睡莲品种保罗蓝花器官不同部位的转录组测序分析

毛立彦,檀小辉,龙凌云,黄秋伟,邓有展,於艳萍,丁丽琼,韦勇杰

(广西壮族自治区亚热带作物研究所/农业农村部亚热带果品蔬菜质量安全控制重点实验室,南宁 530001)

摘要:为探究热带睡莲花器官不同部位的花香代谢通路及参与萜类香气物质生物合成的差异表达基因,本研究借助转录 组测序技术,以热带睡莲品种保罗蓝为研究对象,对其花器官的花瓣(PE,petal)、雄蕊(ST,stamen)和雌蕊(PI,pistil)3个部位 进行转录组测序分析。差异表达基因分析结果显示,花瓣相对于雌蕊(PE-vs-PI)、雄蕊相对于雌蕊(ST-vs-PI)和雄蕊相对于花 辦(ST-vs-PE)的差异表达基因数目分别为7853个、7501个和2526个。GO分类和富集分析显示,3个比较组的差异表达基因 主要参与了生物调节、细胞过程、代谢过程和刺激应答的生物学过程;KEGG分类和富集分析显示,PE-vs-PI的差异表达基因 显著富集的KEGG通路最多,其次为ST-vs-PI,ST-vs-PE最少。从3个比较组共有的794个差异表达基因中筛选出98个参与萜 类物质代谢差异表达基因,富集于4条萜类物质合成通路,且PE-vs-PI和ST-vs-PI的差异表达基因数目均高于ST-vs-PE。已知 的金合欢醛和二萜贝壳杉烯合成关键基因*HMGR和DXS*在花瓣和雄蕊的表达量均高于雌蕊。从98个差异表达基因中随机选 取了6个基因进行qRT-PCR验证,基因表达变化趋势与转录组测序一致。研究结果为热带睡莲萜类香气物质生物合成分子机 制研究提供了科学参考。

关键词:睡莲;花器官;转录组;荧光定量PCR

Sequencing Analysis of Transcriptome in Different Parts of Nymphaea 'Paul Stetson' Flower

MAO Liyan, TAN Xiaohui, LONG Lingyun, HUANG Qiuwei, DENG Youzhan, YU Yanping, DING Liqiong, WEI Yongjie

(Guangxi Subtropical Crops Research Institute/Key Laboratory of Quality and Safety Control for Subtropical Fruit and Vegetable, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanning 530001)

Abstract: To investigate the floral aroma metabolism pathways and differentially expressed genes (DEGs) involved in the biosynthesis of terpenoid aroma compounds in tropical waterlily organs, the transcriptome sequencing was used to analyze the flower organs including the petal (PE), stamen (ST) and pistil (PI) of *N*. 'Paul Stetson'. The number of differentially expressed genes in PE-vs-PI, ST-vs-PI, and ST-vs-PE were 7853, 7501, and 2526, respectively. GO classification and enrichment analysis showed that these DEGs were mainly involved in biological regulation, cellular processes, metabolic processes, and stimulus response biological processes. KEGG annotation revealed abundant pathways with significantly enriched DEGs in PE-vs-PI, followed by ST-vs-PI, and ST-vs-PE. Ninety-eight of 794 DEGs that shared in three comparative groups were enriched in four terpenoid floral aroma synthesis pathways, and DEGs in PE-vs-PI and ST-vs-PI was higher than that in ST-vs-PE. In petals and stamens, the genes responsible for synthesis of acacia aldehyde and diterpenoid kaurene, were expressed at higher levels than in pistils. Six of 98 DEGs were randomly selected and

收稿日期: 2023-08-07 修回日期: 2023-08-23 网络出版日期: 2023-09-14

URL: https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230807001

第一作者研究方向为园林花卉遗传与育种,E-mail:2634081433@qq.com

通信作者:龙凌云,研究方向为园艺植物遗传与育种,E-mail:349542116@qq.com

基金项目:广西壮族自治区自然科学基金青年基金项目(2023GXNSFBA026222);广西壮族自治区农业科学院基本科研业务专项项目(桂农科 2023YM11,桂农科 2021YT152)

Foundation projects: Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Guangxi (2023GXNSFBA026222); Basic Scientific Research Business Special Project of Guangxi Agricultural Science(Gui Nong Ke 2023YM11, Gui Nong Ke 2021YT152)

subjected for qRT-PCR analysis, confirming the trend on transcriptional expression as revealed by transcriptome sequencing. The results provided a scientific reference for future deciphering the molecular mechanism of terpenoid aroma compounds biosynthesis in tropical waterlilies.

Key words: waterlily; floral organ; transcriptome; qRT-PCR

睡莲是睡莲科(Nymphaeaceae)睡莲属(Nymphaea Linn.)多年生水生草本植物,广泛分布于温带至热 带地区,分为热带睡莲(广热带亚属、澳洲亚属、古 热带亚属和新热带亚属)和耐寒睡莲两大生态类 型,兼具观赏、食用和药用价值[1-2]。大多数热带睡 莲的花朵均可散发香气,且以广热带亚属睡莲的种 或品种香气最为浓郁。研究表明,热带睡莲花的香 气挥发物质主要为萜类、酯类、醇类、醛类和酮类等 化合物[3],其鲜花提取的精油含有多种芳香挥发物, 具有抗菌、消炎、抗氧化等多种生物活性,可应用于 食品、医药、化工等行业[4]。与其他花卉植物一样, 花香是评价睡莲种质优劣的主要品质之一,花香组 分的种类及含量是重要评价指标[5-6]。但相对于花 色、花型等易于观察的性状,睡莲花香研究主要集 中于香气挥发物的提取工艺优化[5]、香气组分分 析[3,7]、挥发油提取物的体外活性评价[8-9]等生理生 化水平研究内容,关于睡莲主要芳香化合物的生物 合成分子机理研究相对滞后。

