

· 药学基础 ·

## 二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族的鉴定和生物信息学分析

刘鸣茹, 朱永平, 陈莎\*

(中国中医科学院 中药研究所 中药鉴定与安全性评估北京市重点实验室, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: *CYP71* 是细胞色素 P450 中 *CYP71* 簇 (*CYP71clan*) 中的其中一个家族, 在次生代谢产物尤其是萜类化合物的生物合成中起到至关重要的作用。为了更好地了解二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族的特征并预测其功能, 该研究利用生物信息学方法对二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族进行鉴定和系统性分析。方法: 在二倍体紫苏 *PC99* 全基因组的基础上, 根据 *CYP71* 基因家族共有的保守结构域进行筛选, 利用美国国家生物技术信息中心 (NCBI)、TBtools、MEME、MEGA、Cytoscape 等工具对二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族的序列特征、基因结构、染色体定位、系统发育、顺式作用元件等进行分析。结果: 在二倍体紫苏中共鉴定出 68 个 *CYP71* 基因, 不均匀的分布在 34 条染色体上, 属于 2 个亚家族, 编码的氨基酸数目介于 481~530, 等电点在 5.70~9.03, 相对分子质量为 54 217.07~60 031.79 Da, 含有 10 个保守基序, 富集分析和功能注释结果显示共富集到 11 个通路和 114 个类别, 功能注释主要集中在生物过程中, 在 *CYP71* 基因的启动子区存在多种顺式作用元件, 主要为光响应和茉莉酸甲酯响应元件, 蛋白质-蛋白质相互作用分析表明 *CYP71* 蛋白具有多种功能比如具有萜烯环化酶活性。结论: 该研究为 *CYP71* 基因家族的功能研究奠定基础, 并为紫苏单萜类化合物的生物合成和定向培育优良品种提供参考。

**[关键词]** 紫苏; 二倍体; *CYP71*; 基因家族; 生物信息学; 功能分析

**[中图分类号]** R284.2; R289; R287; R22; R2-031; R33; R24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)11-0160-11

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20230315 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230210.0938.001.html>

**[网络出版日期]** 2023-02-10 13:09:21

## Identification and Bioinformatics Analysis of *CYP71* Gene Family of Diploid *Perilla frutescens*

LIU Mingru, ZHU Yongping, CHEN Sha\*

(Key Laboratory of Beijing for Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** *CYP71* gene family is one of the *CYP71* clans belonging to cytochrome P450, which plays an important role in secondary metabolites, especially terpenoid biosynthesis. To understand the characteristics of *CYP71* family of diploid *Perilla frutescens* and predict its function, this study identified and systematically analyzed the family by bioinformatics. **Method:** On the basis of the whole genome of diploid *P. frutescens* *PC99*, the conserved domains of *CYP71* family of diploid *P. frutescens* were screened, and the sequence characteristics, gene structure, chromosome location, phylogeny and cis-acting elements were analyzed by National Center for Biotechnology Information (NCBI), TBtools, MEME, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), Cytoscape and other tools. **Result:** A total of 68 *CYP71* genes were identified from diploid *P. frutescens*, which were unevenly distributed on 34 chromosomes and belonged to two subfamilies. They encoded 481-530 amino acids and contained 10 conserved motifs, with the isoelectric point of

**[收稿日期]** 2022-10-11

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82204570); 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04515)

**[第一作者]** 刘鸣茹, 在读硕士, 从事分子生药学研究, E-mail: L17839970524@163.com

**[通信作者]** \* 陈莎, 研究员, 从事中药活性成分生物合成及相关的遗传解析研究, E-mail: schen@icmm.ac.cn

5.70-9.03 and the molecular weight of 54 217.07-60 031.79 Da. The enrichment analysis and functional annotation analysis revealed 11 enriched pathways and 114 categories, and the genes were mainly annotated in biological processes. There were many cis-acting elements in the promoter region of *CYP71*, mainly light-responsive and methyl jasmonate-responsive elements. Protein-protein interaction analysis indicated that *CYP71* protein had multiple functions such as terpene cyclase activity. **Conclusion:** This study lays a foundation for the functional study of *CYP71* family, and provides a reference for the biosynthesis of monoterpenes in *P. frutescens* and the directional cultivation of excellent varieties.

