

刘发旺, 张 银, 李璐恒, 等. 基于代谢组与转录组联合解析干旱胁迫下丹参酮和丹酚酸生物合成的关键调控基因及其分子机制[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(11): 2107-2118.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.11.004

# 基于代谢组与转录组联合解析干旱胁迫下丹参酮和丹酚酸生物合成的关键调控基因及其分子机制

刘发旺<sup>1,2</sup>, 张 银<sup>1</sup>, 李璐恒<sup>1</sup>, 吕欣茹<sup>1</sup>, 许盈盈<sup>1</sup>

(1. 宿州学院生物与食品工程学院, 安徽 宿州 234000; 2. 安徽省皖北道地药材开发与高值化利用工程研究中心, 安徽 宿州 234000)

**摘要:** 本研究采用 20% 聚乙二醇 6000 (PEG 6000) 处理丹参, 结合代谢组和转录组, 系统解析干旱胁迫下丹参酮和丹酚酸生物合成的调控机制。研究表明, 与对照相比, PEG 6000 处理丹参中超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性极显著降低 ( $P < 0.001$ ), 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性则极显著升高 ( $P < 0.001$ )。代谢组分析结果表明, 与对照相比, PEG 6000 处理丹参中丹参酮类化合物如丹参酮IIA、丹参酮I、二氢丹参酮和隐丹参酮含量显著 ( $P < 0.05$ ) 或极显著升高 ( $P < 0.01$ ), 表明干旱胁迫能有效促进二萜类化合物的积累。与对照相比, PEG 6000 处理丹参中丹酚酸类化合物丹酚酸 B 含量极显著降低 ( $P < 0.001$ ), 表明其生物合成途径受到干旱胁迫的抑制。与对照相比, PEG 6000 处理丹参中含量升高的代谢产物和差异表达基因显著富集在二萜生物合成通路中。通过转录组测序筛选到 3 个参与丹参酮合成的基因, 分别为 *CYP76AH4*、*CYP71D411*、*CYP82D63*, 这 3 个基因均注释到二萜生物合成通路中。与对照相比, PEG 6000 处理丹参根中 *EVM0001349*、*EVM0020320* 相对表达量极显著升高 ( $P < 0.01$ ), *EVM0023606* 相对表达量显著降低 ( $P < 0.05$ )。对照丹参叶片中 *EVM0001349*、*EVM0020320* 和 *EVM0023606* 相对表达量极显著高于根系 ( $P < 0.001$ )。生物信息学分析结果表明, *EVM0001349*、*EVM0020320* 和 *EVM0023606* 这 3 个细胞色素 P450 基因可能参与丹参酮的结构修饰。本研究结果为提高丹参药用品质提供了理论依据。

**关键词:** 干旱胁迫; 丹参; 转录组; 代谢组; 丹参酮

中图分类号: S567.23

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2025)11-2107-12

## Analysis of the key regulatory genes and molecular mechanisms of tanshinone and salvianolic acid biosynthesis under drought stress through integrated metabolomics and transcriptomics

LIU Fawang<sup>1,2</sup>, ZHANG Yin<sup>1</sup>, LI Luheng<sup>1</sup>, LYU Xinru<sup>1</sup>, XU Yingying<sup>1</sup>

(1. School of Biology and Food Engineering, Suzhou University, Suzhou 234000, China; 2. Engineering Research Center for Development and High Value Utilization of Genuine Medicinal Materials in North Anhui Province, Suzhou 234000, China)

收稿日期: 2025-02-18

**基金项目:** 安徽省高校优秀科研创新团队项目 (2022AH010080); 宿州市科技计划重大专项 (SZKJXM202423); 宿州学院非财政资助科研项目 (2024xhx196); 宿州学院博士科研启动基金项目 (2022BSK033); 宿州学院大学生创新创业训练计划项目 (202510379040)

**作者简介:** 刘发旺 (1990-), 男, 安徽宿州人, 博士, 讲师, 研究方向为中药化学和分子生物学。(E-mail) fawang10314@ahszu.edu.cn

**Abstract:** In this study, *Salvia miltiorrhiza* Bge. was treated with 20% polyethylene glycol 6000 (PEG 6000), and a combination of metabolomics and transcriptomics was used to systematically elucidate the regulatory mechanisms of tanshinone and salvianolic acid biosynthesis under drought stress. The results showed that compared with the control, the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and catalase (CAT)

in PEG 6000-treated *Salvia miltiorrhiza* Bge. reduced extremely significantly ( $P < 0.001$ ), while the activity of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) increased extremely significantly ( $P < 0.001$ ). Metabolomic analysis revealed that compared with the control, the contents of tanshinone compounds such as tanshinone II<sub>A</sub>, tanshinone I, dihydrotanshinone, and cryptotanshinone in PEG6000-treated *Salvia miltiorrhiza* Bge. increased significantly ( $P < 0.05$ ) or extremely significantly ( $P < 0.01$ ), indicating that drought stress could effectively promote the accumulation of diterpenoid compounds. Compared with the control, the content of compound salvianolic acid B in PEG 6000-treated *Salvia miltiorrhiza* Bge. reduced extremely significantly ( $P < 0.001$ ), indicating that its biosynthetic pathway was inhibited by drought stress. Compared with the control, the metabolites with increased content and differentially expressed genes in PEG 6000-treated *Salvia miltiorrhiza* Bge. were significantly enriched in the diterpenoid biosynthesis pathway. Three genes involved in tanshinone synthesis were screened through transcriptome sequencing, namely *CYP76AH4*, *CYP71D411*, and *CYP82D63*, all of which were annotated in the diterpenoid biosynthesis pathway. Compared with the control, the relative expression levels of *EVM0001349* and *EVM0020320* in the roots of PEG 6000-treated *Salvia miltiorrhiza* Bge. increased extremely significantly ( $P < 0.01$ ), while the relative expression level of *EVM0023606* reduced significantly ( $P < 0.05$ ). Moreover, the relative expression levels of *EVM0001349*, *EVM0020320*, and *EVM0023606* in the leaves of control *Salvia miltiorrhiza* Bge. were extremely significantly higher than those in the roots ( $P < 0.001$ ). Bioinformatics analysis indicated that these three cytochrome P450 genes might be involved in the structural modification of tanshinones. This study provides a theoretical basis for improving the medicinal quality of *Salvia miltiorrhiza* Bge..

**Key words:** drought stress; *Salvia miltiorrhiza* Bge.; transcriptome; metabolome; tanshinone

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)为唇形科鼠尾草属植物,始载于《神农本草经》,具有活血祛瘀、止痛通经等功效,是中国重要的传统中草药<sup>[1]</sup>。丹参自然资源丰富,主要分布于山东、河南、四川等中国大部分地区的山坡、草地、林下及溪旁等生境,具有广阔的开发利用前景<sup>[2]</sup>。据《中华人民共和国药典》,丹参根和根茎可以入药,用于治疗心脑血管疾病,对于心绞痛和心肌梗死具有显著疗效<sup>[3-4]</sup>。

丹参的主要活性成分包括水溶性丹酚酸类和脂溶性丹参酮类化合物。其中丹酚酸类化合物具有抗脂质过氧化、清除自由基、抑制血栓形成等药理活性;丹参酮类化合物的主要作用是改善血液循环和保护心血管<sup>[5-7]</sup>。《中华人民共和国药典》将丹参酮 II<sub>A</sub> 和丹酚酸 B 作为质量控制标准物质,规定其含量分别不低于 0.2% 和 3.0%<sup>[7]</sup>。

丹参酮类化合物属于二萜类化合物,其生物合成源于甲羟戊酸途径(MVA)和 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸途径(MEP)。这两条途径首先合成牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(GGPP),经柯巴基焦磷酸合酶和类贝壳杉烯合酶催化生成次丹参酮二烯,再通过细胞色素 P450 的修饰,最终形成丹参酮类化合物。丹酚酸类化合物生物合成途径中,迷迭香酸为咖啡酸与丹参素的二聚物,丹酚酸 B 为迷迭香酸二聚体。迷迭香酸的生物合成涉及苯丙烷代谢途径和酪氨酸代谢途径。苯丙烷代谢途径产生 4-香豆酰辅酶 A,酪氨酸代谢途径生成对羟基