睡莲等大多数花卉植物的花香挥发性物质主 要分为萜类化合物、苯丙酸类化合物/芳香型化合物 和脂肪酸衍生物3大类[10-11]。萜类化合物是已开展 植物花香物质生物合成机理研究较多的一类香气 物质,可分为半萜、单萜、倍半萜、二萜、三萜等[12-13], 主要途径分别为甲羟戊酸(MVA, mevalonate)途径 和甲基赤藓糖醇-4-磷酸(MEP, methylerythritol phosphate)途径^[14-15]。但各个植物类群的分子进化 历程不同,存在丰富的遗传多样性,不同植物的萜 类香气物质种类及其生物合成机理各具独特性^[16]。 全基因组测序显示,睡莲原生种蓝星鉴定出92个萜 类合酶基因,分属于TPSb、TPSc、TPSe/f和TPSg,缺 少在核心被子植物中负责倍半萜生物合成的 TPSa 类基因^[17]。苏群等^[18]借助GC-MS检测出睡莲原生 种蓝星花香中含有金合欢烯等倍半萜类挥发物,表 明睡莲属植物位于被子植物进化树基部,其香气物 质生物合成相关的某些基因可能在分子进化上有 别于核心被子植物[17]。

转录组学作为从整体水平上研究基因功能以 及基因结构,揭示基因转录调控规律以及代谢过程 分子机理的学科分析方法,已广泛应用于忍冬 (Lonicera japonica Thunb.)^[19]、木兰 (Magnolia champaca)^[20]、款冬花(Tussilago farfara L.)^[21]等植 物花香物质代谢通路的分子机理研究。选育特定 香型睡莲优良新品种已是当前睡莲育种研究的重 要方向,探明其花香主要成分及其生物合成分子机 制,发掘合成、调控相关的关键基因,有助于推动特 定香型热带睡莲新品种的分子育种研究。睡莲保 罗蓝(N. 'Paul Stetson')为广热带亚属睡莲种质的 主栽品种,具有香气浓郁、叶胎生无性繁殖等特点。 本课题组前期已报道该品种的香气提取物得率呈 现出开花第一天>开花第二天>开花第三天,且雄蕊 >花瓣>雌蕊的花香释放规律,含有42种香气成 分,包含金合欢烯、贝壳杉烯等萜类挥发物,其中金 合欢烯是特征香气成分之一[22]。故本研究以睡莲 品种保罗蓝(N. 'Paul Stetson')开花第一天的鲜花 为试验对象,采用高通量测序平台对花器官不同部 位(雌蕊、雄蕊、花瓣)进行转录组测序分析,比较研 究花器官不同部位的基因差异表达情况,通过基因 功能注释和代谢通路富集,对萜类香气物质的代谢 通路进行了初步分析,筛选出差异表达基因,研究 结果可为后期开展热带睡莲萜类花香物质合成关 键基因的深入挖掘和功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为保存于广西壮族自治区亚热作物 研究所睡莲种质资源圃的睡莲品种保罗蓝。于 2020年8月晴朗天气选取无病虫害、生长旺盛且来 源于同一母本的无性繁殖植株,采摘开花第一天的 鲜花,擦拭花上灰尘和水珠后,按花瓣(PE,petal)、 雄蕊(ST,stamen)和雌蕊(PI,pistil)进行分离,分选 后的样品经液氮速冻,研磨混匀,分装入10 mL离心 管并编号,随后转移至-80℃冰箱保存,用于后续转 录组测序及RT-qPCR验证试验。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA提取、cDNA文库构建 采用 Trizol法 分别提取睡莲品种保罗蓝鲜花的花瓣、雄蕊和雌蕊 的总 RNA,每个花器官部位样品均重复提取3次总 RNA。用 ND5000测定260 nm 和280 nm 的吸收值, OD₂₆₀/OD₂₈₀在1.8~2.0范围,1.0%的琼脂糖凝胶电泳 检测RNA的条带无杂带,无拖尾视为质量合格。质 量检测合格后,将花瓣、雄蕊和雌蕊的3份总RNA 分别均分为两份,其中一份寄送深圳华大基因科技 服务有限公司完成 cDNA 文库构建和转录组测序, 剩余样品用于后续的RT-qPCR 试验。

1.2.2 转录组测序与分析测序得到的 Raw data 使用过滤软件 SOAPnuke (v1.5.2)进行过滤,去除包 含接头的 Reads、未知碱基N含量大于10%的 Reads 和低质量的 Reads 得到 Clean data。得到的 Clean data 使用 HISAT (v2.1.0)软件比对到睡莲原生种蓝 星参考基因组序列(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ datasets/taxonomy/210225/)。

1.2.3 差异表达基因的筛选和 GO、KEGG 富集分 析 使用 RSEM (v1.3.1)软件进行基因表达定量,并 使用 pheatmap (v1.0.8)绘制基因在不同样本中的表 达量聚类热图。使用 DESeq2 (v1.4.5)进行差异表达 基因检测,条件为 Qvalue <0.05 或 FDR <0.001。使用

表1 实时荧光定量 PCR 所用基因和引物 Table 1 Genes and primers for qRT-PCR Phyper (https://en. wikipedia. org/wiki/Hypergeometric_ distribution)对差异表达基因进行 GO (http://www. geneontology.org/)及 KEGG (https://www.kegg.jp/) 富集分析,以 Qvalue<0.05 为阈值,满足此条件的定 义为在候选基因中显著富集。

1.2.4 萜类化合物生物合成关键基因的 RT-qPCR 验证 根据睡莲品种保罗蓝花朵不同花器官样品的转录组数据筛选出6个与萜类合成相关差异表达 基因,并以筛选的差异表达基因为模板设计实时定 量 PCR 引物(表1),引物由上海生工公司合成。以 *NcACT11* 为内参基因^[23],利用 Roche LightCycler® 480RT-qPCR,采用 Genious 2×SYBR Green Fast qPCR Mix 进行差异表达基因的 qPCR 表达分析。 反应体系为:SYBR Premix Ex Taq(2×)10 uL,上下 游引物(10 µmol/L)各1 µL,cDNA模板1 µL,ddH₂O 定容至 20 µL。反应程序为:95 ℃ 5 min,循环1次; 95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,循环40次,72 ℃ 10 min。用 2^{-△ΔCT}法进行计算相对表达量。