**[Keywords]** *Perilla frutescens*; diploid; *CYP71*; gene family; bioinformatics; functional analysis

紫苏(*Perilla frutescens*)是唇形科紫苏属的一年生直立草本植物,是国家原卫生部食品卫生监督检验所首批颁布的61种(1种重叠)药食同源的药材之一;其入药历史悠久,紫苏子、紫苏叶、紫苏梗在历版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)均有收录,在医药、食品、美妆、畜牧等领域应用广泛,通常作为中药材、油料作物、蔬菜等广泛栽培。作为一味传统的中药材,挥发油是紫苏主要的药效成分和特异香气来源,2020年版《中国药典》记载紫苏叶含挥发油不得少于0.40%(mL·g<sup>-1</sup>)<sup>[1]</sup>。紫苏叶油是藿香正气系列产品中的原料药,特征性单萜成分是紫苏叶油的主要活性成分<sup>[2]</sup>。根据紫苏挥发油中所含主要成分不同,将紫苏分成了紫苏酮(PK型)、紫苏醛(PA型)、香薷酮(EK型)、反式柠檬醛(C型)、苯丙素(PP型)、紫苏烯(PL型)、 $\beta$ -石竹烯、肉豆蔻碱(MT型)、柠檬烯和胡椒烯酮(PT型)等几种化学型<sup>[3]</sup>。现代药理研究表明,紫苏具有抗哮喘、抗糖尿病、抗抑郁、抗癌、抗菌、抗氧化、心脏保护、神经保护、保肝等多种药理作用<sup>[4]</sup>,紫苏挥发油所具有的药理作用在其中占据举足轻重的地位,而其中的特征性单萜成分是紫苏独特药用价值的基础。紫苏酮、紫苏醛是紫苏挥发油中的特征性成分<sup>[5]</sup>,紫苏醛也是紫苏香气质量评价的关键指标。紫苏醛、紫苏酮、紫苏醇等明显抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移,并且能够诱导癌细胞凋亡<sup>[6]</sup>,紫苏醛还能通过蛋白激酶B(Akt)/c-Jun氨基末端激酶(JNK)通路调节炎症反应,抑制大鼠脑缺血再灌注诱导的神经细胞凋亡,起到神经保护的作用<sup>[7]</sup>。紫苏精油不仅对不同的昆虫表现出较强的杀虫和趋避活性,也显示出很强的光谱抗菌特性,这些萜类化合物对引起登革热的蚊子、埃及伊蚊具有很强的杀幼虫活性;对植物病原真菌黄曲霉、黑曲霉、米根霉等也显示出较强的抗真菌活性<sup>[8]</sup>;虽然紫苏对人体无不良反应,但是其对实验动物和牲畜显示出了一些不良反应,在没有任何肺动脉或左心房压力改变的情况下,向绵

羊单次输注紫苏酮会导致绵羊肺液和溶质交换显著增加,导致内皮损伤、间质和肺泡内水肿,引起绵羊非心源性肺水肿<sup>[9]</sup>;紫苏酮和紫苏粗提物对实验动物均显示出强烈的肺损伤情况,并且与来自甘薯的肺损伤异丙醇有很强的化学相似性<sup>[10]</sup>。因此深入研究紫苏单萜类化合物的转录调控机制,对于培育出不含紫苏酮的紫苏品系、降低紫苏叶油系列中成药的用药风险具有重大意义。

紫苏单萜类化合物的生物合成受到显性基因G的控制<sup>[11]</sup>,在基因G存在的情况下,经过甲羟戊酸途径合成单萜类物质,若缺少关键基因G,则通过莽草酸途径合成芳香族类化合物。紫苏单萜类化合物的初始反应步骤是由香叶醇或者柠檬烯合酶催化的香叶基二磷酸(GDP)的去磷酸化,由柠檬烯在C7位羟基化形成紫苏醇再氧化成紫苏醛;由香叶醇经过催化形成紫苏烯、白苏烯酮和紫苏酮;由此可见紫苏精油中几乎所有的单萜类化合物都是由GDP的无环化合物经过环化、氧化或者还原形成的<sup>[12]</sup>。而这些化合物的氧化、还原步骤通常由细胞色素P450(CYP450)催化,在薄荷、长春花的研究中表明紫苏精油中的柠檬烯、香叶醇就作为CYP450的底物<sup>[13-14]</sup>。

CYP450是一种含血红素的单加氧酶,可以催化氧化、羟基化、环氧化和脱烷基化等多种反应,其在植物中主要参与解毒途径或者多种次生代谢产物包括萜类、黄酮类、生物碱类、脂肪酸等的生物合成。CYP450是最大最古老的基因超家族之一,根据其氨基酸序列间的相似性和进化关系分为家族(至少40%的序列统一性)和亚家族(至少55%的序列统一性)<sup>[15]</sup>。*CYP71*家族是*CYP71*簇(71clan)中的其中一个家族,而大多数与萜类化合物相关的CYP450都是*CYP71clan*中的成员,比如主要来自*CYP71A*和*CYP71D*亚家族的基因与不同植物中单萜或者倍半萜的氧化有关,薄荷、留兰香和紫苏都表达柠檬烯羟化酶,在C3(*CYP71D13*和

