型 (protein families alignments and hidden Markov models, Pfam)、京都基因与基因组百科全书直系同源 (KEGG orthology, KO) 和基因本体论 (gene ontology, GO) 等数据库进行比对, 使用 Pfamscan v1.6 程序 (https://github.com/aziele/pfam_scan) 将 7 561 个基因注释到 Pfam 数据库 (<http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/Pfam/>) ($e\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$), 使用 DEseq2 进行差异表达分析, 筛选 $\log_2 |\text{fold change}| > 1$ 和 $\text{false } P\text{-values} < 0.5$ 的基因为差异表达基因。

2.2 杯茎蛇菰中五环三萜酯生物合成相关基因的挖掘

使用 PfamScan v1.6 程序检测基因的保守结构域和编码蛋白的家族, 并将结果注释到 Pfam v36.0 数据库后。从该数据库中获得与五环三萜酯生物合成相关的各个酶家族的 Pfam 号, 基于注释结果对各个酶家族的基因数量进行统计。使用 TBtools 中的 TBtools Fasta Extract (Basic) 工具对各个酶家族的氨基酸序列进行提取和重命名, 使用 Text Block Extract 工具从转录组数据中提取出每百万转录本数 (Transcripts Per Million, TPM) 值, 使用 HeatMap 工具创建候选基因的表达量热图。

2.3 杯茎蛇菰 OSC、BAHD 和 MBOAT 基因家族的系统进化分析

利用 MEGA11.0 软件构建系统进化树, 采用邻接法 (neighbor joining, NJ) 作图, 各树枝置信度用 Bootstrap Method 进行检验, 设定 1 000 的循环次数, 杯茎蛇菰 BAHD 系统进化树的参考序列分别来自拟南芥基因组数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>) 和水稻 *Oryza sativa* L. 基因组数据库 (<https://riceome.hzau.edu.cn/>); 使用在线工具 ITOL (<https://itol.embl.de/>) 美化系统进化树; 利用 DNAMAN8 软件进行氨基酸序列多重比对, 所有工具均采用默认参数。

2.4 杯茎蛇菰 OSC 的功能表征

利用 SnapGene 软件设计 *BsubOSC*s 基因携带 pYES2 载体同源臂的引物 (表 1), 采用诺唯赞的高保真酶 (Phanta High-Fidelity DNA Polymerase) 进行基因扩增, PCR 反应程序为: 预变性 95 °C、3 min, 变性 95 °C、15 s, 退火 58 °C、15 s, 延伸 72 °C、2 min, 35 个循环, 延伸 72 °C、5 min, 10 °C 保温, 使用 0.1% 的琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测, 将符合预期片段长度的扩增产物进行割胶回收; 利用单酶切的方法 (*Bam*HI 位点 5'-GGATCC-3') 使 pYES2 载体线性化后将酶切产物进行柱纯化; 利用生工生物科技有限公司的无缝克隆酶 (2× Seamless cloning Master Mix) 将 *BsubOSC1* 和 *BsubOSC2* 基因片段分别连接到 pYES2 酵母表达载体中构建重组质粒 (pYES2-*BsubOSC*s)。通过醋酸锂 (LiAc/SS-DNA/PEG) 转化方法将测序成功的重组质粒导入到酿酒酵母羊毛甾醇合酶基因 (*erg7*) 缺陷突变株 GIL77 中, 将阳性转化子进行一系列发酵、诱导、孵育、裂解、萃取等实验步骤后, 通过最终的气相色谱-质谱仪 (GC-MS) 检测发酵产物。

2.5 GC-MS 检测条件

Agilent 19091S-433 毛细管柱 (HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox, 30 m×250 μm ×0.25 μm); 进样口温度为 250 °C; 载气为高纯氦气; 体积流量为 1.2 mL/min; 进样量 1 μL; 分流 1:10。质谱条件: 电子轰击 (E), 离子源: 离子源温度 230 °C; 四级杆温度 150 °C; 电子能量 70 eV, 接口温度为 250 °C, 质量扫描范围 m/z 30~500, 检索谱库为 NIST version 2.3 标准谱库。升温程序: 80 °C 保持 2 min, 20 °C/min 升至 319 °C, 保持 20 min, 总运行时间 35 min。

表 1 *BsubOSC*s 基因克隆引物

Table 1 *BsubOSC*s gene cloning primers

引物名称	引物序列 (5'-3')
BsubOSC1-F	CGACTCACTATAGGGAATATTATGTGGAAGCTGAAGATATCAGAGG
BsubOSC1-R	TAAC TAATTACATGATGCGGCCTAGGCAAACAAACCCGCTTAC
BsubOSC2-F	ATACGACTCACTATAGGGAATATTATGTGGAGATTGAGAGTGGGAG
BsubOSC2-R	ACATAACTAATTACATGATGCGGCCTAGTTGGGGAGGAGGACAC

3 结果与分析

3.1 转录组分析

3.1.1 基因功能注释 基于已发表的杯茎蛇菰全基因组的测序结果,对获得的 10 932 条基因进行了功能注释,共注释到 10 133 条基因,注释率为 92.69%。KEGG、KOG、Nr、TrEMBL、SwissProt、Pfam、KO 和 GO 8 个数据库分别注释到了 10 018、9 531、10 120、10 071、6 708、7 561、7 166 和 3 894 条基因,注释率分别为 91.64%、87.18%、92.57%、92.12%、61.36%、69.16%、65.55%和 35.62% (表 2)。

3.1.2 不同组织差异基因 (DEGs) 数量 以 $\log_2$ |fold change| > 1 和 false P -values < 0.5 为阈值筛选了 DEGs。根茎 vs 花序比较组中检测到 359 个上调 DEGs 和 351 个下调 DEGs; 花柄 vs 花序比较组中检测到 359 个上调 DEGs 和 476 个下调 DEGs; 花

表 2 8 大数据库的注释结果

Table 2 Annotation results of eight databases

注释数据库	注释数量	注释百分比/%
KEGG	10 018	91.64
KOG	9 531	87.18
Nr	10 120	92.57
TrEMBL	10 071	92.12
SwissProt	6 708	61.36
Pfam	7 561	69.16
KO	7 166	65.55
GO	3 894	35.62
All	10 133	92.69
总计	10 932	