苯乳酸。在迷迭香酸合成酶(RAS)的催化下,两者缩合形成 4-香豆酰-4-羟基苯乳酸,随后经细胞色素 P450 (*CYP98A14*)催化生成迷迭香酸<sup>[8-10]</sup>。尽管迷迭香酸的生物合成途径已基本阐明,但从迷迭香酸到丹酚酸 B 的转化过程仍尚未阐明,参与该过程的关键酶基因尚未被鉴定。因此,深入解析迷迭香酸向丹酚酸 B 转化的分子机制,挖掘相关功能基因,对于完善丹酚酸类化合物的生物合成网络具有重要意义。

干旱是影响植物生长发育的重要非生物胁迫因素,会显著抑制光合作用,进而影响植株的生长发育和次生代谢物积累<sup>[11-13]</sup>。药用植物对水分条件较为敏感,研究发现干旱能够影响次生代谢物的合成<sup>[14-16]</sup>。轻度干旱可促进菘蓝根部靛玉红和黄檗中药根碱、小檗碱及掌叶防己碱的合成,而重度干旱则对这些次生代谢物的合成产生抑制作用<sup>[17-18]</sup>。在干旱胁迫下,柴胡总黄酮和总皂苷含量显著提高,土壤含水量为 40%~50%时,柴胡总皂苷含量达到峰值<sup>[19]</sup>。随着干旱胁迫程度的加深,紫苏叶片中挥发油含量呈现先升高后降低的变化趋势<sup>[20]</sup>。

在分子层面,干旱胁迫会诱导植物基因表达并激活相关信号传导通路。参与抗旱调控的关键基因包括编码转录因子(bZIP、MYB/MYC、NAC、DREB 和 WRKY 等家族)、信号因子、渗透调节物质、抗氧化代谢酶及逆境蛋白的基因<sup>[21-22]</sup>。如在丹参中过表达 *SmGRAS5* 基因可显著增强其耐盐性和抗旱

性<sup>[23]</sup>。因此,深入研究药用植物对干旱胁迫的响应机制,挖掘关键抗旱基因,不仅有助于阐明其抗旱分子机制,还能为解析药用成分的生物合成途径提供理论依据,这对药用植物分子育种和药材品质提升具有重要意义。

转录组学和代谢组学技术为研究植物次生代谢通路及胁迫响应机制提供了有效手段<sup>[24]</sup>。本研究拟采用多组学联用技术,分析丹参根在干旱胁迫下的基因表达和代谢物变化,重点解析苯丙烷和二萜代谢通路相关基因的表达模式,挖掘丹参酮和丹酚酸生物合成相关基因,为后续功能验证和药用植物品质改良提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

紫花丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge),种植于宿州学院安徽省皖北道地药材开发与高值化利用工程研究中心,培养条件为温度 25 ℃,湿度 55%,光周期 16 h/8 h(光照/黑暗)。甲醇、乙腈、甲酸、L-2-氯苯丙氨酸、琥珀酸-d<sub>4</sub>、L-缬氨酸-d<sub>8</sub>、胆酸-d<sub>4</sub>、D-虫荧光素游离酸均为高效液相色谱(HPLC)级。

### 1.2 仪器与设备

超高效液相色谱-质谱联用仪(型号 ACQUITY UPLC I-Class plus,沃特世科技有限公司产品),液相色谱柱(100.0 mm×2.1 mm,填料粒径 1.8 μm,型号 ACQUITY UPLC HSS T3,沃特世科技有限公司产品);高通量测序仪(型号 NovaSeq X Plus, Illumina 公司产品)。

### 1.3 试验方法

1.3.1 植物材料处理 随机选取 6 株健康丹参,其中 3 株丹参常规浇水 1 次,另外 3 株丹参采用 20% 聚乙二醇 6000(PEG 6000)溶液浇灌 1 次,模拟干旱胁迫。处理 7 d 后,采集丹参根系,用液氮速冻。分别由上海美吉生物医药科技有限公司和上海欧易生物医学科技有限公司完成转录组测序和代谢组检测。

1.3.2 酶活性与含量测定 取对照和 PEG 6000 处理丹参根系各 0.1 g,研磨后,测定相关酶活性和代谢物含量。所用超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)和过氧化氢酶(CAT)活性检测试剂盒及植物总酚含量检测试剂盒、植物类黄酮含量检测试剂盒均为北京索莱宝科技有限公司产品。使用酶标仪(型号 ReadMax1200,

上海闪谱生物科技有限公司产品)分别检测 SOD 活性(560 nm)、POD 活性(470 nm)、PAL 活性(290 nm)、CAT 活性(405 nm)、总酚含量(760 nm)和黄酮含量(470 nm)。

1.3.3 LC-MS/MS 代谢组学测定 称取 60 mg 根系组织,加入 600 μL 70% 甲醇,超声提取 30 min,13 000 r/min 离心,取上清液送上海欧易生物医学科技有限公司进行代谢组学检测。超高效液相色谱条件如下:柱温 45 ℃,流动相 A 相 0.1% 甲酸,B 相 乙腈,流速 0.35 mL/min,进样量 3 μL。梯度洗脱程序如下:0~2 min,5% 乙腈;2~14 min,5%~100% 乙腈。质谱条件为,如下:正/负离子切换模式,喷雾电压 3 800 V,毛细管温度 320 ℃,辅助气体流量 8 Arb,MS/MS 分辨率 17 500,质谱扫描范围 70~1 050(m/z)。

1.3.4 丹参代谢组数据分析 采用主成分分析(PCA)和偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)筛选差异代谢物。筛选标准如下:P<0.05,投影变量重要性值(VIP)>1。利用 HMDB、Lipidmaps、METLIN 和 LuMet-Plant3.0 数据库对差异代谢物进行注释,利用 KEGG 数据库(<https://www.genome.jp/kegg/>)对差异代谢物进行通路富集分析。

1.3.5 丹参总 RNA 的提取 取 1 g 丹参根系组织,用液氮研磨后,使用 MJZol total RNA extraction kit(上海美吉生物医药科技有限公司产品)提取丹参总 RNA。使用 Nanodrop2000(Thermo Fisher Scientific)测定 RNA 浓度和纯度,利用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,使用片段分析仪系统(型号 Fragment Analyzer 5300,Agilent 公司产品)测定 RNA 完整值(RIN)。符合要求的 RNA(质量浓度≥30 ng/μL,RIN>6.5 且 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>为 1.8~2.2)用于后续建库测序。

1.3.6 RNA 文库构建与转录组测序 基于 Illumina NovaSeq 6000 平台,采用 Illumina NovaSeq Reagent Kit 试剂盒(Illumina 公司产品)构建文库并进行双端测序。利用 fastp 软件(<https://github.com/OpenGene/fastp>)对原始测序数据进行过滤,去除低质量序列(含 N>10%,长度<20 bp)和接头序列。将高质量序列与丹参参考基因组(GWHAOSJ000000000,<https://ngdc.cncb.ac.cn/gwh/Assembly/10381/show>)进行比对,并利用 NR、GO、KEGG、Swiss-Prot、EggNOG 和 Pfam 数据库进行功能注释。

1.3.7 转录组数据分析 基因表达定量采用 RSEM(<http://deweylab.github.io/RSEM/>),差异表达分析

采用 DESeq2 (<http://bioconductor.org/packages/stats/bioc/DESeq2/>), 显著差异表达基因筛选标准为, 错误发现率 ( $FDR$ )  $< 0.05$ , 差异倍数 ( $FC$ )  $\geq 2$  或  $FC \leq 1/2$ 。基因功能分析采用 KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn>) 进行 KEGG 通路富集, 显著富集通路的筛选标准为  $P \leq 0.05$ 。