*CYP71D15*)、*C6*(*CYP71D18*)、*C7*(*CYP71D174*)位上特异性羟基化柠檬烯形成紫苏醇、香芹酚和异胡椒烯醇的混合物<sup>[16]</sup>,从成熟鳄梨果实的中果皮中分离出的第一个植物*CYP450 CYP71A1*能够使单萜橙花醇和香叶醇羟基化<sup>[17]</sup>。目前也有文献报道柠檬烯经过*CYP71D15*催化得到紫苏醇,紫苏醇再经过*CYP71A146*催化脱氢得到紫苏醛<sup>[18]</sup>,由此可见紫苏单萜类物质的生物合成与*CYP71*家族密不可分。相比于费时费力、造价昂贵并且效率不高的化学合成,具有高度特异性和专一性的生物合成尤其受欢迎,在紫苏精油所含的化合物中,柠檬烯、柠檬醛、紫苏醛的生物转化已经有所报道,但还有其他许多组分尚未报道,研究*CYP71*家族对紫苏单萜类物质的生物合成有关键作用。

栽培紫苏为AABB型异源四倍体,ZHANG等<sup>[19]</sup>完成了一套四倍体紫苏和两套AA型二倍体亲本紫苏的染色体水平高质量基因组,进而揭示了在最近1万年内,多倍体化导致碱基突变加速的现象。此研究以二倍体紫苏PC99的基因组为对象,采用生物信息学的方法对紫苏*CYP71*家族的成员进行系统化分析,包括序列特征、基因结构、系统发育、保守基序和共线性关系等,为后期*CYP71*基因家族功能研究和紫苏单萜类化合物的生物合成提供数据支持,并为紫苏优良定向品种的培育提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 二倍体紫苏*CYP71*家族成员的鉴定和理化性质分析** 二倍体紫苏(GCA\_004303085.2)的全基因组和注释文件从NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取,品种是PC99。拟南芥*CYP71*家族(包括*CYP71A*和*CYP71B*)蛋白序列从TAIR(<https://www.arabidopsis.org/>)获取。利用TBtools<sup>[20]</sup>软件提取二倍体紫苏的蛋白序列,并与拟南芥*CYP71*家族蛋白序列进行双向Blast比对,获得初步的二倍体紫苏*CYP71*家族成员。将这些初筛过的蛋白序列通过NCBI的Protein Blast板块进行二次Blast比对,并使用CD-Search工具对蛋白的保守结构域进行分析,去除冗余,保留含有*CYP71*-like结构域的蛋白序列,即为二倍体紫苏*CYP71*家族成员。重命名后通过ExPASy网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析二倍体紫苏*CYP71*家族成员的氨基酸长度、等电点、蛋白质相对分子质量、亲水性指数等;通过CELLO v2.5网站(<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)预测二倍体紫苏*CYP71*家族成员的亚细胞定位。

## 1.2 二倍体紫苏*CYP71*基因家族系统发育分析

通过使用MEGA-X软件的MUSCLE算法对拟南芥和二倍体紫苏*CYP71*家族基因进行多序列比对,采用邻接法(NJ)构建系统发育树,将bootstrap值设置为1 000次,并使用Figtree软件对进化树进行美化。

**1.3 二倍体紫苏*CYP71*家族的基因结构和保守基序分析及富集分析** 通过MEME网站(<https://meme-suite.org/meme/doc/meme.html>)对二倍体紫苏*CYP71*家族蛋白序列的保守基序(motif)进行预测,并将目标保守基序的数量设置为10。利用TBtools软件对二倍体紫苏的基因组注释文件进行解析,并对二倍体紫苏的*CYP71*家族的基因结构和保守基序进行整合和可视化分析。在EGGNOG-mapper(<http://eggno-mapper.embl.de/>)网站上对二倍体紫苏*CYP71*基因家族的蛋白序列进行功能注释,通过TBtools软件从注释文件中比对、鉴定和筛选出二倍体紫苏*CYP71*基因家族成员,并对筛选出的*CYP71*家族成员进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库和基因本体(GO)论数据库富集分析及可视化作图。

**1.4 二倍体紫苏*CYP71*家族成员的染色体定位和共线性分析** 利用TBtools软件根据二倍体紫苏的基因组注释文件确定*CYP71*基因家族成员在染色体上的位置信息,并将染色体分布进行可视化。接着通过TBtools软件中的One Step MCScanX程序来分析二倍体紫苏和拟南芥之间的*CYP71*基因家族的共线性关系,并将其可视化。

**1.5 二倍体紫苏*CYP71*基因家族顺式作用元件预测** 使用TBtools软件从二倍体紫苏基因组序列和注释文件中提取*CYP71*基因上游2 000 bp的启动子序列,通过PlantCare网站(<https://www.plantcare.co.uk/>)对其进行顺式作用元件的预测,利用TBtools工具进行可视化。

**1.6 二倍体紫苏*CYP71*基因互作网络分析** 基于二倍体紫苏和拟南芥*CYP71*的同源蛋白序列,通过STRING(<https://cn.string-db.org/>)网站研究同源蛋白的互作网络,利用Cytoscape软件优化互作网络并进行可视化分析。

## 2 结果与分析

**2.1 二倍体紫苏*CYP71*基因家族成员的鉴定和理化性质分析** 通过双向及二次Blast比对,去除重复序列并通过NCBI-CDD验证结构域后,最终获得68个*CYP71*基因家族成员,将其依次命名为PflCYP71-1~PflCYP71-68,见表1。利用TBtools