柄 vs 根茎比较组中检测到 238 个上调 DEGs 和 340 个下调 DEGs (图 2)。

3.1.3 KEGG 富集分析 利用 KEGG 数据库,对 3 个分组中差异表达基因在生物学上的复杂行为进行分

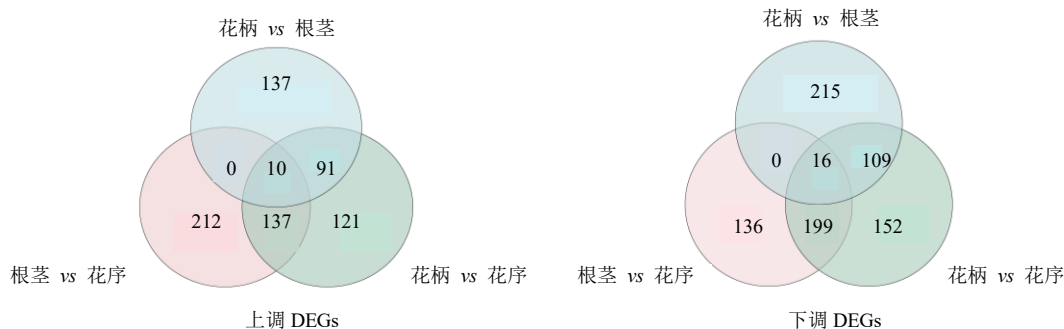


图 2 DEGs 的韦恩图分析

Fig. 2 Venn diagram analysis of differentially expressed genes

析,选择每组比较间富集程度最丰富的前 20 通路绘制气泡图 (图 3),DEG 根据 KEGG 通路定义的功能类别进一步分类和表征。在 3 个差异组中,富集程度较丰富的术语包括转录因子、植物激素信号转导、运输工具、细胞色素 P450、多种植物次生代谢产物的生物合成、萜类骨架生物合成、类固醇生物合成、脂质生物合成、脂肪酸生物合成等代谢途径。其中“多种植物次生代谢产物的生物合成”(ko00999)、“萜类骨架生物合成”(ko00900)和“脂肪酸生物合成”(ko00061)这 3 条代谢途径与杯茎蛇菰五环三萜生物合成密切相关,分别涉及到 9、6 和 13 条差异基因。

3.2 杯茎蛇菰中五环三萜酯生物合成相关基因的挖掘

3.2.1 五环三萜酯生物合成相关基因的挖掘 五环三萜酯的生物合成包括甲羟戊酸途径

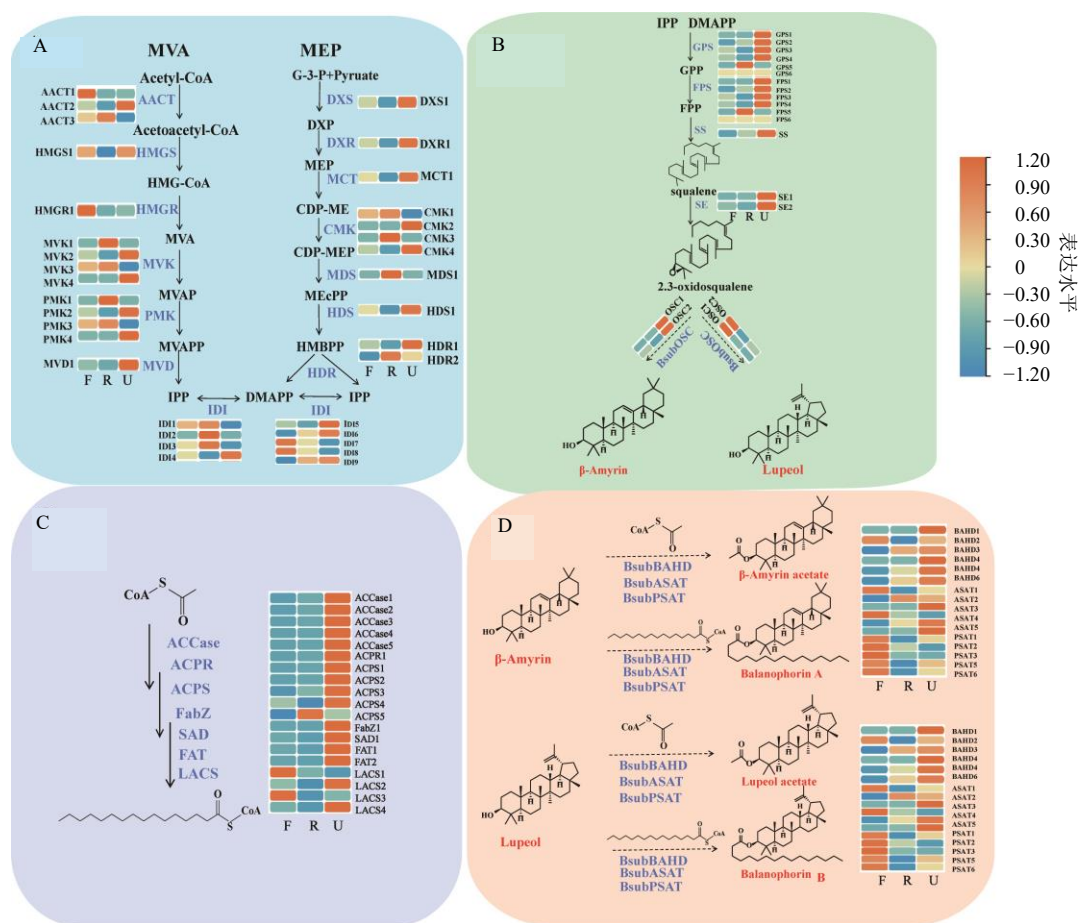
(mevalonate pathway, MVA) 或甲基赤藓糖醇磷酸化途径途径 (methylerythritol phosphate pathway, MEP) 合成前体异戊烯焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 和二甲基丙烯焦磷酸 (dimethylallylpyrophosphate, DMAPP) 阶段、骨架合成阶段、棕榈酰 CoA (脂肪酸) 合成阶段及骨架酰化阶段 (图 4)。从杯茎蛇菰转录组中总共挖掘到了与五环三萜酯生物合成相关的酶基因 87 条,包括较为关键的 2 条氧化鲨烯环化酶 (OSC)、6 条 BAHD 酰基转移酶家族基因和 11 条膜结合 O -酰基转移酶 (MBOAT) 家族基因,同时从杯茎蛇菰转录组中鉴定出与脂肪酸合成途径 (ko00061) 相关的基因共 19 条,分为乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACCase)、酰基载体蛋白还原酶 (acylcarrier protein reductase, ACPR)、酰基载体蛋