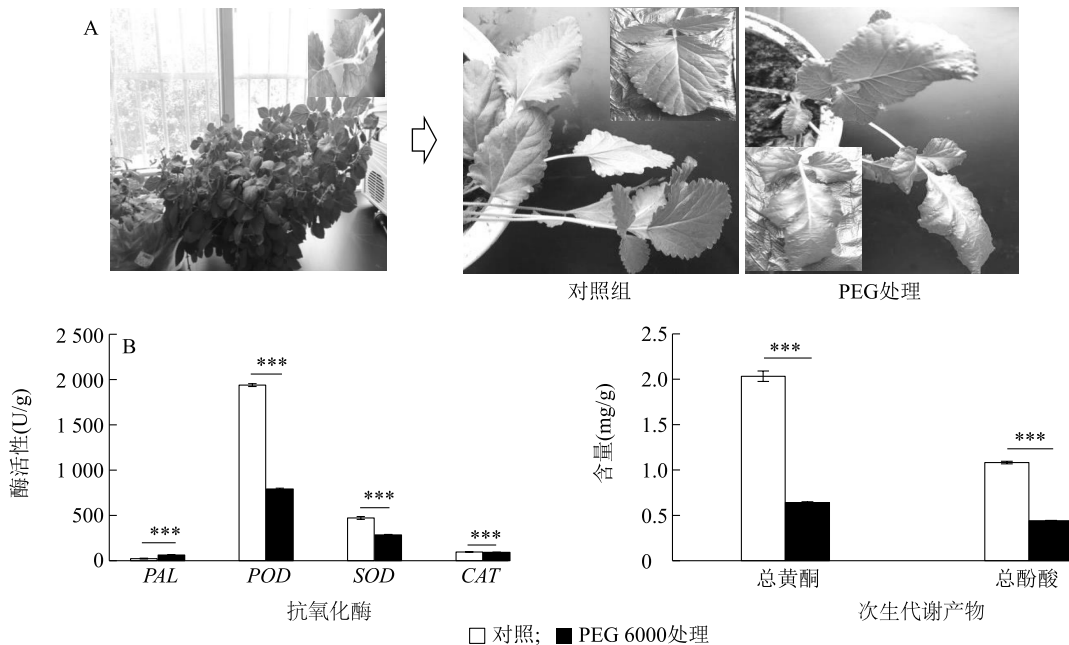
1.3.8 响应干旱胁迫的 3 个细胞色素 P450 基因的克隆和生物信息学分析 利用 MonPure Plant RNA Kit (莫纳生物科技有限公司产品) 提取 RNA, 利用 MonScript™ RTII Super Mix with dsDNase (莫纳生物科技有限公司产品) 合成 cDNA。克隆 *EVM0001349*、*EVM0020320*、*EVM0023606* 的引物序列分别为 *EVM0001349*-F (5'-ATGATGGAGTTGAA-CATCCCATCCAC-3') 和 *EVM0001349*-R (5'-CTATC-TTGCAGGAAGAGGTCGCTTC-3')、*EVM0020320*-F (5'-ATGGGCTGGATTTGGCGGCGGCAGTAGT-3') 和 *EVM0020320*-R (5'-TCAAACGCTTAACCTATAAA-TTGGTATAG-3')、*EVM0023606*-F (5'-ATGGAGGAA-TTAATCCAATCCAATCCCATGCTA-3') 和 *EVM0023606*-R (5'-TTAATTAGTGTGACGAGTGGCAAGTACA-AGAAG-3')。PCR 体系:  $2 \times Taq$  PCR Mix 预混液 [生工生物工程(上海)股份有限公司产品]。PCR 程序:  $94\text{ }^\circ\text{C}$ , 3 min;  $94\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 s,  $60\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 s,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ ,

2 min, 30 个循环;  $72\text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min。采用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网站中的 CDD 模块 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 进行功能域预测, 用 SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 在线软件预测蛋白质的三级结构。

## 2 结果与分析

### 2.1 干旱胁迫下丹参的形态、抗氧化酶活性和次生代谢产物含量分析

如图 1 所示, PEG 6000 处理的丹参植株叶片明显卷曲、萎蔫, 叶柄倒伏, 整体生长活性极显著降低。这些形态学变化表明丹参受到干旱胁迫影响, 植株发生水分亏缺。生理指标测定结果表明, PEG 6000 处理改变了丹参中抗氧化酶活性和次生代谢产物含量。与对照相比, PEG 6000 处理丹参中超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性极显著降低 ( $P < 0.001$ ), 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性则极显著升高 ( $P < 0.001$ ), 总黄酮含量和总酚酸类化合物含量极显著降低 ( $P < 0.001$ )。PEG 6000 对 PAL 活性具有诱导作用, 这可能是因为 PAL 参与植物茎秆木质素生成、促进水分传递, 表明丹参通过诱导基因的表达促进植物水分由根部向上传递或者促进苯丙烷代谢通路上次生代谢物的合成以响应干旱胁迫。



\*\*\*: 差异极显著 ( $P < 0.001$ ); PEG: 聚乙二醇。图中数据以鲜重计。

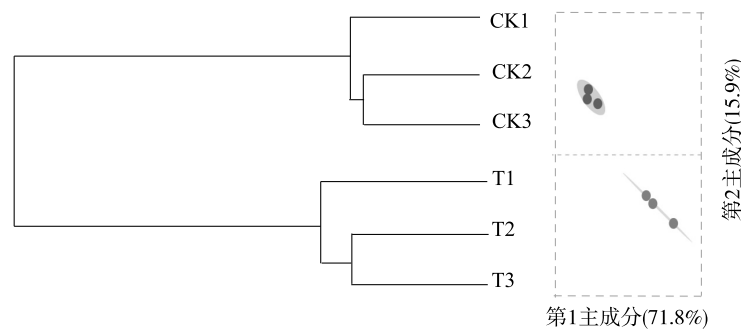
图 1 干旱胁迫下丹参的形态、抗氧化酶活性和总黄酮、总酚酸含量

Fig.1 Morphology, antioxidant enzyme activities, and total flavonoids and total phenolic acids contents of *Salvia miltiorrhiza* Bge. under drought stress

## 2.2 干旱胁迫下丹参的代谢组学分析

基于高效液相色谱-串联质谱技术(HPLC-MS/MS),对丹参进行代谢组学分析。如图2所示,对照和PEG 6000处理的丹参样本分别形成明显的独立聚类,表明干旱胁迫显著改变了丹参中次生代谢物质的合成。通过与HMDB、Lipidmaps(v2.3)、METLIN和LuMet-Plant3.0数据库比对,共鉴定到6 805个代谢物。以 $P < 0.05$ 和VIP>1.0作为筛选标准,筛选得到314个差异表达代谢物。其中,与对照相比,PEG 6000处理丹参中200个代谢物含量升高,114

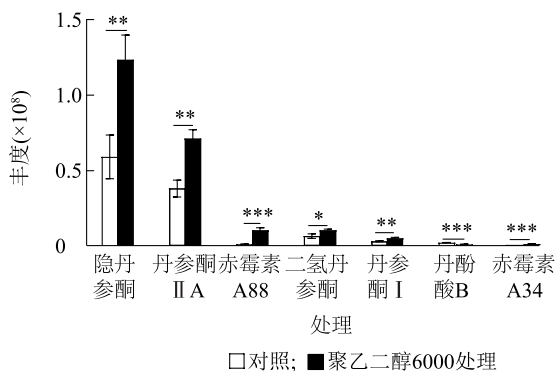
个代谢物含量降低。如图3所示,与对照相比,PEG 6000处理丹参中丹参酮类化合物如丹参酮II A、丹参酮I、二氢丹参酮和隐丹参酮含量显著( $P < 0.05$ )或极显著升高( $P < 0.01$ ),表明干旱胁迫能有效促进二萜类化合物的积累。与对照相比,PEG 6000处理丹参中丹酚酸类化合物丹酚酸B含量极显著降低( $P < 0.001$ ),表明其生物合成途径受到干旱胁迫的抑制。此外,与对照相比,PEG 6000处理丹参中赤霉素A88和赤霉素A34含量极显著升高( $P < 0.001$ )。



CK1~CK3:对照;T1~T3:聚乙二醇6000处理。

图2 干旱胁迫下丹参次生代谢产物的主成分分析

Fig.2 Principal component analysis of secondary metabolites of *Salvia miltiorrhiza* Bge. under drought stress



\*\*\*:差异极显著( $P < 0.001$ ); \*\*:差异极显著( $P < 0.01$ ); \*:差异显著( $P < 0.05$ )。

图3 干旱胁迫下丹参的差异代谢产物丰度

Fig.3 Differential metabolites of *Salvia miltiorrhiza* Bge. under drought stress