软件根据二倍体紫苏的基因组及注释文件获得 PflCYP71 的蛋白序列, 并进行理化性质分析。这些 PflCYP71 蛋白的氨基酸长度在 481~530 个氨基酸之间, 平均长度为 502 个氨基酸, 蛋白质相对分子质量在 54 217.07~60 031.79 Da, 等电点在 5.70~9.03。根据这些蛋白的不稳定系数可以看出大约有一半的蛋白 >40, 提示蛋白可能不稳定, 根据这些蛋

白的总平均亲水性可以看出, 除了 PflCYP71-21 和 PflCYP71-54 之外其他蛋白的总平均亲水性均为负值, 均是亲水性蛋白。亚细胞定位预测结果显示, 有 17 个 PflCYP71 蛋白定位在细胞质中, 有 19 个 PflCYP71 蛋白定位在细胞膜中, 有 19 个 PflCYP71 蛋白定位在线粒体中, 有 12 个 PflCYP71 蛋白定位在叶绿体中, 只有一个 PflCYP71 蛋白定位在细胞核。

表1 二倍体紫苏 CYP71 基因家族基本信息

Table 1 Basic information of CYP71 gene family of diploid perilla frutescens

基因名称	基因号	氨基酸 数目/个	等电点	相对分子 质量/Da	不稳定 系数	总平均 亲水性	亚细胞 定位
PflCYP71-1	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00088_00201294_00204085.mrna1	509	8.04	58 600.78	38.48	-0.241	细胞质
PflCYP71-2	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00088_00007673_00009299.mrna1	505	7.65	57 218.16	47.20	-0.132	细胞膜
PflCYP71-3	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00873_00140403_00141978.mrna1	496	6.61	56 579.56	34.58	-0.138	线粒体
PflCYP71-4	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00873_00293285_00294907.mrna1	494	7.11	56 198.52	34.14	-0.040	线粒体
PflCYP71-5	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00873_00287764_00289337.mrna1	492	7.80	55 986.49	33.98	-0.048	线粒体
PflCYP71-6	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00873_00275214_00276805.mrna1	494	6.90	56 554.73	32.51	-0.141	线粒体
PflCYP71-7	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00953_00476203_00477781.mrna1	501	8.86	56 573.82	40.40	-0.148	线粒体
PflCYP71-8	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00953_00466825_00473077.mrna1	503	8.84	56 678.09	42.93	-0.088	细胞膜
PflCYP71-9	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00403_00228801_00232627.mrna1	526	8.69	59 827.38	38.60	-0.168	细胞膜
PflCYP71-10	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00084_00149221_00150813.mrna1	503	8.64	57 041.38	42.67	-0.188	叶绿体
PflCYP71-11	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00085_00585895_00587491.mrna1	506	8.82	57 412.38	31.75	-0.116	线粒体
PflCYP71-12	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00085_00527297_00528913.mrna1	508	8.45	57 450.30	37.44	-0.146	线粒体
PflCYP71-13	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00085_00691809_00693472.mrna1	509	6.49	57 993.53	43.40	-0.048	细胞膜
PflCYP71-14	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00228_00925133_00926727.mrna1	498	6.99	56 869.30	35.64	-0.137	细胞质
PflCYP71-15	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00228_00838063_00839642.mrna1	499	7.67	56 529.09	40.86	-0.083	细胞质
PflCYP71-16	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00228_00768704_00770317.mrna1	500	8.50	56 636.29	40.14	-0.072	细胞质
PflCYP71-17	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00228_00811853_00815371.mrna1	491	6.79	55 650.90	42.04	-0.041	细胞质
PflCYP71-18	rna-gnl WGS:SDAM PC99_04167_00088331_00089894.mrna1	491	5.70	55 687.28	44.83	-0.102	细胞膜
PflCYP71-19	rna-gnl WGS:SDAM PC99_01760_00503590_00505156.mrna1	492	8.16	55 952.06	39.83	-0.088	线粒体
PflCYP71-20	rna-gnl WGS:SDAM PC99_01760_00511334_00512943.mrna1	498	8.70	56 435.67	45.29	-0.138	线粒体
PflCYP71-21	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00326_00319209_00320874.mrna1	490	7.09	55 741.12	42.13	0.019	细胞膜
PflCYP71-22	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00364_01027994_01029953.mrna1	481	8.37	54 217.07	35.69	-0.090	叶绿体
PflCYP71-23	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00319_00288398_00290319.mrna1	507	6.02	57 084.85	43.06	-0.096	细胞膜
PflCYP71-24	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00319_00190877_00192937.mrna1	506	7.67	57 594.89	43.73	-0.168	细胞质
PflCYP71-25	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00319_00236616_00238283.mrna1	517	6.36	58 445.60	38.58	-0.096	细胞质
PflCYP71-26	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00319_00387954_00390583.mrna1	497	6.49	56 361.23	47.28	-0.070	细胞膜
PflCYP71-27	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00319_00234683_00236303.mrna1	502	8.29	56 997.39	36.27	-0.046	叶绿体
PflCYP71-28	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00319_00339995_00341596.mrna1	497	6.96	56 552.91	31.21	-0.040	细胞质
PflCYP71-29	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00843_00425212_00427036.mrna1	511	5.87	57 380.44	45.26	-0.057	细胞质
PflCYP71-30	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00610_00164718_00166696.mrna1	499	6.45	56 236.18	38.95	-0.059	细胞膜
PflCYP71-31	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00610_00088893_00092558.mrna1	517	6.12	57 921.78	42.79	-0.115	细胞质
PflCYP71-32	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00746_00464746_00467539.mrna1	527	8.86	60 031.79	50.84	-0.185	细胞膜
PflCYP71-33	rna-gnl WGS:SDAM PC99_06499_00090172_00093131.mrna1	506	8.55	57 227.64	38.09	-0.069	叶绿体