图 3 DEGs 的 KEGG 富集分析
Fig. 3 KEGG enrichment analysis of DEGs

白合成酶 (acyl carrier protein synthase, ACPS)、3-羟烷基酰载体蛋白脱水酶 (3-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase, FabZ)、硬脂酰-酰基载体蛋白脱饱和酶 (stearoyl-acyl carrier protein desaturase, SAD)、酰基载体蛋白硫酯酶 (acyl-acyl carrier protein thioesterase, FAT) 和长链脂酰辅酶 A 合成酶 (long-chain acyl-CoA synthetase, LACS) 7 个蛋白家族。

3.2.2 五环三萜酯生物合成相关基因的表达水平
根据五环三萜酯合成途径候选基因的表达谱可知 (图 4), 上游 MVA 和 MEP 途径的大多数基因在根茎和花序中转录表达水平较高, 而下游 *GPS*、*FPS*、*SS*、*SE*、*OSC* 和 *BAHD* 基因在花序中的转录表达水平较高, *MBOAT* 家族不同基因则在花柄、根茎和花序中均有高表达, 而脂肪酸合成的 19 条基因大多数在花序中的转录表达水平较高。



A、B、C 和 D 分别代表三萜酯合成途径的 4 个阶段，A 为前体 IPP 和 DMAPP 的合成阶段；B 为骨架合成阶段；C 为棕榈酰 CoA 合成阶段；D 为骨架酰化阶段；F、R 和 U 依次为花柄、根茎和花序的表达谱。

A, B, C and D represent the four stages of the triterpene ester synthesis pathway, respectively; A is the synthesis stage of IPP and DMAPP; B is the synthesis stage of skeleton; C is the synthesis stage of palmitoyl CoA; D is the acylation stage of skeleton; F, R and U are the expression profiles of the flowerstalk, rhizome, and umbel, respectively.

图 4 五环三萜酯合成途径候选基因的表达谱

Fig. 4 Expression profiles of candidate genes involved in pentacyclic triterpene ester synthesis pathway

3.3 杯茎蛇菰 *OSC*、*BAHD* 和 *MBOAT* 基因家族的系统进化分析

3.3.1 杯茎蛇菰 *OSC* 基因家族成员进化树分析 杯茎蛇菰转录组中总共注释到了 2 条 *BsubOSC*s 基因，将之与其他物种的三萜合酶一起构建系统进化树（图 5）。该进化树总共分为环阿屯醇合酶、葫芦二烯醇合酶、羊毛甾醇合酶、羽扇豆醇合酶、 β -香树脂醇合酶、木栓酮合酶和达玛烯二醇合酶 7 大簇，由系统进化树分析可知，*BsubOSC1* 被聚在羽扇豆醇合酶分支上，而 *BsubOSC2* 被聚在 β -香树脂醇合酶分支上。

3.3.2 杯茎蛇菰 *OSC* 氨基酸序列比对 *BsubOSC*s 氨基酸多重序列比对结果显示（图 6），杯茎蛇菰中 *OSC* 超家族的 2 条氨基酸序列都具有高度保守的 DCTAE 基序和 MWCHCR 基序，DCTAE 基序与底物结合有关^[36]，

同时还包含了 *OSC* 超家族的 4 个 QW[QXXXXXW] 的基序特征，QW 基序负责加强酶的结构并稳定参与环化过程中的碳阳离子中间体^[37-38]。

3.3.3 杯茎蛇菰 *BAHD* 基因家族成员进化树分析 杯茎蛇菰转录组中总共注释到了 6 条 *BsubBAHD*s 基因，综合先前文献中进化树的聚类方式^[15,19,39-41] 将杯茎蛇菰、拟南芥、水稻和其他植物的 *BAHD*-ATs 超家族成员一起构建系统进化树（图 7）。利用拟南芥和水稻的 *BAHD*-ATs 进行分类，总共分为了 8 簇，其中与三萜酯生物合成相关的酰基转移酶 TEsACTs（标红星）大多数都属于 IIIa 分支，而且大多数都在其三萜骨架上被乙酰化，*BsubBAHD3* 和 *BsubBAHD5* 被聚在该分支上；其他 2 个 TEsACTs（*AmAT7-3* 和 *AmAT8-17*）属于 I 分支，它们都对黄