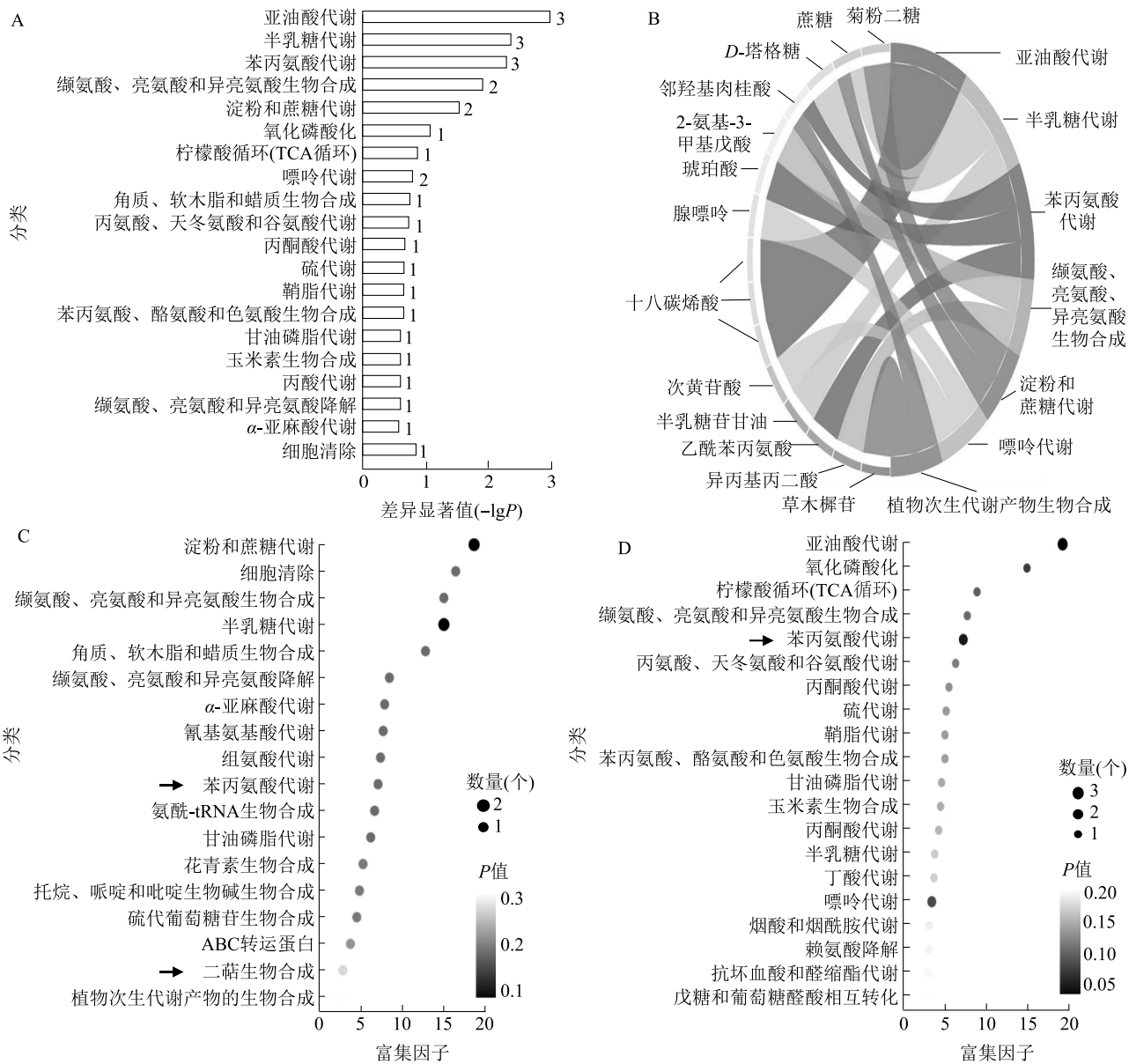
KEGG 通路富集分析结果表明,314个差异代谢物富集于39条代谢通路中。如图4所示,差异代谢物富集程度最高的前10条通路为苯丙氨酸代谢,半乳糖代谢,亚油酸代谢,嘌呤代谢,淀粉和蔗糖代谢,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,二萜生物合成,ABC转运蛋白,苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸生物合

成。与对照相比,PEG 6000处理丹参中含量升高的代谢产物主要富集在淀粉和蔗糖代谢、二萜生物合成、ABC转运蛋白和苯丙氨酸代谢,PEG 6000处理丹参中含量降低的代谢产物主要富集在嘌呤代谢、赖氨酸降解和苯丙氨酸代谢。干旱促进二萜生物合成通路上的代谢产物的生成,包括丹参酮。

## 2.3 干旱胁迫下丹参的转录组学分析

如图5所示,对照和PEG 6000处理丹参中基因表达量中位值相近,表明转录组数据重复性较好。主成分分析结果表明,对照和处理的丹参样本分别形成明显的独立聚类,表明组内生物学重复性良好,测序数据可靠,可用于后续差异表达分析。

如图6所示,利用StringTie软件对测序数据进行组装,共获得61 773个转录本。其分布特征为,长度>1 800 bp的转录本22 488个,长度1 201~1 400 bp区间的转录本5 123个。基于丹参参考基因组(中国国家生物信息中心编号GWHAOSJ00000000),使用gffcompare软件进行新转录本鉴定。如图7所示,在NR、GO、KEGG、Swiss-Prot、EggNOG和Pfam数据库中,有49 738个转录本获得至少一个数据库的注释,



A:聚乙二醇 6000 胁迫下代谢物显著富集到的 20 条代谢通路;B:聚乙二醇 6000 胁迫下代谢物显著富集的 KEGG 通路和弦图;C:聚乙二醇 6000 胁迫下上调表达代谢物的 KEGG 富集图;D:聚乙二醇 6000 胁迫下下调表达代谢物的 KEGG 富集图。箭头所示为本研究主要关注的途径;柱状图上的数字为代谢物的数量。

图 4 干旱胁迫下丹参差异表达基因 KEGG 富集分析

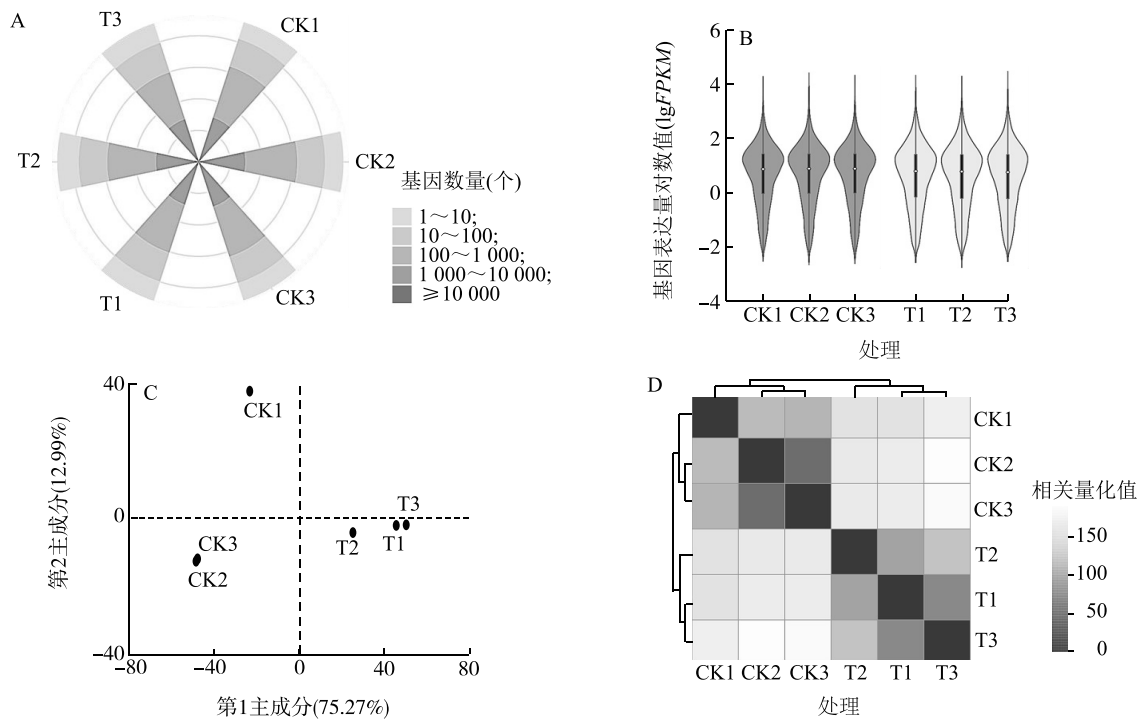
Fig.4 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes of metabolites in *Salvia miltiorrhiza* Bge. under drought stress