续表 1

基因名称	基因号	氨基酸 数目/个	等电点	相对分子 质量/Da	不稳定 系数	总平均 亲水性	亚细胞 定位
<i>Pf1CYP71-34</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00872_00279346_00281994.mrna1	499	6.18	56 572.69	44.96	-0.134	叶绿体
<i>Pf1CYP71-35</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00431_00481379_00483710.mrna1	530	5.97	59 905.03	40.15	-0.173	线粒体
<i>Pf1CYP71-36</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_01149_00263580_00265878.mrna1	508	8.82	57 024.33	42.96	-0.066	叶绿体
<i>Pf1CYP71-37</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_01092_00645080_00646900.mrna1	493	8.50	56 362.27	38.53	-0.187	线粒体
<i>Pf1CYP71-38</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00675_00365931_00368061.mrna1	510	6.72	57 085.33	38.45	-0.064	细胞质
<i>Pf1CYP71-39</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00675_00385811_00387871.mrna1	506	6.45	57 005.06	41.49	-0.093	细胞质
<i>Pf1CYP71-40</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00676_00265486_00268281.mrna1	495	6.21	56 712.24	38.01	-0.048	细胞质
<i>Pf1CYP71-41</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00227_00712137_00714303.mrna1	506	6.69	57 276.89	44.57	-0.025	细胞质
<i>Pf1CYP71-42</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00227_00722538_00726108.mrna1	510	7.15	57 705.93	39.92	-0.140	叶绿体
<i>Pf1CYP71-43</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00640_00400976_00404711.mrna1	502	9.03	57 049.07	33.52	-0.141	线粒体
<i>Pf1CYP71-44</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00815_00156466_00159141.mrna1	502	8.79	57 315.58	41.07	-0.079	细胞膜
<i>Pf1CYP71-45</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00347_02016901_02018493.mrna1	499	6.84	56 053.44	47.57	-0.025	线粒体
<i>Pf1CYP71-46</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_01047_00110664_00112988.mrna1	517	6.59	57 904.18	32.26	-0.042	细胞质
<i>Pf1CYP71-47</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_01046_00108443_00111023.mrna1	498	5.93	56 134.44	46.48	-0.024	叶绿体
<i>Pf1CYP71-48</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_01046_00119077_00121556.mrna1	498	7.53	56 651.14	43.48	-0.060	线粒体
<i>Pf1CYP71-49</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_01045_00168143_00170915.mrna1	506	8.88	57 297.12	31.86	-0.010	细胞膜
<i>Pf1CYP71-50</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_01045_00229505_00231560.mrna1	499	8.72	57 008.58	32.46	-0.110	叶绿体
<i>Pf1CYP71-51</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_01045_00285470_00288308.mrna1	499	7.57	57 191.76	44.64	-0.116	叶绿体
<i>Pf1CYP71-52</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00557_00653329_00655931.mrna1	499	7.66	56 946.99	38.61	-0.103	细胞膜
<i>Pf1CYP71-53</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00557_00940452_00942316.mrna1	497	8.35	56 799.61	42.35	-0.137	细胞膜
<i>Pf1CYP71-54</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_01165_00267858_00269566.mrna1	501	6.08	56 321.20	47.28	0.001	细胞膜
<i>Pf1CYP71-55</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00611_00085492_00088908.mrna1	510	6.50	57 549.54	49.64	-0.105	叶绿体
<i>Pf1CYP71-56</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00611_00123290_00125360.mrna1	506	6.20	57 045.84	47.97	-0.162	叶绿体
<i>Pf1CYP71-57</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00611_00029423_00031938.mrna1	494	6.45	55 618.39	36.70	-0.079	细胞质
<i>Pf1CYP71-58</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00611_00072075_00073835.mrna1	504	6.17	57 232.13	44.29	-0.190	细胞质
<i>Pf1CYP71-59</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00923_00191170_00192782.mrna1	511	5.91	57 669.64	42.70	-0.079	细胞膜
<i>Pf1CYP71-60</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_01118_00216449_00218024.mrna1	493	7.68	55 768.62	40.69	-0.102	细胞膜
<i>Pf1CYP71-61</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_01118_00231118_00232931.mrna1	509	7.20	57 715.77	37.55	-0.079	细胞膜
<i>Pf1CYP71-62</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_05382_00013811_00015953.mrna1	505	8.35	57 640.12	40.44	-0.231	细胞核
<i>Pf1CYP71-63</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_08617_00021406_00024577.mrna1	502	8.73	56 364.37	33.87	-0.081	线粒体
<i>Pf1CYP71-64</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00376_00389164_00390795.mrna1	515	8.64	58 984.00	46.07	-0.159	细胞膜
<i>Pf1CYP71-65</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00496_00336811_00339576.mrna1	500	8.66	56 412.73	48.02	-0.122	线粒体
<i>Pf1CYP71-66</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00543_01144679_01146506.mrna1	492	9.01	55 297.34	53.53	-0.122	线粒体
<i>Pf1CYP71-67</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_00671_00073276_00074958.mrna1	499	8.65	56 610.11	44.15	-0.043	线粒体
<i>Pf1CYP71-68</i>	rna-gnl WGS:SDAM PC99_02078_00246032_00247622.mrna1	493	7.66	56 258.12	45.52	-0.198	线粒体