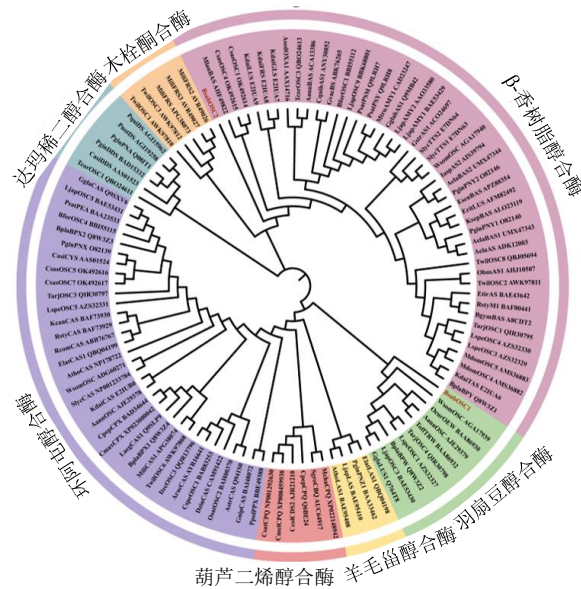
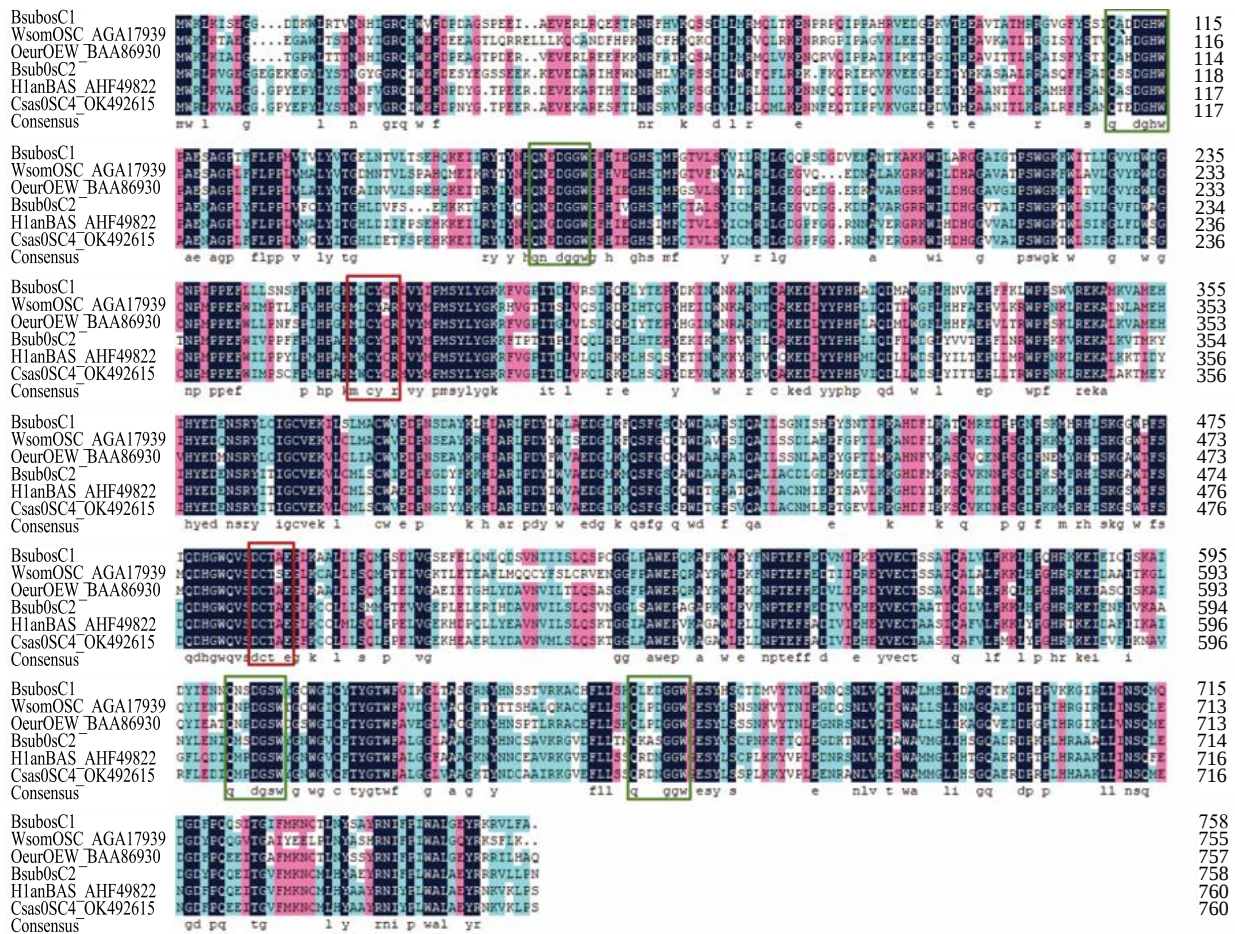


图 5 杯茎蛇菰 OSC 系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of OSC in *B. subcupularis*



DCTAE 和 MWCYCR 保守基序区域位于红色框中, QXXXXXW 保守基序区域位于绿色框中。

The conserved motif regions of DCTAE and MWCYCR are located in the red box, while the conserved motif region of QXXXXXXXX is located in the green box.

图 6 杯茎蛇菰 OSC 氨基酸序列比对

Fig. 6 Amino acid sequence alignment of OSC in *B. subcupularis*

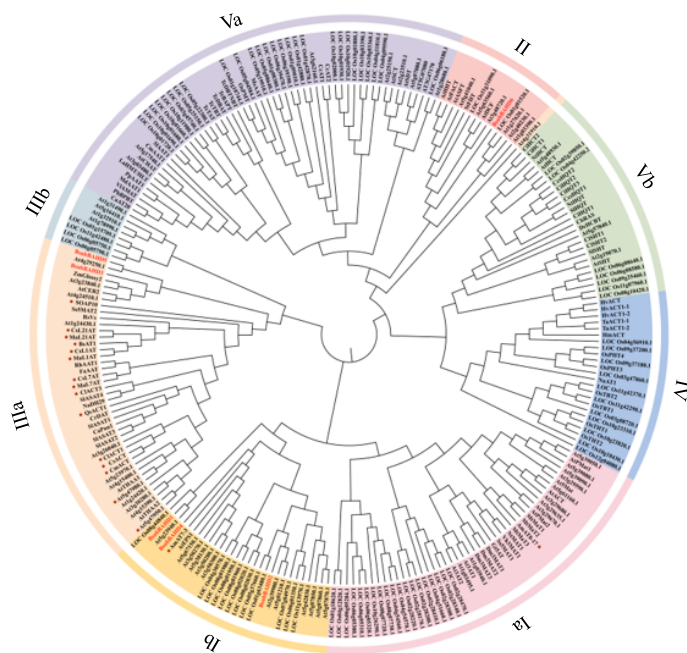


图 7 杯茎蛇菰 BAHD 系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree of BAHD in *B. subcupularis*

芪甲苷的苷供体进行了乙酰化^[42], BsubBAHD1、BsubBAHD2 和 BsubBAHD4 被聚在 Ib 分支上; 拟南芥中的 TEsACTs 也可作为其他植物同源基因的鉴定提供参考, II 分支中的 AtASFT^[43]、AtDCF^[44]和 AtHHT^[45]催化 16-羟基棕榈酸和阿魏酰 CoA 生成阿魏酸脂, BsubBAHD6 与该分支中的 AtDCF^[44]聚得

较近。

3.3.4 杯茎蛇菰 MBOAT 基因家族成员进化树分析
杯茎蛇菰转录组中总共注释到了 11 条膜结合 MBOAT 家族基因, 综合先前文献中进化树的聚类方式^[29]将杯茎蛇菰和已知功能 MBOAT 超家族成员一起构建系统进化树 (图 8)。LsTAT1^[29]催化 β -香