				产物大小	退火
引物名称	基因ID	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')	(bp)	温度
Primer name	Gene ID	Forward primer sequence(5'-3')	Reverse primer sequence(5'-3')	Product	(\mathcal{C})
				size	T_m
ACT11	AB544303.1	ATGTGGCACTGGACTATGAGC	AGAGTTGTAAGTGGTTTCGTGAAT	191	59.0
CYP17A1	BGI_novel_G000320	AACAAGCACTTCCAACAAATCAC	TCAACGCAAAGCCAAACCT	200	58.5
G8H	NC10G0143950	GTGGCAGTTGAACACGGTGAC	TTCGAACTCGGCAGCATG	198	60.0
MAS	NC1G0110150	GCCTGCTTTAGAGGGCTTTT	CTTCAGGGCAACCTCCACTAT	91	59.0
NES1	NC1G0260440	GCTGCCTGCTGCTTTGGTT	AGGCACTCCCTGTTCATCTTC	285	60.0
DHRS2B	NC2G0007870	TCAGCTCCCAGACCAGTACACC	CCCAATCTACGTCAGCGGTTT	367	60.0
KO	NC6G0253360	TCTCAGTGCCCTGCTAAACG	TCTCACCGCCGCAGACTTT	191	60.5

2 结果与分析

2.1 转录组测序质量分析和组装

使用 DNBSEQ 平台对睡莲品种保罗蓝鲜花的 花瓣、雌蕊和雄蕊进行转录组测序。测序结果显 示,3个花器官样品测序分别生成42764468、 42766642和42470072个高质量 Reads,每个样本的 Q20碱基百分比(测序错误率小于1%)均大于95%, Q30碱基百分比均大于90%,GC碱基含量介于 48.42%~50.31%之间(表2),说明样品测序质量较 好,碱基组成平衡,获得的测序数据可用于后续的 生物信息学分析。 与睡莲原生种蓝星基因组参考比对,获得用于 后续转录本组装、表达量计算的 Mapped data (Reads),共检测到表达基因(Unigenes)的数目为 20051个,其中已知的基因为19729个,预测的新基 因为322个;共检测出11620个新转录本,其中 10308个属于已知蛋白编码基因的新的可变剪接亚 型,333个属于新的蛋白编码基因的转录本,剩下的 979个属于长链非编码RNA。已知基因的长度分布 如图1所示,1000 bp以下的基因数占比20.77%, 1000~2000 bp的基因数占比39.72%,2000~3000 bp 的基因数占比23.23%,3000 bp以上的基因数占比 16.28%。

表2 睡莲转录组数据统计和质量评估

Table 2 Transcriptome data statistics and quality assessment of N. 'Paul Stetson'

样品 Sample	原始数据中的 reads数 Raw_reads	原始数据过滤后的 reads数 Clean_reads	原始数据过滤后的 碱基数(Gb) Clean_reads	数据整体测序 错误率(%) Error_rate	Q20(%)	Q30(%)	GC 含量(%) GC content
花瓣Petal	45573892	42764468	6.41	0.80	95.67	90.09	49.97
雌蕊Pistil	45573892	42766642	6.41	0.74	96.12	91.0	48.42
雄蕊 Stamen	45573892	42470072	6.37	0.77	95.86	90.46	50.31





2.2 转录因子鉴定

将获得的测序结果在植物转录因子数据库 (PlantTFDB)中进行注释,共注释到的转录因子 (TF,transcription factor)为1238个,归类划分为59 类基因家族,其中MYB家族转录因子占12.44%, AP2-EREBP家族转录因子占比8.80%,bHLH家族转录因子占7.27%,MADS家族转录因子占5.82%,WRKY家族转录因子占5.74%,NAC家族转录因子占5.17%,说明这6类转录因子在睡莲雄蕊、雌蕊、花瓣表达中占主导地位,占比排名前20的转录因子见表3。

表3	睡莲雄蕊.	、雌蕊、	花瓣的轴	专录因	子鉴定

Table 3Identification of transcript	factors in stamen,	pistil and p	oetal of waterlil	y
-------------------------------------	--------------------	--------------	-------------------	---

序号	基因家族	数量	序号	基因家族	数量	序号	基因家族	数量
No.	Gene family	Number	No.	Gene family	Number	No.	Gene family	Number
1	MYB	154	8	C2H2	45	15	C2C2-Dof	26
2	AP2-EREBP	109	9	G2-like	44	16	bZIP	21
3	bHLH	90	10	ABI3VP1	42	17	mTERF	21
4	MADS	72	11	Trihelix	34	18	FHA	20
5	WRKY	71	12	LOB	30	19	HSF	20
6	NAC	64	13	GRAS	28	20	C2C2-GATA	20
7	СЗН	47	14	FAR1	26			

2.3 差异表达基因分析

2.3.1 样品间差异表达基因相关性分析相关性 热图(图2)显示睡莲花瓣和雄蕊的相关性较高,雌 蕊和花瓣的相关性最低,表明雄蕊与花瓣之间的基 因表达存在正相关性。



2.3.2 样品间差异表达基因分析 用DESeq法对 睡莲花瓣、雄蕊和雌蕊3个样品进行两两比较,差异 表达基因筛选条件设置为Qvalue<0.05或FDR< 0.001。在花瓣相对于雌蕊(PE-vs-PI)组中共检测到 7853个差异表达基因,其中上调6555个,下调1298 个;雄蕊相对于花瓣(ST-vs-PE)组检测到2526个,上 调1046个,下调1480个;雄蕊相对于雌蕊(ST-vs-PI) 组中为7501个,上调6113个,下调1388个(图3A)。 PE-vs-PI组和ST-vs-PE组,且PE-vs-PI组和STvs-PI组的上调基因数目均多于下调基因数目,而 ST-vs-PE组的上调基因数目略低于下调基因。推 测花器官雄蕊和花瓣的基因表达模式相近。

韦恩图分析结果显示(图3B),PE-vs-PI、ST-vs-PE和ST-vs-PI各组筛选的差异表达基因种类总计9780个,其中PE-vs-PI差异表达基因占80.30%,ST-vs-PE差异表达基因占25.83%,ST-vs-PI差异表达基因占76.70%,结合样品相关性系数和差异表达基因数量,进一步说明雄蕊和花瓣的基因表达模式相似度较高。



A:PE-vs-PI、ST-vs-PE和ST-vs-PI差异表达基因数量;PE-vs-PI:花瓣相对于雌蕊;ST-vs-PE:雄蕊相对于花瓣;ST-vs-PI:雄蕊相对于雌蕊;下同; B:PE-vs-PI、ST-vs-PE和ST-vs-PE和ST-vs-PE差异表达基因维恩图;图中数字代表差异基因数量

