

西红花 *AP2/ERF* 基因家族鉴定及其响应激素诱导柱头脱辅基类胡萝卜素类成分生物合成的分析

高广春¹, 肖 晨¹, 李 军^{2*}, 黄 雄¹, 毛丽斌^{1,3}, 潘可欣¹

1. 嘉兴大学医学院, 嘉兴市天然药物与健康食品研发技术创新团队, 浙江 嘉兴 314001

2. 嘉兴职业技术学院现代农业学院, 浙江 嘉兴 314036

3. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 浙江省植物次生代谢调控重点实验室, 浙江 杭州 310018

摘 要: **目的** 研究西红花 *Crocus sativus* *AP2/ERF* 转录因子家族以及响应激素信号诱导柱头药效成分生物合成, 为西红花柱头次生代谢调控网络研究奠定基础。 **方法** 基于西红花基因组数据, 通过隐马尔可夫模型搜索鉴定西红花中的 *AP2/ERF* 转录因子, 并利用生物信息学分析软件和在线网站分析基因的理化性质、染色体定位、系统发育进化树、保守结构域和基序以及启动子的顺式作用元件; 利用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 和实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 分别测定赤霉素 (gibberellin A3, GA3) 和茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 处理后柱头中西红花苦苷、西红花苷I和西红花苷II的含量及其生物合成相关功能基因和部分 *CsAP2/ERFs* 基因的表达量。 **结果** 西红花中含有 88 个 *AP2/ERF* 转录因子, 分布在 8 条染色体上; 系统发育和保守基序显示 *CsAP2/ERFs* 分类于脱水响应元件结合蛋白 (DREB)、乙烯响应因子 (ERF) 和 soloist 3 个亚家族, 其中 DREB 和 ERF 共计 81 个 *CsAP2/ERFs*; GA3 和 MeJA 处理对西红花苷I和西红花苷II的合成均有促进作用, 但对西红花苦苷合成的作用相反; *CsAP2/ERF1*、9、2、33 和 34 受激素信号诱导在柱头发育过程中表达量发生显著变化, 且 GA3 和 MeJA 诱导变化趋势相反; 基因表达相关性分析发现该 5 个 *CsAP2/ERFs* 在激素作用下分别与不同的功能基因具有显著的相关性, 表明 *CsAP2/ERFs* 响应激素信号调控柱头中脱辅基类胡萝卜素化合物生成的关键基因进而影响西红花药效成分的生物合成。 **结论** 鉴定了西红花中的 *CsAP2/ERFs* 转录因子家族, 阐明了相关功能基因和部分 *CsAP2/ERFs* 受 GA3 和 MeJA 处理的诱导表达模式, 为探索西红花响应激素信号诱导调控西红花脱辅基类胡萝卜素类成分生物合成调控研究奠定了基础。

关键词: *AP2/ERF* 转录因子; 西红花; 基因家族鉴定; 植物激素; 脱辅基类胡萝卜素

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)22-8322-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.22.022

Identification of *AP2/ERF* gene family in *Crocus sativus* and analysis of de-prothetic group apocarotenoid biosynthesis in stigmas induced by its responsive hormone

GAO Guangchun¹, XIAO Chen¹, LI Jun², HUANG Xiong¹, MAO Lisa^{1,3}, PAN Kexin¹

1. Jiaxing Innovation team of Natural Medicine and Health Food Research & Technology, College of Medicine, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China

2. School of Modern Agriculture, Jiaxing Vocational & Technical College, Jiaxing 314036, China

3. Zhejiang Key Laboratory of Plant Secondary Metabolism and Regulation, College of Life Science and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

Abstract: Objective This study aims to characterize the *AP2/ERF* transcription factor family in *Crocus sativus* and examine the biosynthesis of active components in the stigma induced by responsive hormone signals, laying the foundation for the research on the secondary metabolic regulatory network of *C. sativus* stigmas. **Methods** *AP2/ERF* transcription factors were searched and identified

收稿日期: 2025-05-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81703667); 嘉兴市公益性研究计划项目 (2023AY11048, 2025CGZ056); 嘉兴大学校级 SRT 项目 (8517241041)

作者简介: 高广春, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源与药用活性成分的开发。Tel: 13738275846 E-mail: gaogcjx@163.com

*通信作者: 李 军, 博士, 教授, 研究方向为药用植物生物技术。Tel: 13738286846 E-mail: lijun@jxvtc.edu.cn

using hidden Markov model (HMM) based on *C. sativus* genome data. Bioinformatics analysis software and online websites were performed to characterize their physicochemical properties, chromosomal locations, phylogenetic tree, conserved domains/motifs, and *cis*-acting elements of promoters. The contents of picrocrocin, crocin I and crocin II in the stigma after treatment with gibberellin A3 (GA3) and methyl jasmonate (MeJA) were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and quantitative real-time PCR (qRT-PCR), respectively. Meanwhile, the expression levels of the related biosynthesis functional genes and some *CsAP2/ERFs* genes were also measured. **Results** A total of 88 *AP2/ERFs* transcription factors were identified in *C. sativus*, which distributed across eight chromosomes. Phylogenetic analysis combined with the examination of conserved motifs indicated that *CsAP2/ERFs* can be categorized into three subfamilies: DREB, ERF, and soloist. Among these, a total of 81 *CsAP2/ERFs* were classified within the DREB and ERF subfamilies. Both GA3 and MeJA promoted the synthesis of crocin I and crocin II, but had the opposite effect on the synthesis of picrocrocin. *CsAP2/ERF1*, 9, 2, 33 and 34 were induced by hormone signals to undergo significant changes in their expression levels during the development of the stigma. Moreover, the changes induced by GA3 and MeJA were in opposite trends. Correlation analysis of gene expression revealed that five *CsAP2/ERFs* were significantly correlated with different functional genes under the influence of hormones, indicating that *CsAP2/ERFs* responsive hormone signals regulated the key genes for the generation of de-prothetic group carotenoid compounds in the stigmas, thereby affecting the biosynthesis of the active ingredients of *C. sativus*. **Conclusion** This study identifies *CsAP2/ERFs* transcription factor family in *C. sativus* and clarifies the expression patterns of related functional genes and some *CsAP2/ERFs* after treatment with GA3 and MeJA. These findings provide a foundational basis for investigating the regulatory mechanisms of de-prothetic group apocarotenoid biosynthesis in *C. sativus* induced by responsive hormonal signaling.