转录本在 NR 数据库中获得最多注释(27 481 个转录本),其次是 EggNOG(24 241 个)。

如图 8 所示,共鉴定到 8 832 个差异表达基因,其中相对表达量显著升高的基因 3 215 个,相对表达量显著降低的基因 3 544 个。其中基因 *EVM0004134* 相对表达量显著降低,其功能注释为乙烯不敏感蛋白,参与丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路;基因 *EVM0011433* 相对表达量显著升高,其功能注释

为紫外线切除修复蛋白 RAD23,该蛋白为紫外辐射敏感蛋白,参与了 DNA 损伤核酸修复、细胞应激反应和生长发育。

对差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析,在次生代谢相关通路中,差异表达基因在二萜生物合成通路(ko00904)的富集程度最为明显,共注释到 18 个差异表达基因。苯丙氨酸代谢通路(ko00360)、苯丙烷类生物合成通路(ko00940)、酪氨酸代谢通路



A: 比对至丹参参考基因组的各样本基因数; B: 基因每千碱基每百万映射片段数 (FPKM) 小提琴分布图; C: 主成分分析图; D: 丹参样本聚类热图。CK1~CK3: 对照; T1~T3: PEG 6000 处理。

图 5 干旱胁迫下丹参转录组测序数据质量评估

Fig.5 Quality assessment of the transcriptome sequencing data of *Salvia miltiorrhiza* Bge. under drought stress

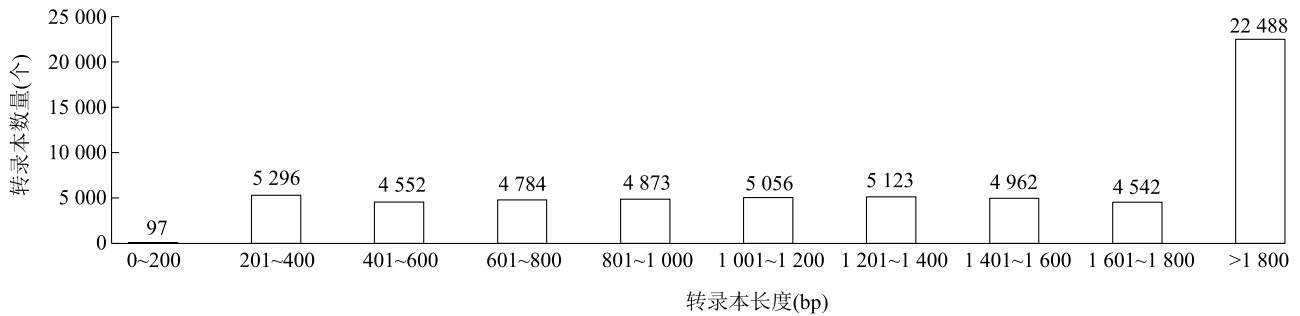


图 6 丹参转录本长度分布

Fig.6 Distribution of transcript length in *Salvia miltiorrhiza* Bge.

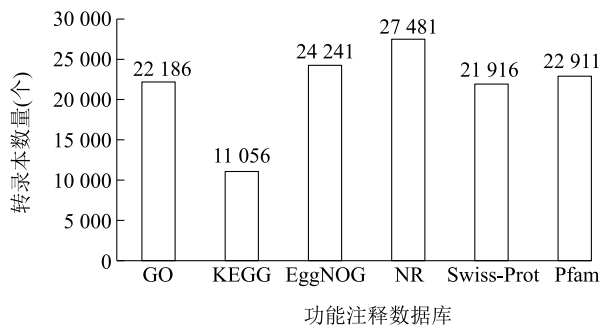
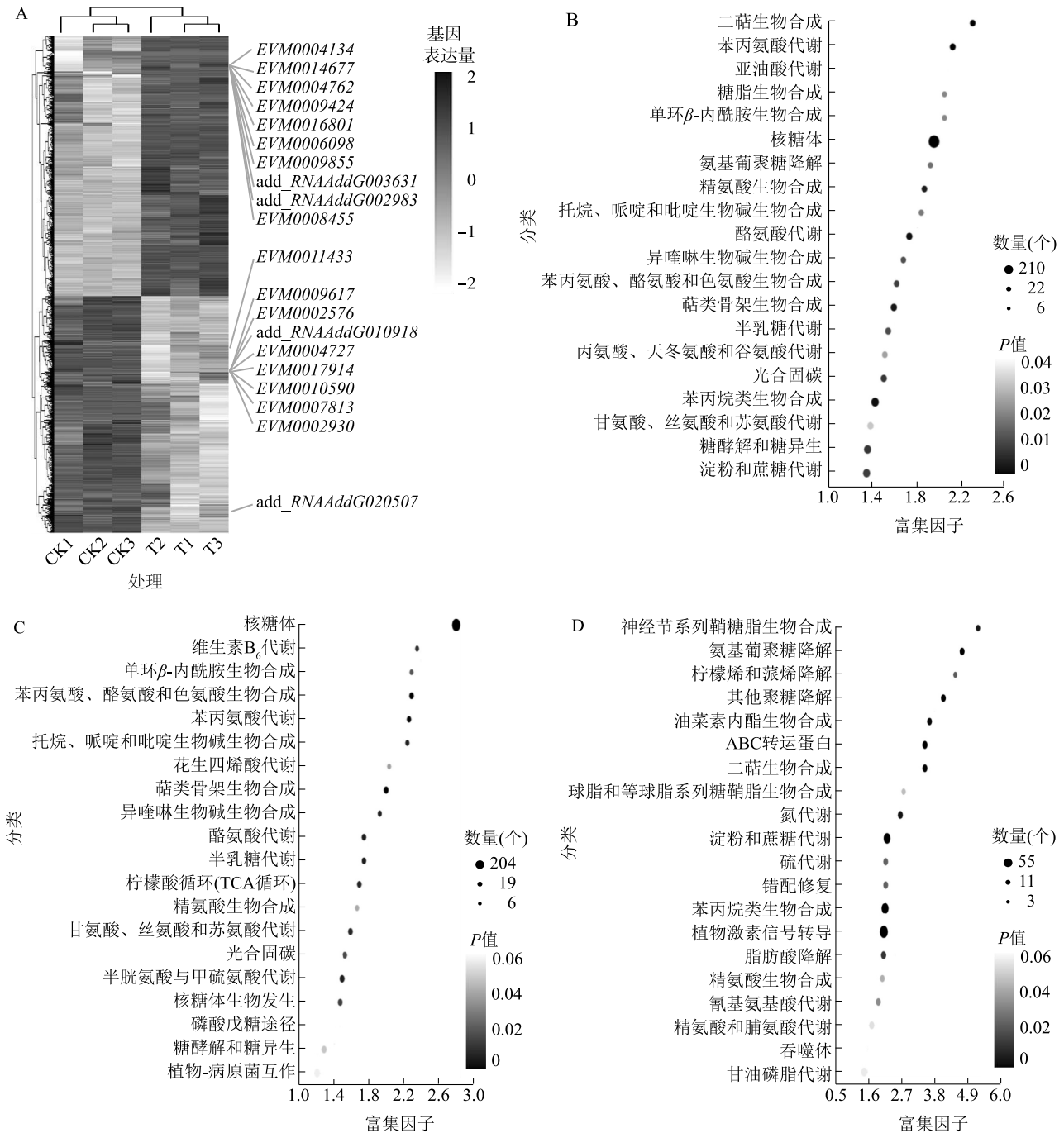


图 7 丹参转录本在数据库中的功能注释情况

Fig.7 Functional annotation in databases for *Salvia miltiorrhiza* Bge.