A:Number of DEGs from PE-vs-PI, ST-vs-PE and ST-vs-PI; PE-vs-PI: Petal vs pistil; ST-vs-PE: Stamen vs petal; ST-vs-PI: Stamen vs pistil; The same as below; B:Venn diagram of DEGs from PE-vs-PI, ST-vs-PE and ST-vs-PI; The numbers in the figure represent the number of DEGs 图 3 睡莲 PE-vs-PI、ST-vs-PE 和 ST-vs-PI 差异表达基因数量及维恩图

Fig.3 Number and Venn diagram of DEGs from PE-vs-PI, ST-vs-PE and ST-vs-PI in waterlily

2.4 GO注释和富集分析

对3个比较组(PE-vs-PI、ST-vs-PE和ST-vs-PI)的差异表达基因进行GO功能注释(图4),结果显示 3个比较组的可注释差异表达基因对均分为3个大 类37个亚类:生物学过程(20个亚类)、分子功能(14 个亚类)和细胞组成(3个亚类),且3个比较组的差 异表达基因在生物学过程的生物调节(Biological regulation)、细胞过程(Cellular process)、代谢过程 (Metabolic process)和刺激应答(Response to stimulus),分子功能过程的结合(Binding)、催化活性 (Catalytic activity)和转运活性(Transporter activity),细胞组成的细胞(Cellular anatomical



A、C、E分别为PE-vs-PI、ST-vs-PE、ST-vs-PI的差异表达基因GO注释分类图; B、D、F分别为PE-vs-PI、ST-vs-PE、 ST-vs-PI的差异表达基因GO富集气泡图; CC:细胞组成; MF:分子功能; BP:生物过程

A, C, E were the GO annotation classification maps of DEGs for PE-vs-PI, ST-vs-PE, and ST-vs-PI; B, D, F were the GO enrichment bubble maps of DEGs for PE-vs-PI, ST-vs-PE, and ST-vs-PI; CC: Cellular component; MF: Molecular function; BP: Biological regulation
 图4 睡莲 PE-vs-PI、ST-vs-PE和ST-vs-PI差异表达基因GO注释分类及富集气泡图

Fig. 4 GO classification and enrichment analysis of DEGs from PE-vs-PI, ST-vs-PE and ST-vs-PI in waterlily

entity)、胞内(Intracellular)和含蛋白复合物(Proteincontaining complex)等功能中注释基因相对较多。 PE-vs-PI的差异表达基因可被注释的基因数目为 GO富集分析发现,PE-vs-PI中4920个差异表 达基因被富集到4531条GO条目上,Qvalue值排名 前20的GO条目气泡图如图4B所示,差异表达基 因显著富集于101条GO条目上,前两条为细胞功 17155 个, ST-vs-PE 的为 4740 个, ST-vs-PI 的为 16336个,说明雄蕊和花瓣中的代谢物质变化相似, 且均与雌蕊存在较大差异。

能的核糖体结构成分(Structural constituent of ribosome, GO: 0003735)和细胞组成的非膜结合细胞器(Non-membrane-bounded organelle, GO: 0043228);ST-vs-PE中1478条差异表达基因被富集

到 2610条 GO 条目上, Qvalue 值排名前 20 的 GO 条 目气泡图如图 4D 所示, 差异表达基因显著富集于 118条 GO 条目上, 前两条为生物学过程的碳水化合 物代谢过程 (Carbohydrate metabolic process, GO: 0005975)和细胞功能的催化活性(Catalytic activity, GO:0003824); ST-vs-PI中4644条差异表达基因被 富集到4460条 GO 条目上, Qvalue 值排名前 20 的 GO 条目气泡图如图 4F 所示, 差异表达基因显著富 集于 101条 GO 条目上, 前两条分别为细胞组成的 非膜结合细胞器 (GO:0043228)和细胞内非膜结 合 细 胞 器 (Intracellular non-membrane-bounded organelle, GO:0043232)。

2.5 KEGG途径分类和富集分析

2.5.1 KEGG 途径分类 对 PE-vs-PI、ST-vs-PE 和 ST-vs-PI筛选的差异表达基因进行 KEGG 通路注 释,均可将3组的差异表达基因划分到5个大类19 个通路(图5A):生物体系统(1个通路)、代谢(11 个通路)、遗传信息处理过程(4个通路)、环境信息 处理过程(2个通路)和细胞过程(1个通路),均在 代谢的全局和概览图(Global and overview maps) 和碳水化合物代谢通路(Carbohydrate metabolism) 中注释到的基因相对较多,能被注释通路的差异表 达基因分别为5773个、2174个和5311个。每个代 谢通路类别的PE-vs-PI和ST-vs-PI可被注释的基因 数目相近,均高于ST-vs-PE,进一步表明花瓣和雄 蕊中代谢物质变化相似,与雌蕊存在较大差异。进 一步分析发现,3个比较组差异表达基因注释到萜 类和聚酮类化合物代谢(Metabolism of terpenoids and polyketides)的通路类别的数目分别为:PE-vs-PI有94个(上调62个,下调32个),ST-vs-PE有57 个(上调24个,下调33个),ST-vs-PI有111个(上调 78个,下调33个),表明花瓣和雄蕊中萜类代谢物 的物质变化高于雌蕊。

2.5.2 KEGG富集分析 PE-vs-PI、ST-vs-PE、ST-vs-PI 经 KEGG 富集分析后,差异表达基因按照 Qvalue 富集的前 20条 KEGG 途径分别如图 5B~D 所示。PE-vs-PI 的差异表达基因显著富集在9个代 谢通路,即翻译(Translation)的核糖体(Ribosome, KO03010)、真核生物核糖体合成(Ribosome biogenesis in eukaryotes, KO03008),脂质代谢 (Lipid metabolism)的亚油酸代谢(Linoleic acid metabolism, KO00591),信号转导(Signal transduction)的植物激素信号转导(Plant hormone