Key words: AP2/ERF transcription factors; *Crocus sativus* L.; gene family identification; phytohormones; de-prothetic group apocarotenoid

西红花 *Crocus sativus* L. 为鸢尾科西红花属球茎类多年生草本植物, 在浙江、江苏、上海、四川等地广泛栽培, 常被用于食品、化妆品行业染料及香料的制作, 其干燥柱头是一种名贵中药材, 具有凉血解毒、活血化瘀、解郁安神等功效^[1]。西红花生产采用球茎进行无性繁殖, 我国多采用田间繁育球茎和室内培养开花的“二段式”栽培模式, 室内培养阶段是西红花花期调控的关键时期, 也决定着中药西红花的产量和品质, 因此在室内培养阶段通过变温、光照、激素等处理以提高西红花柱头产量和药效成分的含量成为近年来的研究热点^[2-6]。

西红花柱头中的主要药效成分为脱辅基类胡萝卜素类化合物^[7], 其中西红花苦苷、西红花苷 I 和西红花苷 II 是 3 个主要药效成分, 其含量作为药材质量控制的标准^[1]。西红花柱头中脱辅基类胡萝卜素类化合物的生物合成途径, 以及关键功能基因如 *CsLCYB2a*、*CsBCH1*、*CsCCD2L* 等已有较多研究^[8], 然而转录调控作为药用植物有效成分在特定生长发育时期和组织器官生物合成的重要作用机制, 在西红花柱头脱辅基类胡萝卜素的生物合成中研究相对薄弱。目前已鉴定到的相关转录因子有 *CsULT1*^[9], *CsMYB1* 和 *CsMYB2*^[10], *CsMYB14*^[11], *CsPHD27*^[12], 瞬时过表达这些转录因子可以提高柱头中脱辅基类胡萝卜素类化合物的积累, 然而相

于青蒿素、紫杉醇、丹参酮等药效成分的转录调控机制的研究^[13], 西红花柱头中药效成分生物合成相关转录调控因子与上下游信号通路的协同调控以及受激素诱导表达等方面的研究还不够深入。

AP2/ERF 基因家族是植物中特有的一类转录调控因子, 可调控植物的生长发育及响应各种非生物胁迫^[14], 同时也参与植物次生代谢产物的积累^[15-16]。近年有学者提出“环境因子-激素信号-转录因子-活性成分”这一转录调控模式, 认为植物激素作为环境因子与转录因子之间的“掮客”, 通过响应外界胁迫、相互协同或拮抗调控药用植物活性成分的生物合成, 是促进药用植物活性成分积累的关键因素^[13]。赤霉素 (gibberellin A3, GA3) 和茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 是植物次生代谢的重要调控因子^[17], 研究发现红豆杉 *TcERF12* 和 *TcERF15* 可以响应 MeJA 信号分别抑制和激活紫杉醇生物合成途径中的功能基因^[18], 黄花蒿 *AaERF1*、*AaERF2* 也能响应 MeJA 信号促进青蒿素生物合成^[19]。由此可见 *AP2/ERFs* 转录因子家族在响应激素信号调控药用植物中药效成分的生物合成中发挥重要的作用, 然而对于西红花柱头中响应激素信号诱导并调控药效成分的生物合成的 *CsAP2/ERFs* 转录因子尚无相关报道。

本研究基于西红花基因组数据鉴定了

AP2/ERFs 转录因子家族成员, 并对其进行了蛋白理化性质、系统发育、保守基序、保守结构域和启动子上游序列的顺式作用元件分析。测定 GA3 和 MeJA 处理后柱头发育过程中功能基因和 CsAP2/ERFs 的表达模式, 以及柱头中主要药效成分的含量变化, 为解析 CsAP2/ERFs 响应激素信号调控药效成分生物合成的分子机制奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

2024 年 5 月份采收嘉兴职业技术学院种植基地的西红花球茎于室内培养。选取长势一致、无病虫害、种球质量 25 g 左右、芽长 4 cm 左右的西红花种球进行外源激素处理。分别采用 100 mg/L GA3 和 100 μ mol/L MeJA 浸泡种球 24 h, 以纯水处理作为对照组。试验共设 3 个处理, 每个处理设 3 次重复, 每次重复选用 30 个供试种球。处理结束将种球取出放置于室内培养架上按照常规培养方法培养至柱头采收。根据柱头的生长发育情况于 3 个时期进行采收, 初期 (S1, 花刚萌出, 花苞及叶片集中于芽底部, 拨开芽鞘见浅红色花柱和柱头), 中期 (S2, 花苞叶片分离, 花瓣未展开), 盛期 (S3, 花瓣完全展开, 柱头发育成熟)。3 个时期收集的柱头于液氮中快速冷冻后 -80 $^{\circ}$ C 保存, 用于功能基因和 CsAP2/ERFs 的表达分析, S3 时期收集的柱头于 50 $^{\circ}$ C 低温烘干用于相关代谢物的含量测定。

1.2 试剂

GA3 及 MeJA 购自上海源叶生物科技有限公司, 西红花柱头总 RNA 提取采用 TIANGEN 生化科技有限公司植物总 RNA 提取试剂盒 (DP432), 反转录试剂盒采用 Thermo scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(K1622), 荧光定量 PCR 试剂盒为 Takara 公司 TB GreenTM premix ExTaqTM (Tli RNaseH Plus) (RR420A)。实验所用引物由上海生工生物科技有限公司合成。其它色谱纯和分析纯试剂购于上海泰坦科技股份有限公司。

2 方法

2.1 CsAP2/ERFs 基因家族鉴定及蛋白理化性质分析

基于西红花全基因组数据 (Csa6) [20], 在 Pfam (<http://pfam.xfam.org/search>) 数据库中获取 AP2/ERFs 转录因子家族 (ID: PF000847) 的隐马尔可夫模型, 利用 hmmsearch 程序筛选含有 AP2/ERFs 转录因子结构的基因, 剔除不完整和重复序列, 设定 E-value 值小于 1×10^{-28} 和 bitscore 值大于 110 进

一步筛选获得候选基因, 进一步利用 Batch CD-Search 在 NCBI 数据库中进行比对筛选获得 CsAP2/ERFs 转录因子。利用 ExPASy (<http://web.expasy.org/>) 网站进行蛋白质理化性质分析, 利用 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 进行亚细胞定位分析。

2.2 CsAP2/ERFs 染色体定位和系统进化树分析

利用 TB-tools II 软件对获得的 88 个 CsAP2/ERFs 基因家族成员在染色体上的位置进行分析。从 TAIR (<https://www.arabidopsis.org>) 数据库中下载拟南芥 AP2/ERFs 转录因子蛋白序列, 使用 MEGA 11.0 软件对西红花和拟南芥的 AP2/ERFs 家族成员蛋白质序列进行多重序列比对, 使用邻接法 (neigh-joining, NJ) 构建进化树。借助在线工具 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 对构建的进化树进行美化。

2.3 CsAP2/ERFs 保守基序、结构域和顺式作用元件预测

利用在线工具 MEME (<http://meme-suite.org/index.html>) 对 CsAP2/ERFs 蛋白的保守基序进行预测。利用 NCBI 在线工具 CD-search 工具预测结构域。利用 TBtools 软件对以上结果进行可视化分析。从基因组注释文件中提取获得 CsAP2/ERFs 转录因子对应的启动子序列, 提交到 Plant-CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 网站进行顺式作用元件预测, 筛选后使用 TBtools 软件对顺式作用元件进行可视化。

2.4 西红花主要药效成分的含量测定

参照《中国药典》2020 年版一部, 准确称取 5 mg 经激素处理后收集到的干燥柱头粉末, 置 5 mL 棕色量瓶中, 加适量 50%乙醇, 50 $^{\circ}$ C 水浴提取 30 min, 放至室温后定容, 0.22 μ m 滤头滤过后即进样分析。液相分析采用 Shimadzu LC-2050 3D 液相色谱仪配 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱和 PDA 检测器。流动相为水 (A)-乙腈 (B)。梯度洗脱: 0~18 min, 15%~23% B; 18~26 min, 23%~25% B; 26~45 min, 25%~50% B; 45~50 min, 50%~80% B。西红花苷 I 和西红花苷 II 检测波长为 440 nm, 西红花苦苷检测波长为 254 nm。每个样品设置 3 个重复。化合物含量依据吸收峰峰面积进行外标法计算。