## 2.2 二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族的系统发育分析

为了解二倍体紫苏和拟南芥 *CYP71* 基因家族进化关系,使用 MEGA-X 软件对二倍体紫苏 68 个和拟南芥 48 个蛋白序列构建 NJ 系统发育树,见图 1。系统发育关系表明二倍体紫苏和拟南芥共 116 个 *CYP71* 基因明显分为 10 个进化支。由于拟南芥

*CYP71* 基因家族主要分为 71A(绿色字体)和 71B(红色字体)2 个亚家族,根据图 1 的系统发育树可以看出二倍体紫苏大致分为 3 部分, I 区与拟南芥 *CYP71A* 聚为一簇,提示可能归属于 *CYP71A* 亚家族, II 区与拟南芥 *CYP71B* 聚为一簇,提示可能归属于 *CYP71B* 亚家族,但是仍然有蓝色分支 III 区的

16个 *Pf1CYP71* 基因不能归属于任何亚家族中,提示可能归属于不同家族的 CYP 基因,包括 *CYP99A1*、*CYP83B1*、*CYP84A1* 等<sup>[21]</sup>。

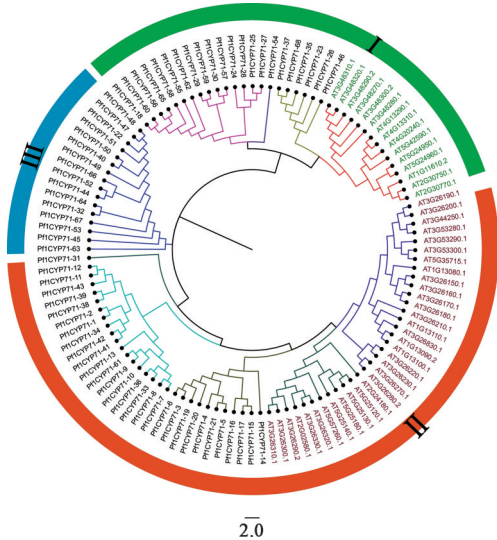


图1 二倍体紫苏(黑色字体)和拟南芥(彩色字体)*CYP71* 基因家族系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *CYP71* gene family of diploid perilla frutescens (black) and *Arabidopsis thaliana* (colored)

**2.3 二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族的基因结构和保守 motif 分析** 基因家族成员在序列上具有保守性和相关性<sup>[22]</sup>,外显子-内含子的基因结构能反应基因进化的特征,并为基因的功能分化提供支持<sup>[23]</sup>。将二倍体紫苏 *CYP71* 家族的基因结构和保守基序及其系统进化树使用 TBtools 软件进行整合可视化作图,见图2。通过 MEME 网站在线分析,预测 68 个二倍体紫苏 *CYP71* 蛋白的保守 motif,获得了 10 个相对保守的 motif,这些保守基序的长度介于 15~50 个氨基酸,经过 NCBI-CDD 数据库注释后发现,除了 motif7 之外,其他均被注释为 CYP450 结构域。根据图 2 观察可以看出 motif 之间的排列具有一定的规律性,在所鉴定的 68 个二倍体紫苏 *CYP71* 基因中均存在 motif7-motif2-motif3-motif8-motif5-motif6-motif4-motif10-motif1-motif9 的相对稳定的结构,但是存在 *Pf1CYP71-29* 基因多了 1 个 motif5, *Pf1CYP71-31* 多了 1 个 motif6, *Pf1CYP71-38* 多了 1 个 motif7, *Pf1CYP71-34* 少了 1 个 motif9, *Pf1CYP71-55* 少了 1 个 motif3 的现象。这些结果表明二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族成员在序列和功能上可能没有显著的差异,但是出现 2~3 个基因出现保守基序缺失或增加的现象,说明基因家族在进化过程中可能存在结构特征差异。