signal transduction, KO04075), 能量代谢(Energy metabolism)的天线蛋白(Photosynthesis - antenna proteins, KO00196), 复制和修复(Replication and repair)的DNA 复制(DNA replication, KO03030)、非 同源性末端接合(Non-homologous end-joining, KO03450)、碱基切除修复(Base excision repair, KO03410)和氨基酸代谢(Amino acid metabolism) 的精氨酸合成(Arginine biosynthesis, KO00220);其 中翻译的核糖体差异表达基因富集最多,为234个, 其次为翻译的真核生物核糖体合成,为225个。STvs-PE的差异表达基因显著富集于3个代谢通路,分 别为信号转导的植物激素信号转导,能量代谢的天 线蛋白和碳水化合物代谢的淀粉和蔗糖代谢 (Starch and sucrose metabolism, KO00500),其中信 号转导的植物激素信号转导途径差异代谢基因富 集最多,为101个,其次为碳水化合物代谢的淀粉 和蔗糖代谢,为73个。ST-vs-PI的差异表达基因显 著富集于4个代谢通路,分别为翻译的核糖体、真核 生物核糖体合成,多糖合成和代谢(Glycan biosynthesis and metabolism)的其他类型的O聚糖 生物合成 (Other types of O-glycan biosynthesis, KO00514)和脂质代谢的亚油酸代谢,其中差异表 达基因富集最多的是翻译代谢的核糖体途径,为 219个,其次为信号转导的植物激素信号转导途 径,为194个(差异不显著)。3个组两两比较中, PE-vs-PI显著富集的KEGG通路最多,其次为STvs-PI, ST-vs-PE 最少, 两两比较后共同富集的通路 是信号转导的植物激素信号转导,该通路在ST-vs-PE的差异表达基因富集中不显著。

2.6 萜类合成相关基因表达分析

萜类化合物是睡莲花香气物质的重要组分之一,在花瓣、雄蕊和雌蕊中均有表达,为揭示睡莲花 不同部位萜类合成积累的调控机制,对萜类代谢相 关基因的表达谱进行了分析。由图3可知,睡莲花 器官3个部位共同表达的基因有794个。基于功能 注释和KEGG富集分析,重点关注了与萜类代谢途 径相关的98个基因。依据98个基因的FPKM值绘 制了表达聚类热图(图6)。从图6可知,共有90个 基因在3个样品中均有表达。以花瓣为参照共有67 个基因在雌蕊中上调,31个基因下调;70个基因在 雄蕊中上调,28个基因下调,推测这些差异表达基 因的表达可能参与了睡莲萜类香气物质代谢,与睡 莲香气物质形成密切相关。



A为PE-vs-PI、ST-vs-PE、ST-vs-PI的差异表达基因KEGG途径分类图; B、C、D分别为PE-vs-PI、ST-vs-PE、ST-vs-PI的差异表达基因KEGG途径 富集气泡图; OS:生物系统; MB:代谢; GIP:遗传信息处理过程; EIP:环境信息处理过程; CP:细胞过程

A was the KEGG pathway annotation classification maps of DEGs for PE-vs-PI, ST-vs-PE, and ST-vs-PI; B, C, D were the the KEGG pathway enrichment bubble maps of DEGs for PE-vs-PI, ST-vs-PE, and ST-vs-PI; OS: Organismal systems; MB: Metabolism; GIP: Genetic information processing; EIP: Environmental information processing; CP: Cellular processes

图5 睡莲 PE-vs-PI、ST-vs-PE 和 ST-vs-PI 差异表达基因 KEGG 分类及富集气泡图

Fig. 5 KEGG pathway classification and enrichment analysis of DEGs from PE-vs-PI_ST-vs-PE and ST-vs-PI in waterlily

进一步分析发现PE-vs-PI组中富集到萜类骨架 生物合成(ko00900)的基因有21个(18个上调,3个 下调),二萜生物合成途径(ko00904)的基因有24个 (21个上调,3个下调),单萜生物合成(ko00902)基 因7个(3个上调,4个下调),倍半萜和三萜生物合成(ko00909)基因5个(2个上调,3个下调);ST-vs-PE组中富集到萜类骨架生物合成(ko00900)的基因有7个(均下调),二萜生物合成途径(ko00904)的基



图 6 睡莲萜类代谢相关基因在花瓣、雌蕊和雄蕊中的表达情况 Fig. 6 Expression of terpenoid metabolism related genes in PE, PI, and ST of waterlily

因有13个(4个上调,9个下调),单萜生物合成 (ko00902)基因3个(均下调),倍半萜和三萜生物合 成(ko00909)基因2个(均上调);ST-vs-PI组中富集 到萜类骨架生物合成(ko00900)的基因有22个(14 个上调,8个下调),二萜生物合成途径(ko00904)的 基因有16个(12个上调,4个下调),单萜生物合成 (ko00902)基因8个(4个上调,4个下调),倍半萜和 三萜生物合成(ko00909)基因4个(2个上调,2个下 调),详见表4。

4 期

		biosynthe	esis in wate	rlily tran	scriptom	e	
Table	4	Analysis	of KEGG	pathway	related	to	terpenoid
表4	睡到	莲转 录组 ·	中与萜类生	物合成相	关 KEG	Gi	围路分析

	牛油活政	基因数量 Gene number			
通路ID	1、闭理时 Metabolic pathway	PE-vs- PI	ST-vs- PE	ST-vs- PI	
ko00900	萜类骨架生物合成	21	7	22	
ko00902	单萜类生物合成	7	3	8	
ko00904	二萜生物合成	24	13	16	
ko00909	倍半萜和三萜生物合成	5	2	4	

经KEGG通路图分析发现了MVA途径的调控 2个挥发性倍半萜成分代谢的7个酶的9个基因,其 中包括1个ACCT、2个HMGS、1个HMGR、1个 PMK、1个MVD、1个AaSDR-1,2个NS。MEP途径 的调控2个单萜和1个二萜挥发性成分的10个酶的 20个基因,其中1个DXS、1个MCT、1个HDS、1个 HDR、4个GPPS,7个NDH,3个CS、TS,1个CPS和1 个KS(图7)。

2.7 RT-qPCR 验证及关键候选基因挖掘

以睡莲Actin11为内参基因,在98个差异表达 基因中选取6个基因进行验证(图8),RT-qPCR熔解 曲线均为单一峰型、扩增曲线为"S"型曲线,说明6 个候选基因的引物特异性较好、扩增效率较好,满 足 RT-qPCR 的实验分析要求。6个基因在睡莲花 朵的不同部位差异表达与转录组分析数据表达趋 势相同,证明了本次测序可信度较高,为后续开展 睡莲萜类代谢基因深入挖掘提供详实的信息。