2.5 功能基因和 CsAP2/ERFs 的表达量分析

将西红花柱头于液氮中研磨成粉末, 使用

TIANGEN 试剂盒提取柱头总 RNA, 将完整性好、纯度高的 RNA 利用反转录试剂盒进行反应合成 cDNA。以 18 S rRNA 为内参基因, 利用 Primer Premier 5.0 设计功能基因 (*CsLYCB2a*、*CsBCH1*、*CsCCD2L*、*CsUGT709G1*、*CsALDH3II* 和 *CsUGT74AD1*) 和 *CsAP2/ERFs* 的特异性引物 (表 1) 用于 qRT-PCR 反应。根据 TB Green Premix

ExTaq™ 试剂盒说明书配置反应体系, 模板 cDNA 1 μL, 总反应体积 10 μL。反应条件为 95 ℃ 保温 30 s, 然后 95 ℃、5 s, 58 ℃、30 s, 72 ℃、30 s, 循环数为 40 个, 最后 95 ℃、15 s, 58 ℃、60 s, 95 ℃、15 s 添加熔解曲线, 设置 3 次生物学重复, 结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因的相对表达量差异。

表 1 功能基因和 *CsAP2/ERFs* 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers of function genes and *CsAP2/ERFs* used in qRT-PCR

基因名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>Cs18S rRNA</i>	ACGAAACCCCGGCGCAGTGGGC	TCGCTACGTTCTTCATCGATGCG
<i>CsLCYB2a</i>	ACGAGTTTGCGGAGTTGG	GGCCTTGGCCTTATGGAA
<i>CsBCH1</i>	TGACGATGTGGAGGAAGAGAA	CAAGCGAAGCGGTAGTAGAC
<i>CsCCD2L</i>	GGAGGCAGAGAAGAGGAAGAA	GACGACGACCACTACTACGA
<i>CsALDH3II</i>	CCTGCCACATCATCATTTG	TGGTGTTAGGTGCTTTGC
<i>CsUGT74AD1</i>	CAGCCTATGAATGCCAAGT	TCCACCCCTCACTAACAGA
<i>CsUGT709G1</i>	CACAGCGGTTGGAACCTCTAC	ACTTCCTTACCATCCTCTCC
<i>CsAP2/ERF1</i>	CGGCGGTGTACTTGTTACG	ATGTCGGCATCAGGATCGG
<i>CsAP2/ERF9</i>	CGTTGGACTTCGACCTCTTCT	GAGCCTGGAGATCCGCATAG
<i>CsAP2/ERF27</i>	AATCCGACTCCGAAGAAGAAGA	GGCACCTCCGAGAAATCCA
<i>CsAP2/ERF33</i>	ATCCGTTATCCGTCTCTTCCAA	CATCCTGGCACCCGACATT
<i>CsAP2/ERF34</i>	ATACCCTCTCTCCGATCCT	CGTCGAGATTGATCCGATCC

2.6 功能基因和 *CsAP2/ERFs* 的表达相关性分析

利用美吉云平台两矩阵相关性热图分析工具 (<https://www.majorbio.com/tools>) 对功能基因 (*CsLYCB2a*、*CsBCH1*、*CsCCD2L*、*CsUGT709G1*、*CsALDH3II* 和 *CsUGT74AD1*) 和 *CsAP2/ERFs* 进行表达相关性分析。相关系数采用 Pearson 算法, 获得的数据结果通过在线平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn>) 进行三角热图可视化展示。

2.7 数据统计分析

激素作用后柱头中药效成分含量和基因表达的差异显著性分析采用双因素方差分析, turkey 多重比较确定差异显著性水平。利用 Graphpad Prism 8.0 软件进行数据统计分析和作图。

3 结果与分析

3.1 *CsAP2/ERFs* 基因家族鉴定及蛋白理化性质

根据 HMMsearch 检索结果和 Batch CD-Search 在线 NCBI 数据库筛选, 进一步通过设置 E-value 和 Bitscore 值从西红花基因组中共获得 88 个 AP2/ERFs 转录因子, 命名为 *CsAP2/ERF1* ~ *CsAP2/ERF88*。蛋白理化性质分析发现, 这些基因编码的氨基酸序列长度从 140 aa 到 399 aa 不等, 相对分子质量最小为 15 834 850, 最大为 44 098 900。

理论等电点 4.77~10.96, 其中酸性蛋白占 68.18%, 碱性蛋白占 31.81%。不稳定系数在 29.58~72.91, 其中 5 个蛋白小于 40, 说明绝大多数蛋白稳定性较好。脂肪系数在 46.2~79.68, 总平均亲水性均为负值, 说明 *CsAP2/ERF* 家族蛋白为亲水性蛋白。亚细胞预测结果显示大多数蛋白主要定位于细胞核中, 少数蛋白定位于叶绿体、高尔基体和过氧化物酶体中。

3.2 *CsAP2/ERFs* 染色体定位和系统进化树分析

根据 88 个西红花的基因组注释文件分析基因在染色体上的位置, 采用 TBtools 软件进行可视化 (图 1)。结果显示基因较均匀的分布于 8 条染色体上, 其中 7 号染色体上数量最多, 达 17 个, 1 号和 5 号染色体上均为 13 个, 3 号染色体上分布最少, 仅有 7 个。

通过对西红花和拟南芥的 AP2/ERF 家族成员构建 NJ 进化树, 并对 *CsAP2/ERFs* 和 *AtAP2/ERFs* 家族成员的亲缘关系进行分类, 发现 88 个 *CsAP2/ERFs* 共分成 3 个亚家族, 包括 ERF、DREB 和 Soloist, 不包含 AP2 和 RAV 亚家族成员 (图 2)。3 个亚家族中 DREB 所占比例较大, 含有 60 个 *CsAP2/ERF*, Soloist 亚家族含有 7 个 *CsAP2/ERF* (4、38、50、69、78、

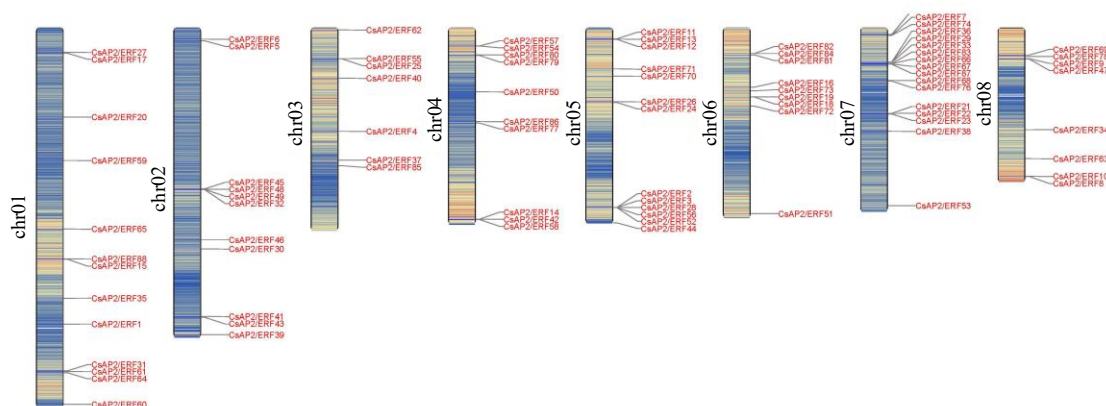


图 1 西红花 *CsAP2/ERFs* 基因家族基因染色体定位
Fig. 1 Chromosome assignment of *CsAP2/ERFs* family genes in *C. Sativus*