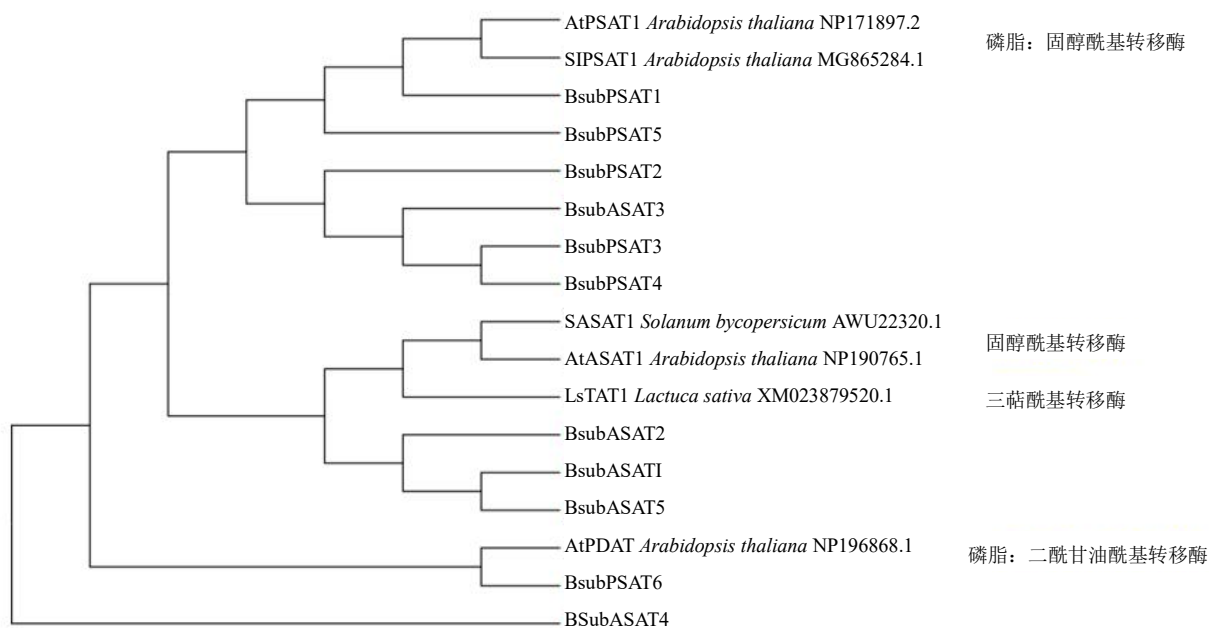


图 8 杯茎蛇菰 MBOAT 系统进化树

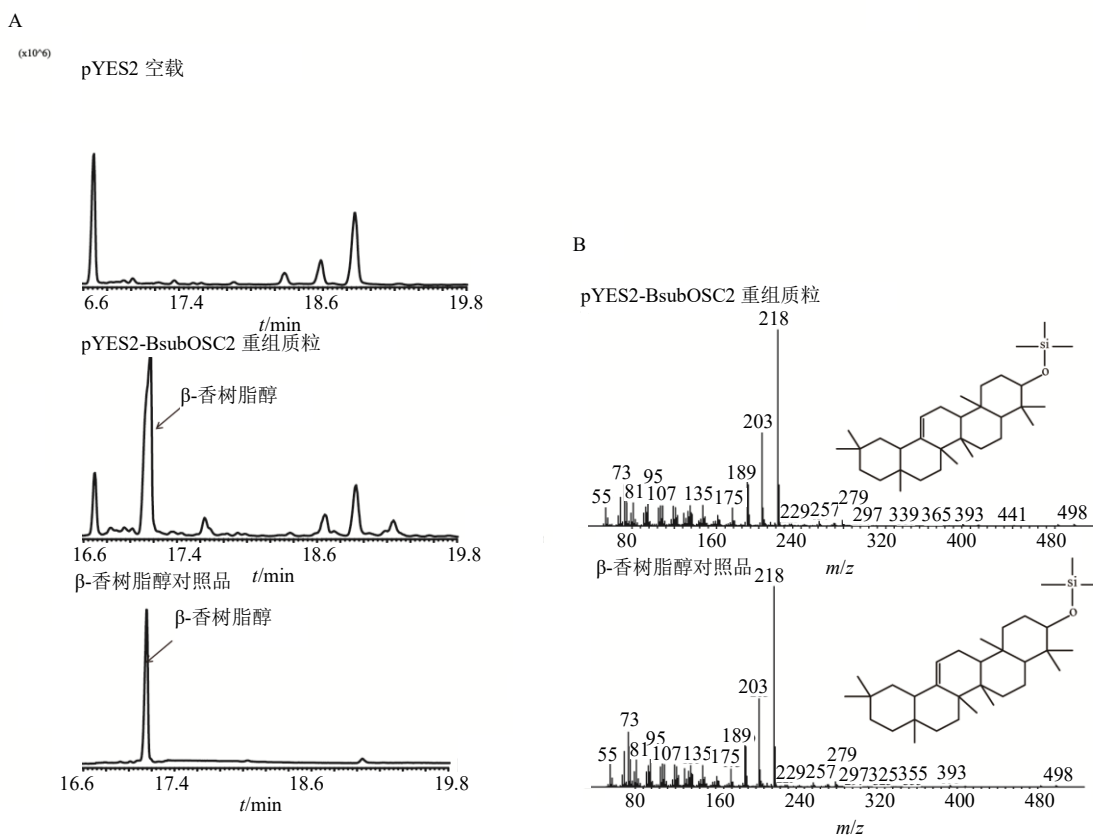
Fig. 8 Phylogenetic tree of MBOAT in *B. subcupularis*

树脂醇和羽扇豆醇乙酰化, AtASAT1^[30]催化环阿屯醇棕榈酰化生成环阿屯醇酯, BsubASAT2、BsubASAT1 和 BsubASAT5 被聚在该分支上; BsubPSAT1 与磷脂甾醇酰基转移酶 AtPSAT1 和 SIPSAT1^[29]聚在一起; BsubPSAT6 与磷脂甘油二酯酰基转移酶 AtPDAT^[29]离得较近。