3 讨论

随着高通量测序技术和生物信息学分析方法 的迅猛发展,借助转录组测序等组学手段解析植物 次生代谢物生物合成分子机理已成为常态化研究 方法^[24]。花香是评价睡莲品质的重要特征,睡莲花 香的组成和活性已有较多的研究报道^[56],但其花香 组分的生物合成与调控机制尚未被揭示。本研究 通过对睡莲品种保罗蓝花器官不同部位进行转录 组测序,共获得20051个单基因,这些信息为挖掘睡 莲花香生物合成和调控的关键基因和功能提供了 重要信息资源。

花朵是大多数植物释放香气化合物的主要部 位,花朵的各器官组织对香气物质释放的贡献不是 等同的,存在空间差异性。研究表明,大多数植物 的花香来自于花瓣,其他部位如雄蕊、雌蕊、花萼和 蜜腺等也能散发出少量的香味^[25]。袁茹玉^[26]在对 56个睡莲品种的花香组分分析研究中指出,睡莲雄 蕊和花瓣是释放香气的主要花器官,其中雄蕊释放 的香气占整朵花的70%~90%。课题组前期发表



图7 睡莲挥发性萜类代谢通路相关基因表达情况

Fig. 7 Expression of genes related to volatile terpenoids metabolism pathway in waterlily



图8 睡莲PE、PI、ST中6个基因的RT-qPCR和转录分析表达情况对比

Fig. 8 Expression comparison of RT-qPCR and transcriptional analysis of six genes in PE, PI, and ST from waterlily

的睡莲品种保罗蓝花香提取物的GS-MS检测分析 结果亦显示,雄蕊和花瓣是该品种香气释放的主要 花器官部位^[22]。本研究中,睡莲品种保罗蓝花器官 不同部位的差异表达基因分析结果显示,PE-vs-PI 组和ST-vs-PI组差异表达基因数目明显高于ST-vs-PE,表明雄蕊和花瓣的基因表达模式与和雌蕊有着 明显差异,推测3种花器官基因表达模式的差异可 能是导致其香气物质释放含量存在明显差异的重 要因素。

萜类挥发性香气物质是构成植物花香的主要 组分之一,在多种酶促反应和关键基因表达,以及 外源诱导因子、转录因子等调控的共同作用下,植 物通过MVA和MEP途径形成萜类等挥发性香气物 质^[27],其中HMGR和DXS分别在MVA和MEP途径 中发挥重要作用,可作为调控萜类生物合成的关键 酶基因[28]。本研究在倍半萜类生物合成途径中鉴 定出1个HMGR基因(NC6G0115390),该基因在花 瓣和雄蕊中的表达量高于雌蕊;在单萜和二萜类生 物合成途径中,鉴定出1个DXS基因(NC5G0161860), 该基因在花瓣和雄蕊中的表达量亦高于雌蕊。前 人研究发现,植物花香物质生物合成基因的表达量 通常与花香物质生成的主要部位存在一致性[29-30]。 睡莲品种保罗蓝花瓣和雄蕊中萜类香气物质的产 量高于雌蕊,可能与HMGR和DXS等香气合成相关 的关键酶基因表达量存在正相关性。前期已报道 在睡莲品种保罗蓝中金合欢烯是其主要花香成分 之一,相对含量为8.601%[22]。但本研究中,转录组 测序分析结果显示不存在参与金合欢烯合成相关 的差异表达基因,而参与橙花叔醇合成的NC1G026 0440在花器官3个不同部位中的表达差异明显。 有研究表明,橙花叔醇可在各种酸性催化剂作用 下经脱水获得金合欢烯[31],推测睡莲品种保罗蓝 花香释放过程中,金合欢烯可能由橙花叔醇在细 胞中发生了法尼基修饰形成的。此外,前期在睡 莲品种保罗蓝中检测出贝壳杉稀香气成分^[22],该 成分合成相关基因 KS (NC5G0262590)和 CPS (NC6G0155080) 基因在雌蕊的表达量高于花瓣 和雄蕊,这与周琦等^[32]检测的睡莲品种N. hybrid 花器官不同部位中贝壳杉稀含量变化的规律 相似。

MVA和MEP途径的多种酶促反应和关键基因表达受到外源诱导因子、转录因子等共同调控^[33]。现有研究发现在植物中参与萜类生物合成调控的转录因子主要为MYB、bHLH、AP2-EREBP、

NAC、WRKY和bZIP^[34]。植物萜类物质代谢过程 中,转录因子通过与启动子的结合影响关键基因 的转录水平,从而实现调控萜类化合物的含量变 化。如Hong等^[35]在拟南芥(Arabidopsis thaliana) 中发现,bHLH转录因子可通过赤霉素和茉莉酸信 号通路激活2个倍半萜合酶基因 TPS11 和 TPS12 的表达。Yu等[36]的研究表明,转录因子AP2-EREBP家族成员的 AaERF1 和 AaERF2 能够结合 倍半萜合成酶 Amorpha-4,11 - 二烯合成酶(ADS) 和 P450 单加氧酶 CYP71AV1 启动子中存在的 CRTDREHVCBF2(CBF2)和RAV1AAT(RAA)基 序,过表达两种转录因子可显著提高青蒿 (Artemisia caruifolia)中的倍半萜等萜类物质含量。 Yang 等^[37]基于香雪兰(Freesia hybrida)转录组测 序、原生质体瞬时转染和EMSA实验,证明转录因 子FhMYB21L1和FhMYB21L2可正向调控参与芳 樟醇合成的关键酶基因 FhTPSI 的表达,进一步研 究发现转录因子FhMYC2能够与FhMYB21Ls互作 形成复合物,从而抑制FhMYB21Ls与FhTPS1启动 子的结合,起到负向调控作用。本研究在睡莲花器 官的3个不同部位鉴定出了具有不同表达模式的转 录因子共有984个,其中数量排名前三的分别为154 个MYB、109个AP2-EREBP和90个bHLH,它们在 睡莲花器官不同部位表现出显著差异表达,这些转 录因子参与调控萜类挥发性香气的生物合成过程 的具体功能仍需要进一步验证。