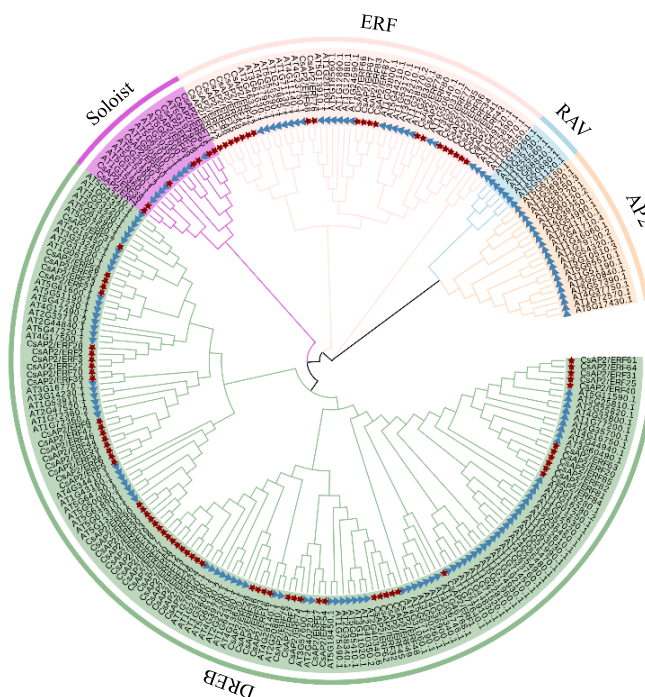


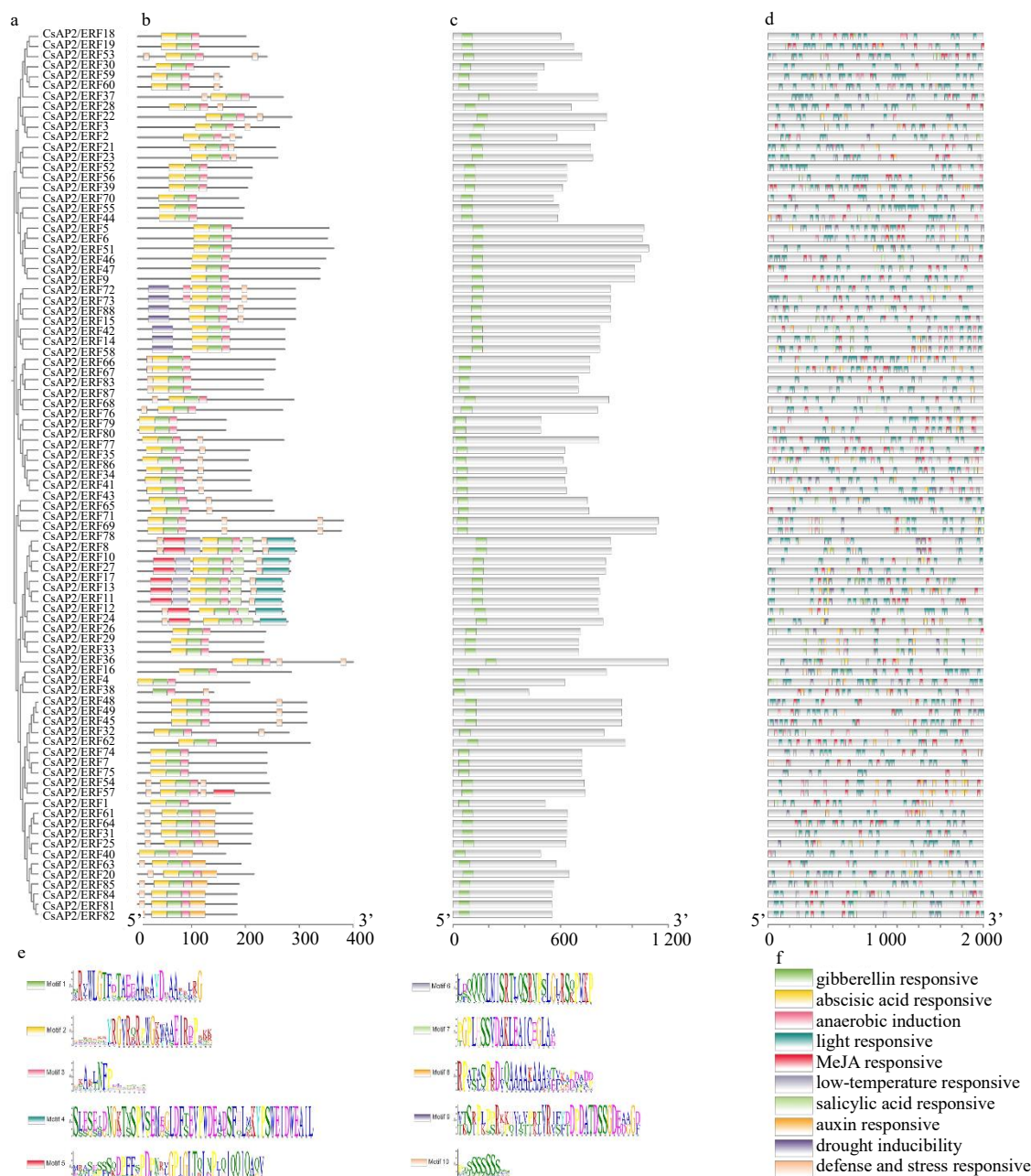
图 2 西红花和拟南芥中 *AP2/ERF* 家族基因的系统发育进化树
Fig. 2 Phylogenetic evolutionary tree of *AP2/ERFs* family gene in *C. sativus* and *Arabidopsis thaliana*

65、71)。西红花与拟南芥 *AP2/ERF* 家族基因在进化过程中存在明显的聚类现象，表明 2 个物种的基因在进化中具有一定的保守性，且亲缘关系较近的基因在生物学功能上也是相似的。

3.3 *CsAP2/ERFs* 家族保守基序和结构域分析

结合 *CsAP2/ERFs* 基因家族分子进化树、Motif、保守结构域，对其进行可视化分析（图 3-a~c）。蛋白保守基序通常与特定功能相关，本研究分析发现除 *CsAP2/ERF50* 外，西红花 *AP2/ERF* 家族均含有 Motif1、Motif2 和 Motif3，为最保守的基序。部分

基序特异性的存在于一些亚家族中，如 Motif9 仅存在于 ERF 亚家族的一个分支中，包括 *CsAP2/ERF42*、14、58、15、88、73 和 72；Motif4、Motif5 和 Motif7 特异性的存在于 DREB 亚家族的另一个分支中，包含 9 个基因（*CsAP2/ERF8*、10、27、17、13、11、12、24 和 26），说明这些基因在进化上高度保守，表现出更近的亲缘关系，同时也行使特定的功能。基因结构域可视化分析结果显示所有基因仅含有 1 个 AP2 结构域，因此均不属于 AP2 亚家族，与系统发育树分析结果一致。



a-分子进化树；b-保守基序；c-AP2 保守结构域；d-顺式作用元件；e-保守基序图例及序列图；f-顺式作用元件图例。

a-molecular evolution tree; b-motifs; c-AP2 conservative structural domains; d-*cis*-acting elements; e-legend and sequence diagram of conserved motifs; f-legend of *cis*-acting elements.