为了进一步分析二倍体紫苏 *CYP71* 基因之间

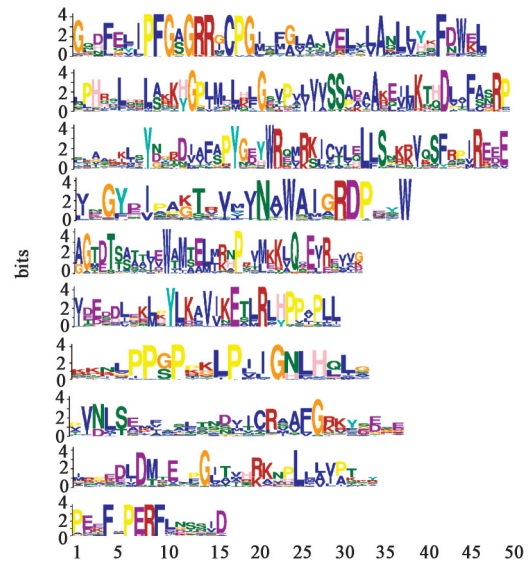


图2 二倍体紫苏 *CYP71* 蛋白的 10 个保守 motif

Fig. 2 Ten conserved motifs of *CYP71* proteins in diploid perilla frutescens

的进化关系,构建了二倍体紫苏 *CYP71* 的基因结构图,见图3。结构显示,二倍体紫苏 *CYP71* 家族绝大部分成员只有一个内含子且长短不一,只有 *Pf1CYP71-61* 有 2 个较短的内含子,而 *Pf1CYP71-31*、*Pf1CYP71-17*、*Pf1CYP71-8*、*Pf1CYP71-9*、*Pf1CYP71-42*、*Pf1CYP71-43*、*Pf1CYP71-55* 这些基因具有较长的内含子,除了 *Pf1CYP71-8* 含有最长的内含子之外,其他 6 个基因的内含子长度相同,而同一进化支上的基因结构也比较相似,比如 *Pf1CYP71-3*、*Pf1CYP71-6*、*Pf1CYP71-19*、*Pf1CYP71-20*、*Pf1CYP71-16*、*Pf1CYP71-15* 均含有 2 个外显子和 1 个内含子。

**2.4 二倍体紫苏 *CYP71* 基因的 KEGG 和 GO 富集分析** 利用 EGGNOG-mapper 网站进行功能注释并通过 TBtools 软件进行富集分析和可视化作图,见增强出版附加材料。结果显示 68 个二倍体紫苏 *CYP71* 基因 KEGG 共富集到 11 个通路,包括 CYP450 酶、硫代葡萄糖苷生物合成、其他次级代谢物的生物合成、色氨酸代谢、倍半萜类和三萜类生物合成、异黄酮生物合成、Brite 层次结构、萜类化合物和聚酮类化合物的代谢、氨基酸代谢等,其中富集到 CYP450 酶、蛋白家族代谢及 Brite 层次结构的基因最多各有 36 个,而富集到氨基酸代谢的基因最少只有 6 个。在通过 TBtools 对 GO 富集分析结果进行可视化作图时,68 个 *CYP71* 基因共注释到 114 个类别(GO Terms),其中包含 5 项分子功能、11 项细胞组分及 98 项生物过程,设置显示 *P* 值(即显著性,