3.4 杯茎蛇菰 OSC 的功能表征

通过醋酸锂转化将重组质粒 (pYES2-BsubOSCs) 和 pYES2 空载转化到酿酒酵母突变菌

株 GIL77 中成功进行异源表达, 将 pYES2 空载作为阴性对照。发酵产物通过气相色谱-质谱仪 (GC-MS) 检测发现 (图 9), 与对照菌株 pYES2 空载相比, 从表达 pYES2-BsubOSC2 重组质粒酵母提取物的总离子流图谱中发现在 17.08 min 有 1 个较大的新产物峰出现, 结果显示该峰与 β -香树脂醇对照品的保留时间和离子碎片相一致, 这也证明了 BsubOSC2 编码的蛋白可催化 2,3-氧化鲨烯生成 β -香树脂醇。



A-BsubOSC2 发酵产物衍生化后的 GC-MS 检测的 TIC 图; B-BsubOSC2 发酵产物衍生化后的 GC-MS 检测的 EIC 质谱图。

A-TIC diagram of GC-MS detection after derivatization of BsubOSC2 fermentation products; B-EIC mass spectrum of GC-MS detection after derivatization of BsubOSC2 fermentation products.

图 9 BsubOSC2 发酵产物的 GC-MS 分析

Fig. 9 GC-MS analysis of BsubOSC2 fermentation products

4 讨论

基于杯茎蛇菰转录组挖掘到的与五环三萜酯生物合成相关的各个酶家族基因数目相对较少, 最为关键的 OSC、BAHD 和 MBOAT 3 个家族基因总共只有 20 条, 杯茎蛇菰的基因组较小^[31], 它又是全寄生植物, 且寄生植物已经进化到部分或严重地依赖寄主植物才能来完成它们的生命周期的地步, 尽管蛇菰属多种植物都具有较高的药用价值和生

物学研究价值, 但是该属植物的组学数据十分缺乏, 有国内学者对疏花蛇菰质体基因组进行了研究, 表明疏花蛇菰质体基因组与非寄生植物相比高度精简^[46-49], 前人研究中对蛇菰科蛇菰属的 2 个全寄生物种杯茎蛇菰和球穗蛇菰进行了全基因组组装, 发现寄生植物寄生背后都发生了非常剧烈的基因丢失, 还表现出多基因家族的强烈收缩, 揭示了蛇菰独特形态和神奇生活方式的背后机制^[31], 因此

推断这可能是导致从杯茎蛇菰转录组中挖掘到的参与五环三萜酯生物合成相关基因数量较少的原因之一。迄今为止,全寄生的蛇菰属植物组学信息较为缺乏,目前集中在该属植物中研究较多的是化学成分的分离和鉴定,关于有效活性成分功能基因挖掘、关键酶基因克隆及功能验证等方面的研究十分匮乏,加上寄生植物寄生背后会存在剧烈的基因丢失和基因家族收缩,这些因素不仅直接制约了蛇菰属药用植物中重要次生代谢产物合成途径的研究,进而也严重阻碍了蛇菰属药用植物遗传信息挖掘及合成生物学的发展,同时相关基因信息的缺乏也给蛇菰属植物的进化研究带来了挑战。

杯茎蛇菰转录组中差异表达基因显著富集于“多种植物次生代谢产物的生物合成”“萜类骨架生物合成”和“脂肪酸生物合成”等代谢途径,这 3 条代谢途径与杯茎蛇菰五环三萜酯生物合成密切相关。五环三萜酯生物合成相关的各个酶家族基因大多数都在花序中高表达,在根茎和花柄中却是低表达,表明这些关键酶基因在杯茎蛇菰 3 个组织中的表达具有组织特异性。这些结果有助于后续分析蛇菰属植物五环三萜酯合成途径中其他酶在植物组织中的表达情况提供参考。

虽然蛇菰属植物中三萜酯的 2 个骨架(β -香树脂醇和羽扇豆醇)和棕榈酸的合成路径已经清楚,但在全寄生的蛇菰属植物中还未见报道,而 BAHD 或 MBOAT 酰基转移酶家族基因催化其骨架 C-3 位乙酰化和棕榈酰化是解析蛇菰属三萜酯合成途径的瓶颈。根据 BAHD 家族的系统进化分析,发现 BsubBAHD3 和 BsubBAHD5 与大多数已知的 TEACTs 一起聚在 IIIa 分支中, BsubBAHD6 与 II 分支中 AtDCF^[44](催化 16-羟基棕榈酸和阿魏酰 CoA 生成阿魏酸脂)聚得较近,因此将这 4 条作为 BAHD 酰基转移酶家族的候选基因。根据 MBOAT 家族的系统进化分析,发现 BsubASAT2、BsubASAT1 和 BsubASAT5 与催化 β -香树脂醇和羽扇豆醇乙酰化^[29](LsTAT1)及催化环阿屯醇棕榈酰化生成环阿屯醇酯^[30](AtASAT1)聚得较近,由于 LsTAT1 作为 β -香树脂醇和羽扇豆醇乙酰化的阳性基因,而环阿屯醇酯与蛇菰素的结构相似,因此将这 3 条作为 MBOAT 酰基转移酶家族的候选基因。这 7 条酰基转移酶的挖掘为后期蛋白表达与纯化、微粒体蛋白提取、底物喂养及体外酶活等关键实验环节奠定了一定基础。