图 3 西红柿 *CsAP2/ERFs* 家族蛋白分析

Fig. 3 *CsAP2/ERFs* family protein analysis in *C. sativus*

3.4 *CsAP2/ERF* 基因家族的顺式作用元件分析

为了探讨西红柿 *AP2/ERFs* 基因家族的生物学功能,利用 PlantCARE 数据库对 88 个 *CsAP2/ERFs* 基因的启动子序列进行顺式作用元件分析 (图 3-d)。结果表明 *CsAP2/ERFs* 基因启动子中主要为信号响应类顺式作用元件,包含光响应 (43.96%),激素响应 (42.85%) 和非生物胁迫响应信号 (13.18%)。

由此可见光响应和激素响应元件在 *CsAP2/ERFs* 基因家族中普遍存在,这提示该类转录因子广泛参与西红柿的光信号和激素信号的传导过程。激素信号响应元件中 MeJA 响应元件数量最多,占激素响应元件的 46.99%,另外脱落酸响应元件占 33.33%,生长素响应元件占 8.08%,GA 响应元件占 6.36%,水杨酸响应元件占 5.24%,表明 *CsAP2/ERFs* 类基

因参与介导不同植物激素的信号传导。非生物胁迫相关的顺式作用元件依次有厌氧、低温、干旱、防御和应激响应相关的元件,该结果也说明了 *CsAP2/ERFs* 具有多样的响应非生物胁迫的作用。此外,还发现了与胚乳和分生组织表达,黄酮类生物合成相关的顺式作用元件,这表明了 *CsAP2/ERFs* 在西红花生长发育和黄酮类次生代谢物生物合成中也发挥了重要的作用。

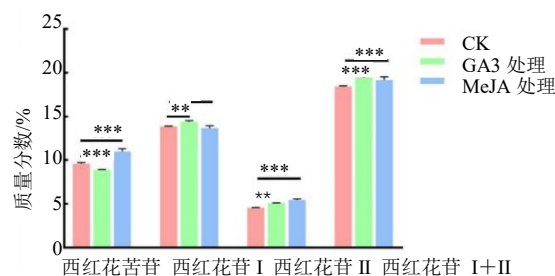
目前 MeJA 和水杨酸参与调控植物萜类化合物的生物合成的研究较多,GA、生长素、脱落酸等对萜类成分同样具有促进作用^[21]。本研究 *CsAP2/ERFs* 基因家族的顺式作用元件分析结果显示 MeJA 元件分布广泛,且大多数基因含有 2 个及以上的作用位点,只有 *CsAP2/ERF22*、32、52、60 和 85 基因的启动子序列不含该元件。GA 响应元件虽在 *CsAP2/ERFs* 基因家族分布不如 MeJA 广泛,但其对西红花药效成分生物合成的作用还有待进一步的深入探讨。本研究根据 GA 和 MeJA 顺式作用元件分布情况,并且结合本实验室前期西红花柱头转录组测序数据中基因表达情况,选择 *CsAP2/ERF1*、9、27、33 和 34 5 个转录因子分析其参与介导激素信号影响药效成分生物合成的作用。

3.5 GA3 和 MeJA 处理对西红花柱头主要药效成分含量的影响

GA3 和 MeJA 处理对西红花柱头中西红花苦苣苷、西红花苷 I 和西红花苷 II 的含量有不同的影响(图 4)。与对照相比,GA3 处理后西红花苦苣苷的含量由 9.60%降低到 8.88%,MeJA 处理后西红花苦苣苷的含量提高到 11.01%,且均达到极显著水平($P < 0.001$)。西红花苷 I 的含量在 GA3 处理后由 13.85%显著提高至 14.40% ($P < 0.01$),然而 MeJA 处理未对西红花苷 I 含量产生明显作用。西红花苷 II 的含量在 2 种激素的作用下均表现出明显的提高,含量分别为 5.08%和 5.47%,与对照组(4.58%)比较均差异极显著($P < 0.001$)。西红花苷 I 和 II 的总含量在 2 种激素的作用下也表现为极为显著的提高($P < 0.001$)。由此可见,100 mg/L GA3 浸泡球茎可以抑制西红花苦苣苷的生物合成,相反的 100 μ mol/L MeJA 处理可以促进西红花苷的合成,对于西红花苷 I 和 II 的生物合成,2 种激素作用趋势一致,均能提高西红花总苷的含量。

3.6 GA3 和 MeJA 处理对功能基因的表达影响分析

西红花柱头中药效成分的生物合成过程主要



** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 图 6、7 同。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, same as Fig. 6, 7.

图 4 GA3 和 MeJA 处理对西红花柱头中主要药效成分含量的影响

Fig. 4 Effect on contents of major compounds in stigma treated with GA3 and MeJA

涉及 3 条生物合成途径,本实验研究了 GA3 和 MeJA 处理对柱头中脱辅基类胡萝卜素类化合物生物合成中的关键功能基因的表达影响,涉及类胡萝卜素和西红花苷生物合成途径中多个酶基因在柱头发育过程中的表达情况(图 5)。结果显示,在类胡萝卜素生物合成途径中,生成关键底物玉米黄素的上游 *CsLCYB2a* 和 *CsBCHI* 基因在柱头发育过程中均受到 2 种激素的显著影响,在 S2 期较对照比表达量均较高,在柱头发育过程中表达量先升高后降低,且在 S2 期表达量最高($P < 0.001$),这为下游脱辅基类胡萝卜素类成分的生物合成底物积累了充足的合成前体物质。

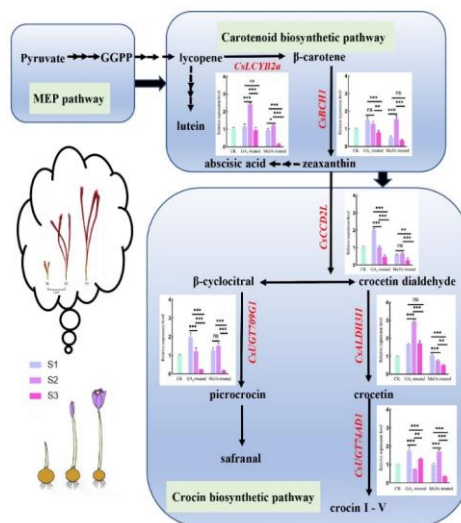


图 5 GA3 和 MeJA 处理对西红花脱辅基类胡萝卜素类成分生物合成相关功能基因表达的影响

Fig. 5 Effect on expression of functional genes related to de-prothetic group apocarotenoid biosynthesis in *C. sativus* treated with GA3 and MeJA

在西红花苷生物合成途径, CsCCD2L 裂解玉米黄素生成 β -环柠檬醛和西红花二醛, GA3 处理可使 CsCCD2L 在柱头发育早期 S1 表达量极显著的上调 ($P<0.001$), 后期表达量下降, 说明 GA3 处理可促进 CsCCD2L 基因提早大量表达, 有利于后续药效物质的生物合成。GA3 和 MeJA 处理后, CsUGT709G1 基因的表达模式与 CsCCD2L 的表达趋势一致, 说明西红花苦苷的生物合成在柱头发育早中期含量会达到最高, S3 期基因表达量明显下调 ($P<0.001$), 结合 GA3 处理后 S3 时期西红花苦苷含量下调说明该化合物在柱头发育的后期可能进一步在糖基转移酶的作用下生成番红花醛, 使得 S3 期西红花表现出更出色的香味。MeJA 处理后 CsCCD2L 和 CsUGT709G1 在柱头发育的 S1 和 S2 期表达差异不显著, 但相对于对照组, CsUGT709G1 在 S1 和 S2 期表达量升高, 这可能是导致 S3 期西红花苦苷含量升高的原因。