(ko00350) 和萜类骨架生物合成通路 (ko00900) 分别注释到 21 个、62 个、27 个和 31 个差异表达基因。进一步分析发现, 与对照相比, PEG 6000 处理丹参中相对表达量升高的基因主要富集于苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成通路 (ko00400)、萜类骨架生物合成通路 (ko00900)、苯丙氨酸代谢通路 (ko00360) 和半乳糖代谢通路 (ko00052)。与对照相比, PEG 6000 处理丹参中相对表达量降低的基因主要富集于植物激素信号转导通路 (ko04075)、苯丙烷类生物合成通路 (ko00940)、淀粉和蔗糖代谢通路 (ko00500)、氨基葡聚糖降解通路 (ko00531)、其他聚糖降解通路

(ko00511,12 个基因)、ABC 转运蛋白通路(ko02010) 和二萜生物合成通路(ko00904)。



A: 差异表达基因聚类分析; B: 差异表达基因富集程度最高的前 20 个 KEGG 通路; C: 含量升高的差异表达基因富集程度最高的前 20 个 KEGG 通路; D: 含量降低的差异表达基因富集程度最高的前 20 个 KEGG 通路。CK1~CK3: 对照; T1~T3: PEG 6000 处理。

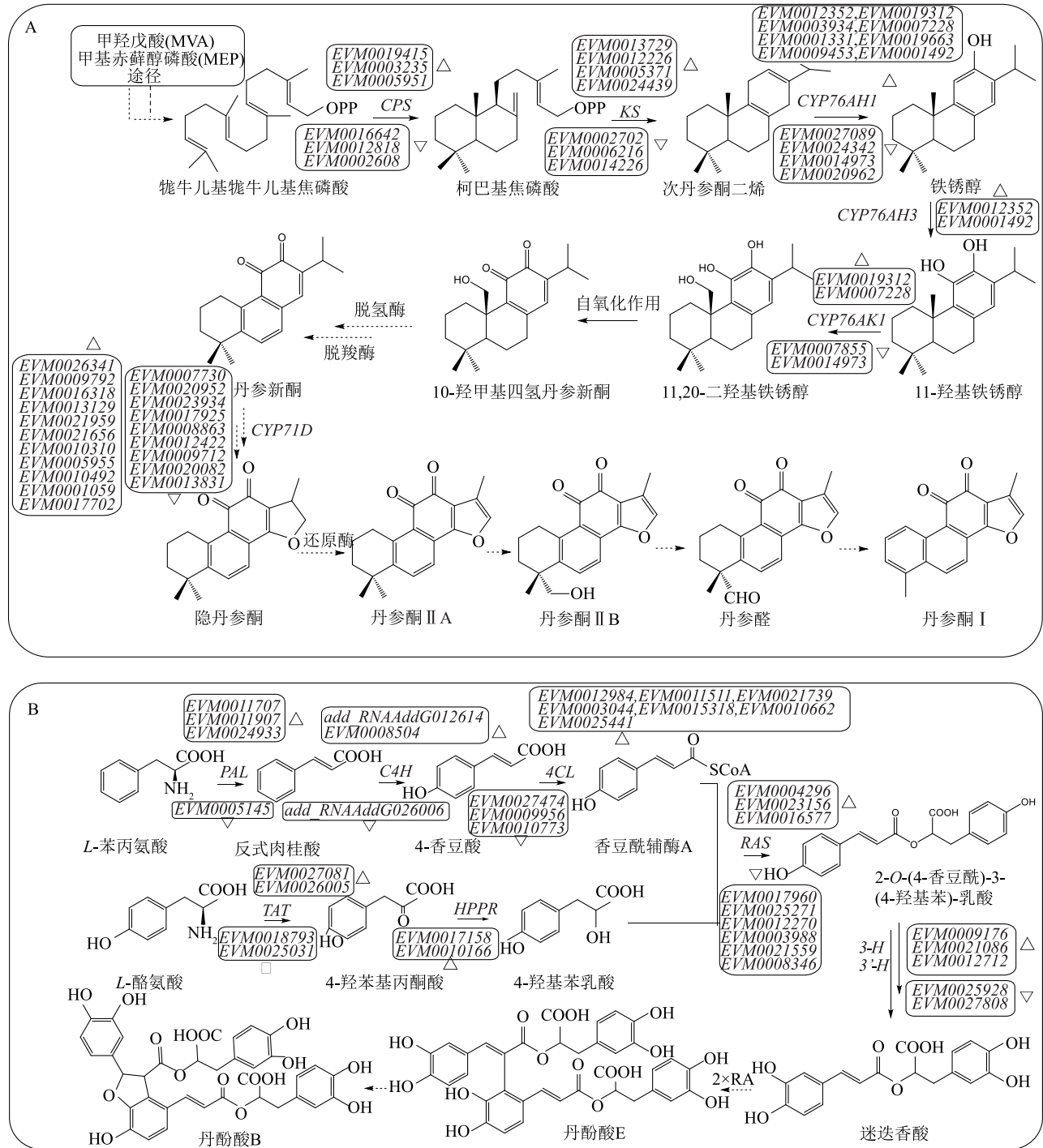
图 8 干旱胁迫下丹参差异表达基因 KEGG 通路富集分析

Fig.8 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes in *Salvia miltiorrhiza* Bge. under drought stress

如图 9 所示,丹参酮作为二萜类植物次生代谢产物,其骨架结构通过二萜生物合成通路(ko00904)合成,然后经 CYP450 酶催化转化为丹参酮类化合物。对注释到 ko00904 通路上的基因以及相关 P450 酶基

因进行分析发现,有 6 个基因编码柯巴基焦磷酸合酶(CPS),7 个基因编码贝壳杉烯合成酶(KS),13 个基因编码 CYP76AH1 酶,3 个基因编码 CYP76AH3 酶,4 个基因编码 CYP76AK1 酶,以及 22 个基因编码

*CYP71D* 酶。*CPS* 和 *KS* 参与赤霉素前体对映-贝壳杉烯的合成, *CYP76AH1*、*CYP76AH3* 和 *CYP76AK1* 参与



△基因上调表达; ▽基因下调表达

A: 丹参酮生物合成通路; B: 丹酚酸生物合成通路。 *CPS*: 柯巴基焦磷酸合酶; *KS*: 贝壳杉烯合酶; *CYP76AH1*、*CYP76AH3*、*CYP76AK1* 和 *CYP71D*: 细胞色素 P450; *PAL*: 苯丙氨酸解氨酶; *C4H*: 肉桂酸-4-羟化酶; *4CL*: 4-香草素辅酶 A 连接酶; *TAT*: 酪氨酸氨基转移酶; *HPPR*: 对羟基苯丙酮酸还原酶; *RAS*: 迷迭香酸合成酶; *3-H*: 羟桂皮烯醛基-羟苯乳酸基 3 羟化酶; *3'-H*: 羟桂皮烯醛基-羟苯乳酸基 3' 羟化酶。

图 9 干旱胁迫下丹参酮、丹酚酸生物合成通路

Fig.9 Biosynthetic pathways of tanshinones and salvianolic acid in *Salvia miltiorrhiza* Bge. under drought stress

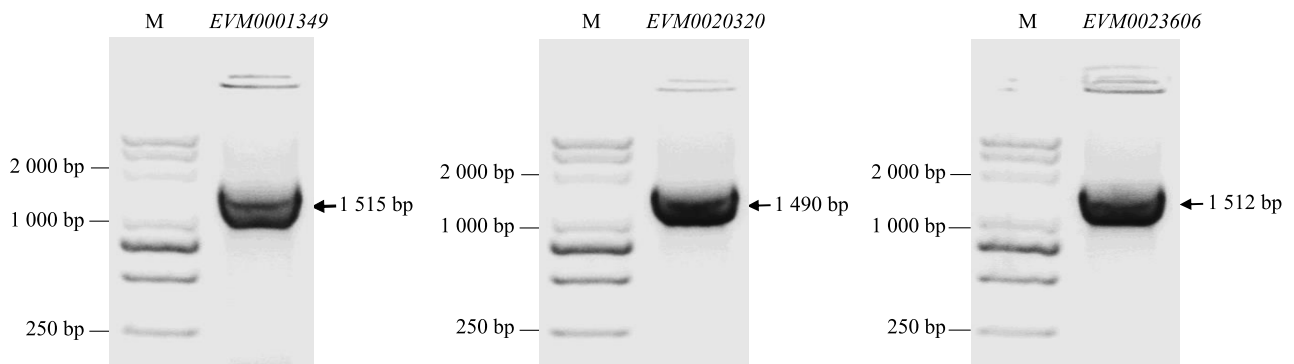
进一步分析丹酚酸生物合成通路发现,有 4 个基因注释为苯丙氨酸解氨酶(*PAL*),3 个基因注释为肉桂酸-4-羟化酶(*C4H*),10 个基因注释为 4-香豆素辅酶 A 连接酶(*4CL*),4 个基因注释为酪氨酸氨基转移酶(*TAT*),2 个基因注释为对羟基苯丙酮酸还原酶(*HPPR*),10 个基因注释为迷迭香酸合成酶(*RAS*),5 个基因注释为羟桂皮烯醛基-羟苯乳酸基 3-羟化酶(*3-H*)和 3'-羟化酶(*3'-H*)。在 PEG 6000 胁迫下,丹参中丹酚酸 B 含量降低,这可能是因为 *PAL*、*C4H*、*4CL* 参与其他酚酸类化合物的合成以抵御非生物胁迫,从而减少碳流向丹酚酸 B 合成路径的分配。