尽管氧化鲨烯环化酶的来源和催化功能不同,但 OSC 家族成员具有 DCTAE 和 QW 等高度保守的氨基酸序列。将绿玉树的 OSC 进行突变后,明确了 DCTAE 能作为聚环化反应的起始位点,因而推测保守基序 DCTAE 可能与底物结合相关^[36]。另外,保守基序 QW 是带有负电性的芳香族氨基酸区域,其作用是在 2,3-氧化鲨烯环化反应中稳定碳正离子,推测 4 个 QW 重复序列可能与稳定蛋白质结构和功能相关^[37-38]。通过氨基酸序列比对分析,发现杯茎蛇菰中 2 条 BsubOSCs 序列都具有高度保守的 DCTAE、MWCHCR 及 4 个 QW 的基序特征,为后续使用分子对接预测催化关键残基和解析其催化机制提供了参考。将水稻的 OSC 进行定点突变后,实现了五环三萜棕榈醇和四环三萜帕克醇之间的转化^[50]。Kushiro 等^[51]发现将 259 位 Trp 突变为 Leu,可使羽扇豆醇合酶改造为 β -香树脂醇合酶,且突变体以 2:1 的比例将羽扇豆醇与 β -香树脂醇作为主要产物。这些研究均表明,碱基的替换、插入和缺失均能显著影响 OSC 的催化活性。此外,将酶和底物经过分子对接后,可分析并预测酶活性口袋中酶-底物结合位点的氨基酸残基^[52-55]。因此,可以通过定点突变和底物亲和性的研究方法,揭示植物 OSC 结构与功能之间的关系^[56-57]。而本研究只在杯茎蛇菰中表征了 BsubOSC2 催化生成 β -香树脂醇的功能,但是蛇菰属植物中三萜酯的另外一个三萜骨架的功能基因并未被找到,综上所述亦可通过定点突变的方法将 BsubOSC2 突变成为羽扇豆醇合酶,并且本研究中 BsubOSC1 和 BsubOSC2 基因相似度为 58.42%,只有 BsubOSC2 基因具有功能,而 BsubOSC1 则无功能,可以通过分子对接等揭示 BsubOSC2 关键催化位点。

综上所述,为探索蛇菰属植物中五环三萜酯生物合成的分子基础,本研究基于杯茎蛇菰转录组分析了五环三萜酯的生物合成途径,挖掘到了可能参与五环三萜酯生物合成的相关酶基因共 87 条,其中大多数基因都在花序中高表达。成功克隆了 2 条 OSC 基因并将其导入酿酒酵母突变菌株 GIL77 中进行异源表达,最终鉴定到 BsubOSC2 为 β -香树脂醇合酶,是蛇菰素 A 和 β -香树脂醇乙酸酯生物合成的关键酶基因之一。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang X H, Liu Z Z, Qiao W L, *et al.* Phytochemicals and

- biological studies of plants from the genus *Balanophora* [J]. *Chem Cent J*, 2012, 6(1): 79.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会编. 中国植物志(第二十四卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1988: 259.
- [3] 张绍云. 蛇菰属的药用植物资源 [J]. 中国民族民间医药杂志, 1998, 7(2): 27-28.
- [4] Mutinda E S, Zhang D J, Muema F W, *et al.* The genus *Balanophora* J. R. Forst. & G. Forst. - Its use in traditional medicine, phytochemistry, and pharmacology: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 3): 117276.
- [5] 刘锡葵, 李忠荣, 邱明华, 等. 印度蛇菰的三萜成分 [J]. 云南植物研究, 1998, 20(3): 369-373.
- [6] 戴忠, 王钢力, 林瑞超. 思茅蛇菰的化学成分研究 (III) [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1608-1610.
- [7] 戴忠, 王峰, 王钢力, 等. 穗花蛇菰的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(21): 1798-1800.
- [8] Huang W H, Chung H Y, Xuan W S, *et al.* The cholesterol-lowering activity of miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*) [J]. *J Food Biochem*, 2020, 44(5): e13185.
- [9] Maurya R, Srivastava A, Shah P, *et al.* β -Amyrin acetate and β -amyrin palmitate as antidyslipidemic agents from *Wrightia tomentosa* leaves [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(8/9): 682-685.
- [10] Ajikumaran Nair S, Sabulal B, Radhika J, *et al.* Promising anti-diabetes mellitus activity in rats of β -amyrin palmitate isolated from *Hemidesmus indicus* roots [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 734: 77-82.
- [11] Akihisa T, Kojima N, Kikuchi T, *et al.* Anti-inflammatory and chemopreventive effects of triterpene cinnamates and acetates from shea fat [J]. *J Oleo Sci*, 2010, 59(6): 273-280.
- [12] Prakash Chaturvedula V S, Schilling J K, Miller J S, *et al.* Two new triterpene esters from the twigs of *Brachylaena ramiflora* from the Madagascar rainforest [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(8): 1222-1224.
- [13] Dai T T, Li L C, Qi W, *et al.* Balanophorin B inhibited glycolysis with the involvement of HIF-1 α [J]. *Life Sci*, 2021, 267: 118910.
- [14] Lin C N, Tome W P. Antihepatotoxic principles of *Sambucus formosana* [J]. *Planta Med*, 1988, 54(3): 223-224.
- [15] Liu J, Yin X, Kou C X, *et al.* Classification, biosynthesis, and biological functions of triterpene esters in plants [J]. *Plant Commun*, 2024, 5(4): 100845.
- [16] Xu R, Fazio G C, Matsuda S P T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(3): 261-291.
- [17] Abe I. Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes [J]. *Nat Prod Rep*, 2007, 24(6): 1311-1331.
- [18] Bontpart T, Cheynier V, Ageorges A, *et al.* BAHD or SCPL acyltransferase? What a dilemma for acylation in the world of plant phenolic compounds [J]. *New Phytol*, 2015, 208(3): 695-707.
- [19] D'Auria J C. Acyltransferases in plants: A good time to be BAHD [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(3): 331-340.
- [20] Hofmann K. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for Wnt signaling [J]. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25(3): 111-112.
- [21] Zhou Y, Ma Y S, Zeng J G, *et al.* Convergence and divergence of bitterness biosynthesis and regulation in Cucurbitaceae [J]. *Nat Plants*, 2016, 2: 16183.
- [22] Shang Y, Ma Y S, Zhou Y, *et al.* Plant science. Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber [J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1084-1088.
- [23] Kim Y C, Choi D, Cha A, *et al.* Critical enzymes for biosynthesis of cucurbitacin derivatives in watermelon and their biological significance [J]. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 444.
- [24] Sohrabi R, Ali T, Harinantenaina Rakotondraibe L, *et al.* Formation and exudation of non-volatile products of the Arabidiol triterpenoid degradation pathway in *Arabidopsis* roots [J]. *Plant Signal Behav*, 2017, 12(1): e1265722.
- [25] Huang A C, Jiang T, Liu Y X, *et al.* A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota [J]. *Science*, 2019, 364(6440): eaau6389.
- [26] Mugford S T, Qi X Q, Bakht S, *et al.* A serine carboxypeptidase-like acyltransferase is required for synthesis of antimicrobial compounds and disease resistance in oats [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(8): 2473-2484.
- [27] Mugford S T, Louveau T, Melton R, *et al.* Modularity of plant metabolic gene clusters: A trio of linked genes that are collectively required for acylation of triterpenes in oat [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(3): 1078-1092.
- [28] Owatworakit A, Townsend B, Louveau T, *et al.* Glycosyltransferases from oat (*Avena*) implicated in the acylation of avenacins [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(6): 3696-3704.
- [29] Choi H S, Han J Y, Cheong E J, *et al.* Characterization of a pentacyclic triterpene acetyltransferase involved in the biosynthesis of taraxasterol and ψ -taraxasterol acetates in lettuce [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 12: 788356.
- [30] Chen Q L, Steinhauer L, Hammerlindl J, *et al.* Biosynthesis of phytosterol esters: Identification of a sterol O-acyltransferase in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145(3): 974-984.
- [31] Chen X L, Fang D M, Xu Y X, *et al.* *Balanophora* genomes display massively convergent evolution with other extreme holoparasites and provide novel insights into parasite-host interactions [J]. *Nat Plants*, 2023, 9(10): 1627-1642.
- [32] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [33] Deng Z L, Münch P C, Mreches R, *et al.* Rapid and