西红花二醛在乙醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenases, ALDHs) 的催化下生成番红花酸, CsALDH3II 在 GA3 处理后的柱头发育过程中相对于对照均表达上调, 提示该基因在番红花酸生成过程中发挥重要的作用, 也是西红花苷生成量增加的主要原因之一。MeJA 处理后 CsALDH3II 相对于对照表达量均下调, 与 MeJA 处理后西红花苷含量由 18.43% 提高至 19.16% 不一致, 原因可能是 MeJA 会诱导其他 ALDHs 酶基因表达上调。番红花酸在糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferases, UGTs) 作用下可形成一系列结构不同的西红花苷, 目前已鉴定的 CsUGT74AD1 可体外催化番红花酸生成西红花苷 III 和 V, GA3 和 MeJA 处理均可影响 CsUGT74AD1

基因的表达, 并表现出不同的变化趋势, 最终影响西红花苷的在柱头中的积累。本研究结果 GA3 和 MeJA 作用均能影响西红花脱辅基类胡萝卜素类成分生物合成功能基因在柱头发育过程中的表达, 进而影响药效成分的合成积累。

3.7 GA3 和 MeJA 处理对 CsAP2/ERFs 转录因子的表达影响分析

为了分析 CsAP2/ERFs 介导激素信号影响西红花柱头脱辅基类胡萝卜类成分的生物合成, 选择 5 个 CsAP2/ERFs 转录因子, 研究其在 GA3 和 MeJA 处理后柱头发育过程中的表达情况。结果显示 (图 6), GA3 处理后 CsAP2/ERF1、CsAP2/ERF9、CsAP2/ERF33 和 CsAP2/ERF34 在柱头发育过程中表达量发生不同程度的上调, 且均达到极显著水平 ($P<0.001$), CsAP2/ERF27 表达量先增加后降低。MeJA 处理后 5 个 CsAP2/ERFs 基因在柱头发育过程均表现出相似的下降趋势, 但 CsAP2/ERF33 从 S1 期到 S2 期下降不明显 ($P>0.05$), 而 CsAP2/ERF1 和 CsAP2/ERF9 从 S1 期到 S2 期分别下降了 8.05 和 12.48 倍, 提示其可能参与响应 MeJA 信号调控柱头的生长发育和次生代谢物的生物合成。以上结果显示 5 个 CsAP2/ERFs 基因的表达在 GA3 和 MeJA 处理后均有不同程度的响应, 结合激素处理对柱头药效成分积累的影响, 表明 CsAP2/ERFs 在介导激素信号调控药效成分的生物合成中发挥重要作用。

3.8 GA3 和 MeJA 处理后功能基因和 CsAP2/ERFs 转录因子的表达相关性分析

为了进一步明确 5 个 CsAP2/ERFs 与功能基因的转录调控关系, 对其进行了表达相关性分析。结

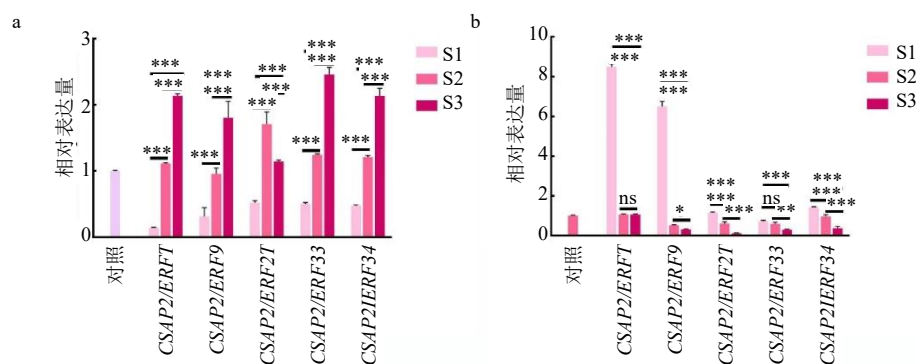


图 6 GA3 (a) 和 MeJA (b) 处理对西红花苷生物合成 CsAP2/ERFs 表达的影响

Fig. 6 Effect on expression of CsAP2/ERFs in *C. sativus* biosynthesis treated with GA3 (a) and MeJA (b)

果显示(图7), GA3 处理组中, *CsAP2/ERF1*、9、33 和 34 与 *CsBCH1*、*CsCCD2L* 和 *CsUGT709G1* 呈极显著的负相关($r < -0.8$, $P < 0.01$), 推测这些转录因子可能通过介导 GA3 信号调控 *CsBCH1*、*CsCCD2L* 和 *CsUGT709G1* 的表达参与柱头中脱辅基类胡萝卜类成分的生物合成; *CsAP2/ERF27* 与 *CsUGT74AD1* 表现为极显著的负相关($r = -0.88$, $P = 0.0015$), 与 *CsALDH3II* 显著正相关($r = 0.76$, $P = 0.0159$), 而这两个功能基因参与西红花苷的生物合成, 推测 *CsAP2/ERF27* 响应 GA3 信号参与调控西红花苷在柱头中的积累。MeJA 处理组中, *CsAP2/ERF33* 与 *CsLYCB2a*、*CsBCH1*、*CsCCD2L*,

CsUGT709G1 和 *CsUGT74AD1* 均表现出极显著的正相关性($r > 0.8$, $P < 0.01$), 由此可见 *CsAP2/ERF33* 在 MeJA 影响柱头中脱辅基类胡萝卜类成分生物合成功能基因表达中发挥重要作用。*CsAP2/ERF1*、9、27 和 34 与 *CsALDH3II* 呈极显著的正相关性($r > 0.8$, $P < 0.01$), 提示这些转录因子也介导了 MeJA 信号调控 *CsALDH3II* 的表达, 进而影响柱头发育过程中药效成分的生物合成。综合以上分析, 推测 *CsAP2/ERF1*、9、27、33 和 34 可响应 GA3 和 MeJA 信号调控西红花柱头发育过程中脱辅基类胡萝卜类成分生物合成功能基因的表达进而影响药效成分的积累中发挥重要作用。

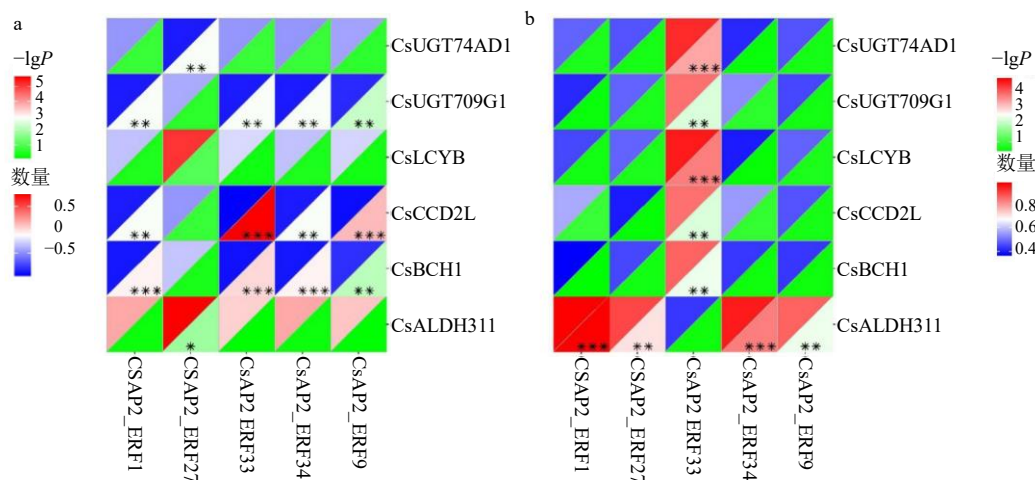


图7 GA3 (a) 和 MeJA (b) 处理 *CsAP2/ERFs* 与功能基因的表达相关性分析

Fig. 7 Expression correlation analysis of *CsAP2/ERFs* and function genes in *C. sativus* treated with GA3 (a) and MeJA (b)