#### 2.4 3 个差异表达细胞色素 P450 基因的克隆

丹参酮的生物合成涉及多个细胞色素 P450 的级联催化作用,包括 *CYP71D375* 催化丹参新酮生成 16-羟基丹参新酮、*CYP76AH1* 催化次丹参酮二烯转化为铁锈醇、*CYP76AH3* 催化铁锈醇生成柳杉酚等关键修饰步骤。丹参的药用部位为地下干燥根和根茎,这与其主要药效成分之一丹参酮的含量组织分布有关。如图 10 所示,基于转录组测序结果筛选得到 3 个 *P450* 酶基因,分别为 *EVM0001349*、*EVM0020320* 和

*EVM0023606*,其 cDNA 长度分别为 1 515 bp、1 490 bp 和 1 512 bp。如图 11 所示,与对照相比,PEG 6000 处理丹参根中 *EVM0001349*、*EVM0020320* 相对表达量极显著升高( $P<0.01$ ),*EVM0023606* 相对表达量显著降低( $P<0.05$ )。并且对照丹参叶片中 *EVM0001349*、*EVM0020320* 和 *EVM0023606* 相对表达量极显著高于根系( $P<0.001$ )。

如图 12 所示,*EVM0001349*(*CYP76AH4*) 编码蛋白氨基酸序列与鼠尾草 *CYP71D10* 同源性达 74.26%,*EVM0020320*(*CYP71D411*) 编码蛋白氨基酸序列与 *CYP71AU50* 同源性高达 98.39%,*EVM0023606*(*CYP82D63*) 编码蛋白氨基酸序列与 *CYP71A8* 同源性达 97.82%。蛋白质三级结构预测结果表明,*EVM0001349*(*CYP76AH4*) 编码蛋白与丹参细胞色素 P450(蛋白质序列登录号 S4UX51.1.A) 三维结构相似度达到 73.71%;*EVM0020320* 编码蛋白与细胞色素 P450(蛋白质序列登录号 A0A2G9H8E5.1.A) 三维结构相似度为 72.51%;*EVM0023606* 编码蛋白与丹参铁锈醇合酶 *CYP76AH1*(蛋白质序列登录号 7cb9.1.A) 三维结构相似度为 34.26%。



M: DNA 分子量标准物。

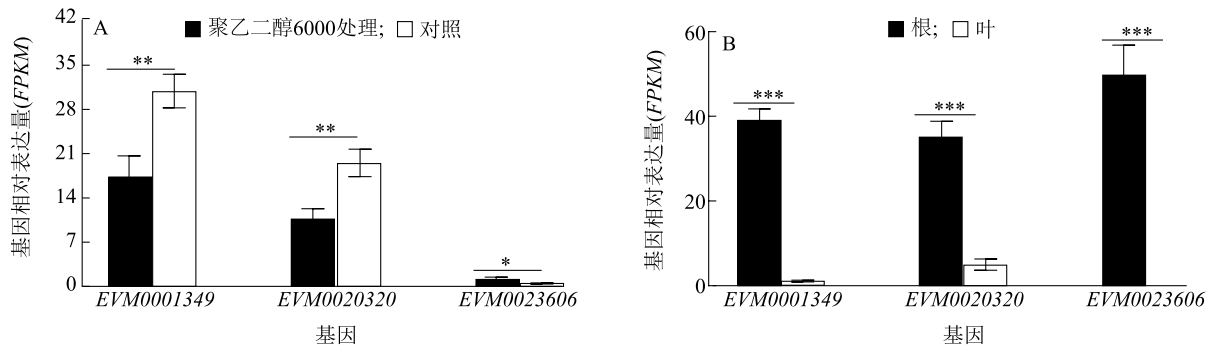
图 10 *EVM0001349*、*EVM0020320* 和 *EVM0023606* 的克隆结果

Fig.10 Cloning results of *EVM0001349*, *EVM0020320*, and *EVM0023606*

### 3 讨论与结论

本研究发现,与对照相比,PEG 6000 处理丹参中超氧化物歧化酶(*SOD*)、过氧化物酶(*POD*)和过氧化氢酶(*CAT*)活性极显著降低( $P<0.001$ ),苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)活性则极显著升高( $P<0.001$ )。而随着 PEG 6000 浓度的增加,木薯和花椒中 *POD*、*CAT* 活性提高,丙二醛(MDA)含量升高<sup>[25-26]</sup>。

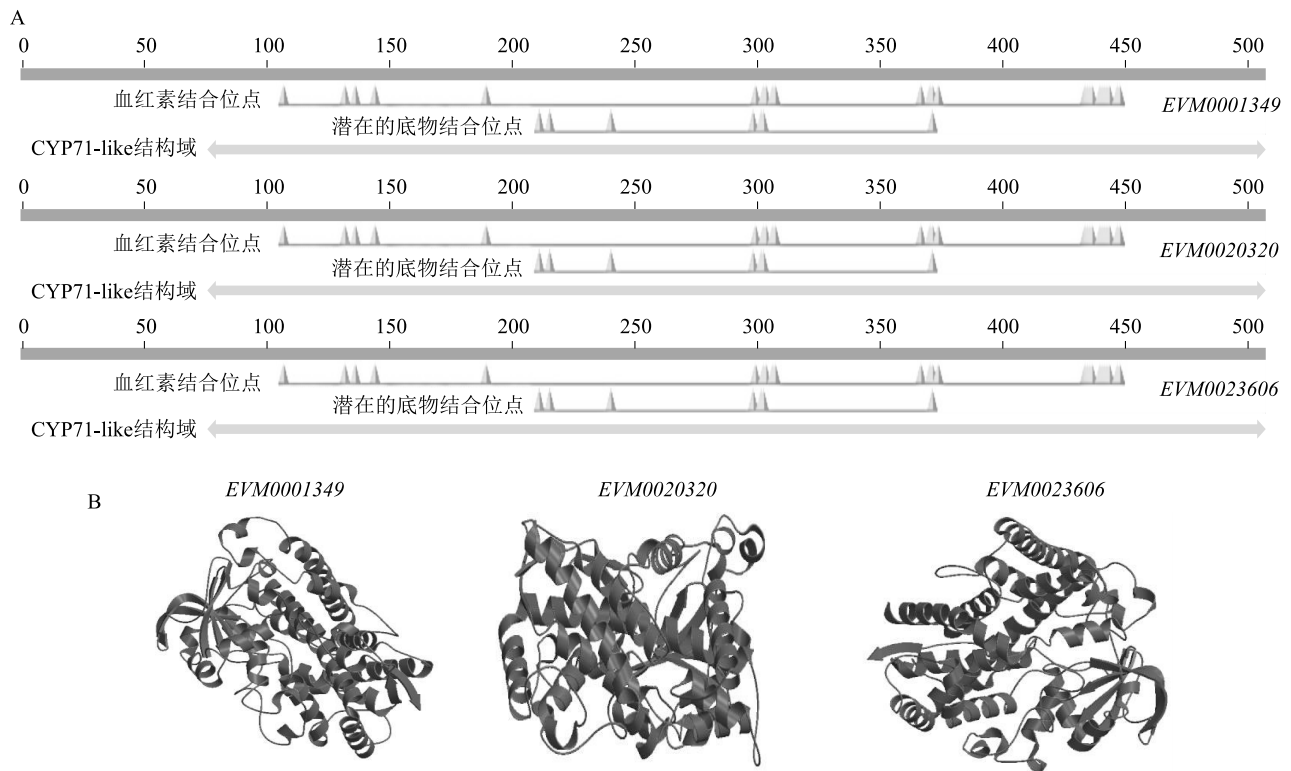
代谢组学分析发现,与对照相比,PEG 6000 处理丹参中酮类化合物如丹参酮 II A、丹参酮 I、二氢丹参酮和隐丹参酮含量显著( $P<0.05$ )或极显著升高( $P<0.01$ ),表明干旱胁迫能有效促进二萜类化合物的积累。与对照相比,PEG 6000 处理丹参中丹酚酸类化合物丹酚酸 B 含量极显著降低( $P<0.001$ ),表明其生物合成途径受到干旱胁迫的抑制。此外,与对照相比,PEG 6000 处理丹参中赤霉素 A88 和赤