4 结论

本研究对保罗兰睡莲的花瓣、雄蕊和雌蕊进行 转录组比较分析,共获得20051个Unigenes,其中已 知基因19729个,预测新基因322个。经差异表达 和GO、KEGG富集分析,筛选出3个比较组共有的 差异表达基因 794个,并进一步筛选出 98个可能 参与睡莲花器官中萜类物质合成与积累的差异表 达基因,这些差异表达基因主要富集于萜类骨架 合成、单萜合成、二萜合成和倍半萜与三萜合成这 4条萜类物质代谢通路,筛选到了在MVA和MEP 途径中发挥重要作用的HMGR和DXS候选基因各 1个,并发现了2个二萜类挥发性成分贝壳杉烯的 合成候选基因。此外,研究还发现 MYB、AP2-EREBP、bHLH、MADS、WRKY和NAC这6类转录 因子在睡莲雄蕊、雌蕊、花瓣表达中占主导地位。 本研究通过转录组测序初步了解保罗兰睡莲花器 官不同部位的基因表达情况,挖掘的差异表达基 因以及相关功能注释和富集分析结果,可为探讨 睡莲花的萜类物质代谢的分子调控机制提供理论 基础。

参考文献:

- [1] Nazarni R, Nadra K, Rufida R, Sri H, Anton M. Effect of fermentation on total phenolic, radical scavenging and antibacterial activity of waterlily (*Nymphaea pubescens* Willd.). Biopropal Industri, 2020, 11(1): 9-18
- [2] Dias O, Tungare K, Palamthodi S, Bhori M. Nymphaea nouchali Burm. f. flowers as a potential food additiveand revitalizer: A biochemico - toxicological insight. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(5): e15405
- [3] Tsai F J, Liu H J, Lee M Y, Lin C C. Determination of volatile components from live water lily flowers by an orthogonal-array-design-assisted trapping cell. Applied Sciences, 2019, 9(7): 1269
- [4] Pottier M, Albuquerque B N D L, Patrícia Cristina B S, Suyana Karolyne L R, Artur Campos D M, Fernando H, Armando N V, Daniela Maria A F N. Dolabella-3, 7, 18triene, the main constituent of the essential oil of the white lotus flower (*Nymphaea lotus*, Nymphaeaceae). Flavour and Fragrance Journal, 2016, 31(5): 356-360
- [5] Jirapong C, Inplub K, Wongs-Aree C. Volatile compounds in four species of Thai waterlily (*Nymphaea spp.*). Acta Horticulturae, 2012, 943(12): 117-122
- [6] Kamble M Y, Poulose V C, Singh L J. The genus Nymphaea
 L. (Family Nymphaeaceae) in Andaman and Nicobar Islands, India. Journal of the Bombay Natural History Society, 2019, 116: 35
- [7] 石凝,刘晓静,杜凤凤,常雅军,李乃伟,姚东瑞.热带睡莲 鲜花中挥发油成分的GC-MS分析.植物资源与环境学报, 2017,26(4):104-106
 Shi N, Liu X J, Du F F, Chang Y J, Li N W, Yao D R. GC-

MS analysis on components of essential oil fromfresh flowers of tropicalwater lily. Journal of Plant Resources and Environment, 2017, 26(4): 104-106

[8] 范杨杨,王健,余文刚,吉浩,鹿文举,柏宝冰,赵莹,宋希强.同时蒸馏萃取制备延药睡莲精油及其抗氧化研究.食品研究与开发,2018,39(12):19-23 Fan Y Y, Wang J, Yu W G, Ji H, Lu W J, Bai B B, Zhao Y,

Song X Q. Preparation of essential oil from *Nymphaea stellata* by the method of simultaneous distillation extraction and its antioxidative activities. Food Research and Development, 2018, 39(12): 19-23

[9] 陈彦甫,范杨杨,周卫娟,李子馨,李兆基,王健,赵莹,罗 海希.热带红睡莲精油主要成分及其抑菌活性分析.食品研 究与开发,2022,43(1):32-38 Chen Y F, Fan Y Y, Zhou W J, Li Z X, Li Z J, Wang J, Zhao Y, Luo H X. Extraction of essential oil from tropical

water lily and its antibacterial activities. Food Research and

Development, 2022, 43(1): 32-38

- [10] Muhlemann J K, Klempien A, Dudareva N. Floral volatiles: From biosynthesis to function. Plant Cell Environment, 2014, 37(8): 1936-1949
- [11] Dudareva N, Klempien A, Muhlemann J K, Kaplan I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. New Phytologist, 2013, 198(1): 16-32
- [12] Ding W J, Ouyang Q X, Li Y L, Shi T T, Li L, Yang X L, Ji K S, Wang L G, Yue Y Z. Genome-wide investigation of WRKY transcription factors in sweet osmanthus and their potential regulation of aroma synthesis. Tree Physiology, 2020, 40(4): 557-572
- [13] Gutensohn M, Nagegowda D A, Dudareva N. Involvement of compartmentalization in monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in plants. New York: Springer (New York), 2013: 155-169
- [14] Eva V, Diana C, Wilhelm G. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64(1): 665-700
- [15] Schwieterman M L, Johnson T S, Colquhoun T A. Lilium floral fragrance: A biochemical and genetic resource for aroma and flavor. Ashs Conference, 2015, 122: 103-112
- [16] 袁媛,孙叶,李风童,包建忠,刘春贵,马辉,张甜,陈秀
 兰.植物花香代谢和基因工程研究进展.南方园艺,2017,28
 (5):54-58

Yuan Y, Sun Y, Li F T, Bao J Z, Liu C G, Ma H, Zhang T, Chen X L. Research advances in mechanism and genetic engineering of floral scent. Southern Horticulture, 2017, 28 (5): 54-58

Zhang L S, Chen F, Zhang X T, Li Z, Zhao Y Y, Rolf L, Chang X J, Dong W, Simon Y W H, Liu X, Aixia S, Junhao C, Guo W L, Wang Z J, Zhuang Y Y, Wang H F, Chen X Q, Hu J, Liu Y H, Qin Y, Wang K, Dong S S, Liu Y, Zhang S Z, Yu X X, Wu Q, Wang L S, Yan X Q, Jiao Y N, Kong H Z, Zhou X F, Yu C W, Chen Y C, Li F, Wang J H, Chen W, Xinlu C, Jia Q D, Zhang C, Jiang Y F, Zhang W B, Liu G H, Fu J Y, Chen F, Ma H, Yves V P, Tang H B. The water lily genome and the early evolution of flowering plants. Nature, 2020, 577(7788): 79-84