4 讨论

4.1 西红花 *CsAP2/ERFs* 转录因子研究具有重要意义

西红花不仅是世界上最昂贵的香料, 也是临床上应用非常广泛的中药, 有“植物黄金”的美誉。目前美国膳食补充剂官方查询数据库(DSLD)中已收录的含有西红花提取物及西红花苷的商品达 322 个(<https://dsld.od.nih.gov>), 可见西红花的市场开发潜力巨大。然而由于西红花特殊的生物学特性, 如三倍体仅靠球茎繁殖, 每个球茎每年仅秋季开花一次, 且药用部位柱头的产量极低, 采收人工成本高等因素使得西红花市场售价高, 不能满足市场的需求^[22]。因此围绕西红花药效成分生物合成相关基因及调控机制的研究一直是国内外的研究热点^[23-25]。AP2/ERF 转录因子家族可通过调控次生代谢产物的生物合成以应对各种逆境胁迫^[16], 本研究基于西红花基因组数据分析 *CsAP2/ERFs* 转录因子响应激

素信号调控柱头药效成分的生物合成, 有助于挖掘参与西红花药效成分生物合成的调控转录因子, 理解西红花应对逆境胁迫的分子作用机制。

4.2 西红花 *CsAP2/ERFs* 转录因子在西红花响应逆境胁迫和药效成分生物合成中具有重要作用

本研究从西红花基因组数据中共鉴定到 88 个 *CsAP2/ERFs* 家族成员, 根据保守结构域和系统进化分析发现 88 个基因分布于 3 个亚家族中, 其中 DREB 亚家族 60 个, ERF 亚家族 21 个, soloist 亚家族 7 个。DREB 亚家族含有一个 AP2 保守结构域, 已有的研究证实该类转录因子主要参与调控植物对逆境胁迫的响应^[15], *CsAP2/ERFs* 家族中 68.2% 的转录因子分布于 DREB 亚家族, 表明在西红花响应逆境胁迫的生理过程中 DREB 亚家族成员扮演着重要角色。与 DREB 亚家族成员不同, ERF 转录因子主要参与植物次生代谢调控^[26], 如 CrERF5 能够调控长春花碱的生物合成^[27], SmERF73 可以调控

丹参酮的生物合成^[28]。由结构域和系统进化分析推测西红花中 *CsAP2/ERFs* 家族成员在西红花响应逆境胁迫和药效成分生物合成方面发挥重要的作用。

4.3 西红花 *CsAP2/ERFs* 转录因子启动子含有多种响应激素信号的顺式作用元件

转录因子调控药用植物中药效成分生物合成的机制是复杂而多层次的,植物激素介导环境因子的信号启动下游信号通路的改变,最终影响次生代谢物的生物合成。目前已发现的介导非生物胁迫的激素信号有脱落酸(abscisic acid, ABA)、赤霉素(gibberellic acid, GA)、吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、MeJA、水杨酸(salicylic acid, SA)等,通过外源施加激素可以提高药用植物中有效成分的生成^[13, 29]。本研究对西红花 *CsAP2/ERFs* 转录因子家族进行了启动子的顺式作用元件分析,结果发现该类转录因子家族广泛参与西红花的非生物胁迫,其中响应激素信号的作用元件数量最多,包括 MeJA、ABA 等顺式作用元件,推测这些激素信号在西红花响应非生物胁迫,调控西红花脱辅基类胡萝卜素类成分的生物合成中发挥重要的作用。GA 和 MeJA 是目前常用于研究次生代谢调控的激素,例如外源施加 GA 和 MeJA 可以显著促进茜草中茜草素,羟基茜草素等的积累^[30],在丹参毛状根培养过程中施加 MeJA 可以促进丹参酮等活性成分功能基因的表达和成分含量的增加^[31]。同样,GA 和 MeJA 在植物甾体类生物碱合成中的作用也得到了验证^[32]。

4.4 西红花 *CsAP2/ERFs* 转录因子在响应 GA3 和 MeJA 信号参与调控柱头药效成分的生物合成中的重要作用

本研究应用 GA3 和 MeJA 激素处理西红花球茎,发现 GA3 能够减少成熟柱头中西红花苦苷的积累,促进西红花苷 I 和 II 的生成,Chen 等^[33]研究发现施用 5 mg/L 的 GA3 同样也能促进西红花苷 I 和 II 的生成,MeJA 处理与 Ziaei 等^[34]的研究结果一致,西红花苦苷、西红花苷 I 和 II 的生成量均明显提高,由此说明 2 种激素可以促进柱头中主要药效成分的生物合成,然而对于 2 种激素处理后西红花苷生物合成功能基因在柱头发育过程的动态变化过程,以及可能的调控转录因子仍不清楚。因此,本研究分析了 GA3 和 MeJA 处理后药效成分生物合成相关功能基因(*CsLCYB2a*、*CsBCH1*、*CsCCD2L*、*CsALDH3II*、*CsUGT74AD1* 和 *CsUGT709G1*) 的表

达情况,发现在柱头发育的早期和中期,绝大多数基因的表达量较对照都有较大的提高,为后期脱辅基类胡萝卜类成分的生物合成奠定基础。后期多数基因的表达量降低,表达趋势与以前的报道一致^[35],说明了功能基因表达的高峰期要早于药效成分积累的高峰期。本研究进一步分析了 2 种激素处理后柱头中 *CsAP2/ERF1*、*CsAP2/ERF9*、*CsAP2/ERF27*、*CsAP2/ERF33* 和 *CsAP2/ERF34* 共 5 个基因的表达情况,发现与对照组相比各个基因均发生了不同程度的改变,与功能基因的相关性分析发现 5 个 *CsAP2/ERFs* 对 GA3 和 MeJA 的响应方式不同,*CsAP2/ERF1*、*CsAP2/ERF9*、*CsAP2/ERF33* 和 *CsAP2/ERF34* 响应 GA3 信号,可以抑制功能基因的转录,从而调控功能基因在柱头的发育前期大量表达,促进药效成分的生成。相反,MeJA 处理可以诱导 *CsAP2/ERF33* 激活功能基因的表达,促进药效成分的生成。因此,GA3 和 MeJA 虽然都可促进柱头中药效成分的积累,但 *CsAP2/ERFs* 响应不同激素信号调控功能基因表达的作用方式不同,这反映了转录调控过程的复杂性。

综上所述,本研究从西红花基因组中鉴定了 88 个 *AP2/ERFs* 基因家族转录因子,并对其理化性质、亚细胞定位、系统发育、染色体定位、保守结构域、保守基序和顺式作用元件进行了分析,获得 *CsAP2/ERFs* 家族的基因染色体定位、基因功能和分类。通过测定 GA3 和 MeJA 处理后柱头中药效成分的含量、相关功能基因和 *CsAP2/ERFs* 转录因子在柱头发育过程中的表达量,明确了 *CsAP2/ERFs* 在响应 GA3 和 MeJA 信号参与调控柱头药效成分的生物合成中的重要作用,这一过程的具体调控机制和蛋白互作方式有待进一步验证。本研究为阐明 *CsAP2/ERFs* 转录因子响应激素信号调控西红花柱头药效成分生物合成研究奠定了基础。