- accurate identification of ribosomal RNA sequences via deep learning [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(10): e60.
- [34] Patro R, Duggal G, Love M I, *et al.* Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(4): 417-419.
- [35] Buchfink B, Reuter K, Drost H G. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND [J]. *Nat Methods*, 2021, 18(4): 366-368.
- [36] Ito R, Masukawa Y, Hoshino T. Purification, kinetics, inhibitors and CD for recombinant β -amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli* L and functional analysis of the DCTA motif, which is highly conserved among oxidosqualene cyclases [J]. *FEBS J*, 2013, 280(5): 1267-1280.
- [37] 李传旺, 张贺, 饶攀, 等. 植物五环三萜类化合物生物合成途径研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(11): 3436-3452.
- [38] Chen K, Zhang M, Ye M, *et al.* Site-directed mutagenesis and substrate compatibility to reveal the structure-function relationships of plant oxidosqualene cyclases [J]. *Nat Prod Rep*, 2021, 38(12): 2261-2275.
- [39] Wang J H, De Luca V. The biosynthesis and regulation of biosynthesis of Concord grape fruit esters, including 'foxy' methylanthranilate [J]. *Plant J*, 2005, 44(4): 606-619.
- [40] Tuominen L K, Johnson V E, Tsai C J. Differential phylogenetic expansions in BAHD acyltransferases across five angiosperm taxa and evidence of divergent expression among *Populus* paralogues [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 236.
- [41] Xu D H, Wang Z, Zhuang W B, *et al.* Family characteristics, phylogenetic reconstruction, and potential applications of the plant BAHD acyltransferase family [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1218914.
- [42] Wang L L, Jiang Z H, Zhang J H, *et al.* Characterization and structure-based protein engineering of a regiospecific saponin acetyltransferase from *Astragalus membranaceus* [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 5969.
- [43] Molina I, Li-Beisson Y, Beisson F, *et al.* Identification of an *Arabidopsis* feruloyl-coenzyme A transferase required for suberin synthesis [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151(3): 1317-1328.
- [44] Rautengarten C, Ebert B, Ouellet M, *et al.* *Arabidopsis* deficient in cutin ferulate encodes a transferase required for feruloylation of ω -hydroxy fatty acids in cutin polyester [J]. *Plant Physiol*, 2012, 158(2): 654-665.
- [45] Gou J Y, Yu X H, Liu C J. A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(44): 18855-18860.
- [46] Su H J, Barkman T J, Hao W L, *et al.* Novel genetic code and record-setting AT-richness in the highly reduced plastid genome of the holoparasitic plant *Balanophora* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(3): 934-943.
- [47] Nickrent D L, Ouyang Y, Duff R J, *et al.* Do nonasterid holoparasitic flowering plants have plastid genomes? [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 34(5): 717-729.
- [48] Su H J, Hu J M. Rate heterogeneity in six protein-coding genes from the holoparasite *Balanophora* (Balanophoraceae) and other taxa of Santalales [J]. *Ann Bot*, 2012, 110(6): 1137-1147.
- [49] Hsiao S C, Huang W T, Lin M S. Genetic diversity of *Balanophora fungosa* and its conservation in Taiwan [J]. *Botanical Studies*, 2010, 51(2): 6.
- [50] Xue Z Y, Tan Z W, Huang A C, *et al.* Identification of key amino acid residues determining product specificity of 2, 3-oxidosqualene cyclase in *Oryza* species [J]. *New Phytol*, 2018, 218(3): 1076-1088.
- [51] Kushiro T, Shibuya M, Masuda K, *et al.* Mutational studies on triterpene synthases: Engineering lupeol synthase into β -amyrin synthase [J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(29): 6816-6824.
- [52] Hans J, Hause B, Strack D, *et al.* Cloning, characterization, and immunolocalization of a mycorrhiza-inducible 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in arbuscule-containing cells of maize [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(2): 614-624.
- [53] Osmani S A, Bak S, Imberty A, *et al.* Catalytic key amino acids and UDP-sugar donor specificity of a plant glucuronosyltransferase, UGT94B1: Molecular modeling substantiated by site-specific mutagenesis and biochemical analyses [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(3): 1295-1308.
- [54] Gholivand K, Valmoozi A A E, Mahzouni H R, *et al.* Molecular docking and QSAR studies: Noncovalent interaction between acephate analogous and the receptor site of human acetylcholinesterase [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(28): 6776-6785.
- [55] Wang X M, Zhang J, Wu L H, *et al.* A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China [J]. *Food Chem*, 2014, 151: 279-285.
- [56] Wu Z X, Xu H, Wang M L, *et al.* Molecular docking and molecular dynamics studies on selective synthesis of α -amyrin and β -amyrin by oxidosqualene cyclases from *Ilex asprella* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3469.
- [57] Song Z Z, Peng B, Gu Z X, *et al.* Site-directed mutagenesis identified the key active site residues of alcohol acyltransferase PpAAT1 responsible for aroma biosynthesis in peach fruits [J]. *Hortic Res*, 2021, 8(1): 32.

[责任编辑 时圣明]