A: 在聚乙二醇 6000 模拟干旱胁迫及对对照丹参中的表达水平; B: 在丹参根和叶中的表达水平。\*\*\* : 差异极显著 ( $P < 0.001$ ); \*\* : 差异极显著 ( $P < 0.01$ ); \* : 差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 11 *EVM0001349*、*EVM0020320* 和 *EVM0023606* 的表达结果

Fig.11 Expression results of *EVM0001349*, *EVM0020320*, and *EVM0023606*



A: NCBI BLAST 比对结果及关键催化位点; B: 蛋白质的三级结构。

图 12 *EVM0001349*、*EVM0020320* 和 *EVM0023606* 的生物信息学分析结果

Fig.12 Bioinformatics analysis results of *EVM0001349*, *EVM0020320*, and *EVM0023606*

毒素 A34 含量极显著升高 ( $P < 0.001$ )。刘硕<sup>[27]</sup>发现,与对照相比,10% PEG 6000 处理丹参酮 I、II A 和隐丹参酮含量分别提高 4.72 倍、3.19 倍和 3.82 倍。周正等<sup>[28]</sup>发现,轻度干旱可提高丹参地上部酚酸含量,而重度干旱则使其含量降低;刘景玲<sup>[29]</sup>发现,与对照相比,干旱胁迫下丹参根系中丹酚酸 B 和迷迭香酸含量分别减少 28.49% 和 18.61%。通过

转录组筛选得到参与丹参酮合成的基因 *CYP76AH1*、*CYP76AH3* 和 *CYP76AK1*, 这 3 个基因均注视到二萜生物合成通路 (ko00904)。与对照相比,PEG 6000 处理丹参根中 *EVM0001349*、*EVM0020320* 相对表达量极显著升高 ( $P < 0.01$ ), *EVM0023606* 相对表达量显著降低 ( $P < 0.05$ )。并且对照丹参叶片中 *EVM0001349*、*EVM0020320* 和

*EVM0023606* 相对表达量极显著高于根系 ( $P < 0.001$ )。生物信息学分析结果表明,这 3 个细胞色素 *P450* 基因可能参与丹参酮的结构修饰。

综上,本研究通过多组学联合分析,揭示了干旱胁迫下丹参药效成分(丹参酮与丹酚酸)的含量变化及其关键代谢通路基因的表达模式,并鉴定出 3 个细胞色素 *P450* 基因,为解析丹参次生代谢分子机制及品质改良提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 杨彬,赵文博,张海燕,等. 丹参资源的遗传多样性及其保护利用[J]. 寒旱农业科学,2023,2(11):1002-1008.
- [2] 史顺敏,俞年军,于凡,等. 丹参种质资源的研究进展[J]. 现代中医药,2016,36(6):113-117.
- [3] 陈雨萌,李倩,刘维海,等. 丹参活性成分治疗心血管疾病的药理作用、临床应用及不良反应研究进展[J]. 药学研究,2023,42(12):1028-1034.
- [4] 黄丽丽,苏静. 丹参的作用机制及临床应用研究进展[J]. 中国药物滥用防治杂志,2003,29(6):1002-1006.
- [5] 徐怡,陈途,陈明. 丹参的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2021,33(5):45-48.
- [6] 刘会会,尹佳,强明敏,等. 丹参多酚酸盐药理作用研究进展[J]. 中国当代医药,2021,28(22):32-36.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [8] SHOU M Y, LIN Q Z, XU Y, et al. New insights of advanced biotechnological engineering strategies for tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*[J]. Plant Science,2025,352:112384.
- [9] 詹忠根,李杏. 丹参酮和丹酚酸类化合物的生物合成及其转录调控机制[J]. 药学报,2020,55(9):2110-2121.
- [10] 曾慧婷,宿树兰,朱悦,等. 丹参酚酸类成分生物合成途径及调控机制研究进展[J]. 中草药,2016,47(18):3324-3331.
- [11] GUPTA A, RICO M, CANO D. The physiology of plant responses to drought[J]. Science,2020,368(6488):266-269.
- [12] 李娟,陈杰忠,胡又离,等. 水分胁迫对柑橘果皮细胞壁结构与代谢的影响[J]. 生态学报,2008,28(2):486-492.
- [13] 董馥慧,裴红宾,张永清,等. 干旱胁迫与复水对苦荞生长及叶片内源激素含量的影响[J]. 中国农业科技导报,2019,21(12):41-48.
- [14] 崔文婷,孟玉山,张昱,等. 药用植物干旱胁迫响应研究进展[J]. 南方农业,2019,13(增刊1):151-156.
- [15] BISTGANI Z E, BARKER A V, HASHEMI M, et al. Physiology of medicinal and aromatic plants under drought stress[J]. The Crop Journal,2024,12(2):330-339.
- [16] 白禹,卯丹,王继玥. 黄酮类物质的生物合成及对干旱胁迫响应的研究进展[J]. 安徽农业科学,2018,46(16):24-26.
- [17] 谭勇,梁宗锁,董娟娥,等. 水分胁迫对菘蓝生长发育和有效成分积累的影响[J]. 中国中药杂志,2008,33(1):19-22.
- [18] 李霞,王洋,阎秀峰. 水分胁迫对黄蘗幼苗三种生物碱含量的影响[J]. 生态学报,2007,27(1):58-64.
- [19] 周丽,王永明,周达,等. 干旱胁迫对银柴胡药材活性成分含量的影响研究[J]. 时珍国医国药,2015,26(6):1463-1465.
- [20] 易家宁,王康才,张琪琦,等. 干旱胁迫对紫苏生长及品质的影响[J]. 核农学报,2020,34(6):1320-1326.
- [21] YANG Y, XU Y, FENG B, et al. Regulatory networks of bZIPs in drought, salt and cold stress response and signaling[J]. Plant Science,2025,352:112399.
- [22] 谢荟清,苏文娟,赵娜红,等. 油茶 *bHLH* 基因家族鉴定与响应干旱胁迫的基因表达分析[J]. 中南林业科技大学学报,2025,45(1):168-180.
- [23] LI W R, YU J, WANG R H, et al. Overexpression of *SmGRAS5* enhances tolerance to abiotic stresses in *Salvia miltiorrhiza*[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2025,221:109669.
- [24] 赵陆滢,曹绍玉,龙云树,等. 全长转录组测序在植物中的应用研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2019,20(6):1390-1398.
- [25] 陈默,陈璐,黄晓雅,等. PEG 模拟干旱胁迫下苗期木薯的生长生理响应[J]. 云南农业大学学报(自然科学),2024,39(4):15-22.
- [26] 王纪辉,侯娜,梁美. 水分胁迫下竹叶花椒的生理响应[J]. 江苏农业学报,2019,35(3):676-681.
- [27] 刘硕. PEG 模拟干旱调控丹参酮生物合成的作用及机制[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2024.
- [28] 周正,白玲,余燕,等. 持续水分胁迫对丹参茎叶酚酸含量及其抗氧化活性的影响[J]. 西北植物学报,2022,42(3):435-443.
- [29] 刘景玲. UV-B 辐射和干旱对丹参生物量及酚酸类成分含量的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.

(责任编辑:成纾寒)