志谢:整合药用植物组学平台(IMP)提供的西红花基因组数据。浙江理工大学浙江省植物次生代谢调控重点实验室杨东风教授团队给予技术指导和帮助。

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: 134.
- [2] Zhu J, Zhang Y C, Zhou L, et al. Growth and flowering of saffron (*Crocus sativus* L.) with three corm weights under different LED light qualities [J]. *Sci Hortic*, 2022, 303:

- 111202.
- [3] Surgun Acar Y. The effect of 24-epibrassinolide treatments at different concentrations on some growth parameters and crocin level in saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. *Int J Second Metab*, 2020, 7(2): 109-118.
 - [4] Javid M G, Hoseinifard M S, Allahdadi I, *et al.* Hormonal priming with BAP and GA3 induces improving yield and quality of saffron flower through promotion of carbohydrate accumulation in corm [J]. *J Plant Growth Regul*, 2022, 41(1): 205-215.
 - [5] Moradi A, Zarinkamar F, Mita G, *et al.* Enhanced production of apocarotenoids by salicylic acid elicitation in cell suspension cultures of saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. *Horticulturae*, 2022, 8(12): 1176.
 - [6] Moradi S, Kafi M, Aliniaefard S, *et al.* Monochromatic blue light enhances crocin and picrocrocin content by upregulating the expression of underlying biosynthetic pathway genes in saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. *Front Hortic*, 2022, 1: 960423.
 - [7] Tung N H, Hieu N N, Tuan V V, *et al.* A narrative review of phytochemical profile of saffron and principal crocetin glycosides [J]. *Longhua Chin Med*, 2022, 5: 28.
 - [8] Gao G C, Li J, Wang P, *et al.* Transcriptome-wide characterization of novel *WRKY* family genes engaged in crocin biosynthesis in *Crocus sativus* [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 149(5): 270-281.
 - [9] Ashraf N, Jain D, Vishwakarma R A. Identification, cloning and characterization of an ultrapetala transcription factor CsULT1 from *Crocus*: A novel regulator of apocarotenoid biosynthesis [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15: 25.
 - [10] 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.
 - [11] Hussain K, Kumar A, Fayaz M, *et al.* CstMYB14 links ROS signaling, apocarotenoid metabolism, and stress response in *Crocus sativus* L [J]. *Physiol Plant*, 2022, 174(3): e13712.
 - [12] Malik A H, Khurshaid N, Shabir N, *et al.* Transcriptome wide identification, characterization and expression analysis of PHD gene family in *Crocus sativus* [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2024, 30(1): 81-91.
 - [13] Zheng H, Fu X Q, Shao J, *et al.* Transcriptional regulatory network of high-value active ingredients in medicinal plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2023, 28(4): 429-446.
 - [14] Ma Z M, Hu L J, Jiang W Z. Understanding AP2/ERF transcription factor responses and tolerance to various abiotic stresses in plants: A comprehensive review [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 893.
 - [15] Zhao Y, Liu G Z, Yang F, *et al.* Multilayered regulation of secondary metabolism in medicinal plants [J]. *Mol Hortic*, 2023, 3(1): 11.
 - [16] Rabeh K, Hnini M, Oubohssaine M. A comprehensive review of transcription factor-mediated regulation of secondary metabolites in plants under environmental stress [J]. *Stress Biol*, 2025, 5(1): 15.
 - [17] Lv Z Y, Sun W J, Jiang R, *et al.* Phytohormones jasmonic acid, salicylic acid, gibberellins, and abscisic acid are key mediators of plant secondary metabolites [J]. *World J Tradit Chin Med*, 2021, 7(3): 307-325.
 - [18] Zhang M, Li S T, Nie L, *et al.* Two jasmonate-responsive factors, TcERF12 and TcERF15, respectively act as repressor and activator of tasy gene of taxol biosynthesis in *Taxus chinensis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2015, 89(4/5): 463-473.
 - [19] Yu Z X, Li J X, Yang C Q, *et al.* The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L [J]. *Mol Plant*, 2012, 5(2): 353-365.
 - [20] Chen T, Yang M, Cui G H, *et al.* IMP: Bridging the gap for medicinal plant genomics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(D1): D1347-D1354.
 - [21] 代红洋, 柏旭, 李晓岗, 等. 植物激素在三萜类化合物生物合成中的作用及调控机制研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(20): 6391-6402.
 - [22] Gahlaut V and Jaiswal V. *Genetics and genomics of high-altitude crops* [M]. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024.
 - [23] Eshaghi M, Rashidi-Monfared S. Co-regulatory network analysis of the main secondary metabolite (SM) biosynthesis in *Crocus sativus* L [J]. *Sci Rep*, 2024, 14: 15839.
 - [24] Khuishaid N, Shabir N, Pala AH, *et al.* Transcriptome wide analysis of MADS box genes in *Crocus sativus* and interplay of CstMADS19-CstMADS26 in orchestrating apocarotenoid biosynthesis [J]. *Gene*, 2025, 932: 148893.
 - [25] 高广春, 李军, 钱纯节, 等. 西红花柱头全长转录组测序及 bZIP 转录因子家族鉴定分析 [J]. *中草药*, 2024, 55(24): 8526-8537.
 - [26] Shoji T, Yuan L. ERF gene clusters: Working together to regulate metabolism [J]. *Trends Plant Sci*, 2021, 26(1): 23-32.
 - [27] Pan Q F, Wang C Y, Xiong Z W, *et al.* CrERF5, an AP2/ERF transcription factor, positively regulates the

- biosynthesis of bisindole alkaloids and their precursors in *Catharanthus roseus* [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 931.
- [28] Zheng H, Jing L, Jiang X H, *et al*. The ERF-VII transcription factor SmERF73 coordinately regulates tanshinone biosynthesis in response to stress elicitors in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *New Phytol*, 2021, 231(5): 1940-1955.
- [29] Jeyasri R, Muthuramalingam P, Karthick K, *et al*. Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: An updated review [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2023, 153(3): 447-458.
- [30] 彭亮, 罗瑶, 李翡, 等. 外源茉莉酸甲酯和赤霉素对茜草生长、相关酶活性及主要活性成分含量的影响研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(11): 3463-3471.
- [31] Cheng Y, Hong X Y, Zhang L, *et al*. Transcriptomic analysis provides insight into the regulation mechanism of silver ions (Ag^+) And jasmonic acid methyl ester (MeJA) on secondary metabolism in the hairy roots of *Salvia Miltiorrhiza* Bunge (Lamiaceae) [J]. *Med Plant Biol*, 2023, 2(1): 56-78.
- [32] Panda S, Jozwiak A, Sonawane P D, *et al*. Steroidal alkaloids defence metabolism and plant growth are modulated by the joint action of gibberellin and jasmonate signalling [J]. *New Phytol*, 2022, 233(3): 1220-1237.
- [33] Chen J, Yang S H, Qian X D, *et al*. The impact of phytohormones on the number and quality of flowers in *Crocus sativus* [J]. *BMC Plant Biol*, 2025, 25(1): 683.
- [34] Ziaei S M, Khashei S A, Ahmadian A, *et al*. Reduction of drought stress effects on *Saffron Crocus sativus* L.) using phytohormones [J]. *J Med Plants By*, 2025, 1: 54-62.
- [35] Zhou G F, Li L Q, Lu J M, *et al*. Flower cultivation regimes affect apocarotenoid accumulation and gene expression during the development of saffron stigma [J]. *Hortic Environ Biotechnol*, 2020, 61(3): 473-484.

[责任编辑 时圣明]