[18] 苏群,田敏,王虹妍,王凌云,刘俊,赵培飞,卜朝阳.睡莲 属 62 个栽培种花朵挥发性成分 GC-MS 分析.热带亚热带植 物学报,2022,30(4):567-574
Su Q, Tian M, Wang HY, Wang LY, Liu J, Zhao PF, Bu C Y. Volatile components in flowers of 62 Nymphaea cultivars by GC-MS. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2022, 30 (4): 567-574

[19] Xia Y, Chen W W, Xiang W B, Wang D, Xue B G, Liu X Y, Xing L H, Wu D, Wang S M, Guo Q G, Liang G L. Integrated metabolic profiling and transcriptome analysis of pigment accumulation in *Lonicera japonica* flower petal during colour-transition. BMC Plant Biology, 2021, 21: 98

- [20] Savitha D, Jingjing J, Vishweshwaran S, Rajani S, Nam H C, In C J. Integrated metabolome and transcriptome analysis of *Magnolia champaca* identifies biosynthetic pathways for floral volatile organic compounds. BMC Genomics, 2017, 18 (1): 463
- [21] 贾岩,张福生,肖淑贤,关扎根,雷振宏,秦雪梅,李震宇. 款冬花不同发育阶段的代谢组学和比较转录组学分析.中国 生物化学与分子生物学报,2017,33(6):615-623
 Jia Y, Zhang F S, Xiao S X, Guan Z G, Lei Z H, Qin X M, Li Z Y. Component analyses of *Tussilago farfara* in different development stages by metabonomic and comparative transcriptomic approaches. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 33(6): 615-623
- [22] 黄秋伟,毛立彦,龙凌云,唐毓玮.热带睡莲精油的超临界CO₂萃取优化及其成分GC-MS分析.食品研究与开发,2020,41(7):188-195

Huang Q W, Mao L Y, Long L Y, Tang Y W. Optimization of essential oil from tropical water lily extracted by supercritical CO_2 and volatile components of essential oil analysis by GC-MS. Food Research and Development, 2020, 41(7): 188-195

- [23] 罗火林.睡莲花器官发育相关基因克隆、表达和功能分析.南京:南京农业大学,2011
 Luo H L. Isolation, expression and function analysis of floral organ identify genes in water lily. Nangjing: Nanjing Agricultural University, 2011
- [24] Wu Q, Wu J, Li S S, Zhang H J, Feng Y F, Yin D D, Wu R Y, Wang L S. Transcriptome sequencing and metabolite analysis for revealing the blue flower formation in waterlily. BMC Genomics, 2016, 17(1): 897
- [25] Farré A G, Iolanda F, Joan L, Josep P. Floral volatile organic compounds: Between attraction and deterrence of visitors under global change. Perspectives in Plant Ecology Evolution & Systematics, 2013, 15(1)15 :56-67
- [26] 袁茹玉.不同品种睡莲花挥发物组成及其茶汤功能成分和抗氧化活性评价.南京:南京农业大学,2014
 Yuan R R. Studies on the composition of vulatiles in different cultivars of water lily and functional component and antioxidant activity evaluation in its tea. Nangjing: Nanjing Agricultural University, 2014
- [27] Elizabeth C, Mari S, Patricia L. Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(10): 2933-2943
- [28] Qin L L, Du F, Yang N N, Zhang C, Wang Z W, Zheng X W, Tang J W, Yang L B, Dong C. Transcriptome analyses revealed the key metabolic genes and transcription factors involved in terpenoid biosynthesis in Sacred Lotus. Molecules, 2022, 27(14): 4599

- [29] Véronique B, Jean-Claude C, Frédéric J, Jean-Louis M, Gabriel S J. Mark C, Philippe H, Sylvie B. Both the adaxial and abaxial epidermal layers of the rose petal emit volatile scent compounds. Planta, 2007, 226(4): 853-866
- [30] Dinesh A N, Michael G, Curtis G W, Natalia D. Two nearly identical terpene synthases catalyze the formation of nerolidol and linalool in snapdragon flowers. The Plant Journal , 2008, 55(2): 224-239
- 【31】张钟宪,肖阿林,张国玺.(E)-β-法尼烯的合成.首都师范大 学学报:自然科学版,1998(2):43-46
 Zhang Z X, Xiao A L, Zhang G X. Synthesis of (E) - β
 -farnesene. Journal of Capital Normal University : Natural Science Edition, 1998 (2):43-46
- [32] 周琦, 赵峰, 张慧会, 汤鹏, 祝遵凌. 香水莲花花香测试条件 优化及不同部位挥发性物质成分研究. 分子植物育种, 2023, URL: http://kns. cnki. net/kcms/detail/46.1068. S. 20220421.1642.025.html
 Zhou Q, Zhao F, Zhang H H, Tang P, Zhu Z L. Optimization of test conditions and the study on volatile components in different parts of *Nymphaea hybrid*. Molecular Plant Breeding, 2023, URL: http://kns. cnki. net/kcms/detail/46.1068. S. 20220421.1642.025.html
- [33] Hichri I, Barrieu F, Bogs J, Kappel C, Delrot S, Lauvergeat V. Recent advances in the transcriptional regulation of the favonoid biosynthetic pathway. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(18): 2465-2483
- [34] 董燕梅,张文颖,凌正一,李靖锐,白红彤,李慧,石雷.转录因子调控植物萜类化合物生物合成研究进展.植物学报,2020,55(3):340-350
 Dong Y M, Zhang W Y, Ling Z Y, Li J R, Bai H T, Li H, Shi L. Advances in transcription factors regulating plant terpenoids biosynthesis. Chinese Bulletin of Botany, 2020, 55 (3): 340-350
- [35] Hong G J, Xue Y X, Mao B Y, Wang L J, Chen X Y. Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. The Plant Cell, 2012, 24(6): 2635-2648
- [36] Yu Z X, Li J X, Yang C Q, Hu W L, Wang L J, Chen X Y. The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Molecular Plant, 2012, 5 (2): 353-365
- [37] Yang Z Z, Li Y Q, Gao F Z, Jin W, Li S Y, Shadrack K, Yang S, Bao T T, Gao X, Wang L. MYB21 interacts with MYC2 to control the expression of terpene synthase genes in flowers of Freesia hybrida and *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(14): 4140-4158