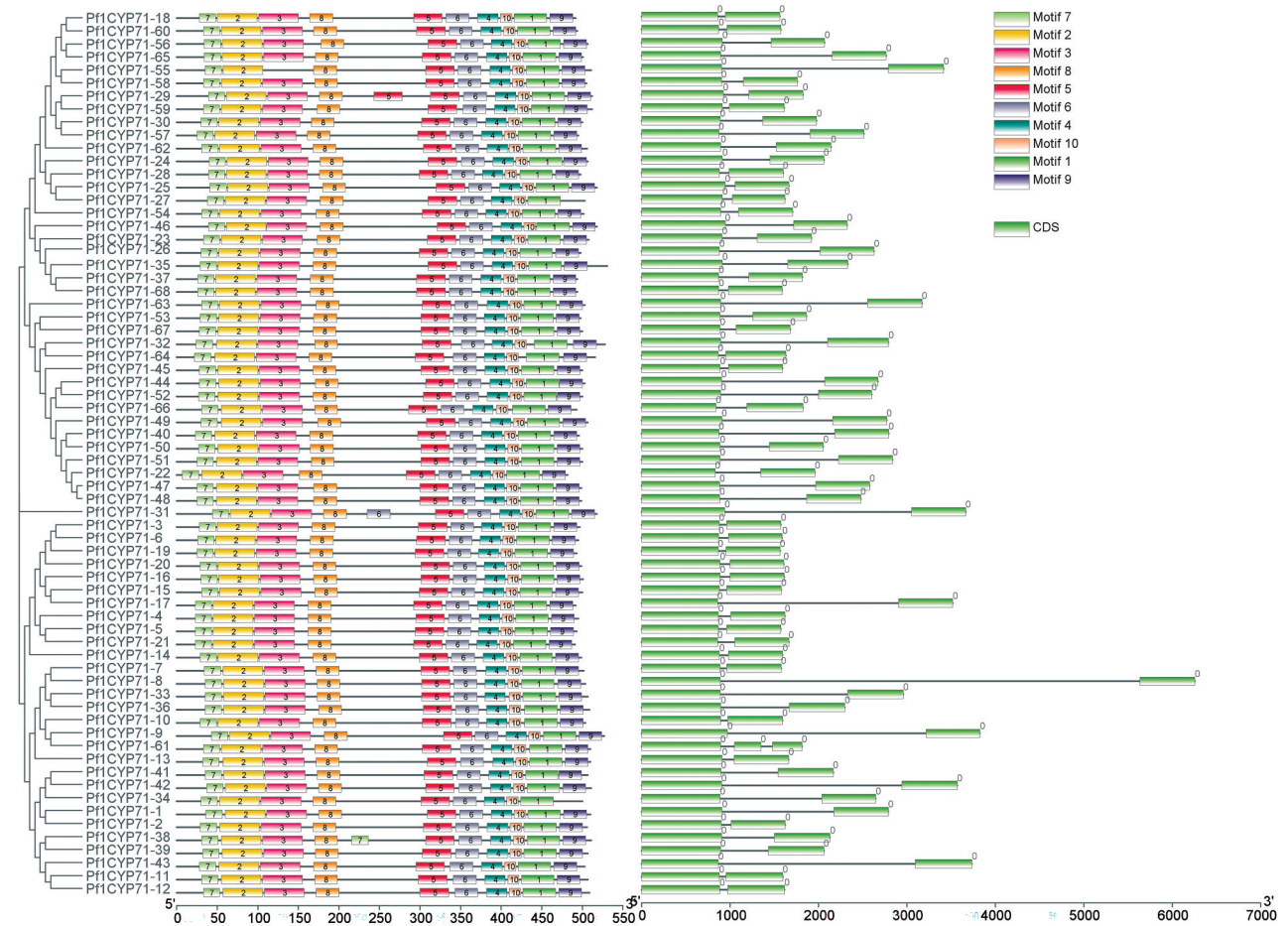


图3 二倍体紫苏 *CYP71* 家族基因结构和 motif 分析  
Fig. 3 Gene structure and motif analysis of *CYP71* family in diploid *perilla frutescens*

$$P=1-\sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$
,  $N$  为所有 Unigene 中具有 GO 注释的基因数目,  $n$  为  $N$  中差异表达基因的数目,  $M$  为所有 Unigene 中注释为某特定 GO Term 的基因数目,  $m$  为注释为某特定 GO Term 的差异表达基因数目, 通常以  $P_{\text{value}} \leq 0.05$  为阈值, 满足此条件的 GO Term 即为差异表达基因中显著富集的 GO Term) 最低的 10 个 GO Terms, 得到结果如下, 共注释到 2 条功能, 分别是分子功能 (Molecular function) 和生物过程 (Biological process)。分子功能主要包括氧化还原酶活性 (oxidoreductase activity), 作用于配对供体掺入或还原分子氧 (acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen), NAD(P)H 作为一供体, 掺入一个氧原子 [NAD(P)H as one donor, and incorporation of one atom of oxygen], 及单加氧酶活性 (monooxygenase activity)。生物过程主要包括吲哚硫代葡萄糖苷生物合成过程 (indole glucosinolate biosynthetic process), 硫代葡萄糖苷生物合成过程

(glucosinolate biosynthetic process), 糖苷酸生物合成过程 (glycosinolate biosynthetic process), 次级代谢过程 (secondary metabolic process), 氧化还原过程 (obsolete oxidation-reduction process) 及细胞壁增厚的防御反应 (defense response by cell wall thickening) 其中富集到次级代谢过程的基因最多, 有 35 个, 富集到 4 个分子功能和氧化还原过程的基因各有 29 个, 而富集到剩下的 4 个生物过程基因最少, 各有 9 个。

**2.5 二倍体紫苏 *CYP71* 家族成员的染色体定位和共线性分析** 二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族 68 个基因不均匀的分布在 34 条染色体上, 见图 4。从图中可以看出, 二倍体紫苏 *CYP71* 基因的数量和染色体的长度之间没有必然的联系, 每条染色体上排列的基因数目差别较大, 大部分染色体上只含有 1~2 个基因, SDAM0200001.1、SDAM02000072.1 和 SDAM02002215.1 三条染色体上的 *CYP71* 基因数目最多, 均含有 6 个基因, 且这 3 条染色体上均出现基因成簇排列的现象, 比如 SDAM02000072.1 染色体

上的 *PfICYP71-23*、*PfICYP71-24*、*PfICYP71-25*、*PfICYP71-26*、*PfICYP71-27*、*PfICYP71-28* 就聚为一簇。此外在同一条染色体上出现了多基因串联重复现象，例如 SDAM02000001.1 染色体上的

*PfICYP71-4*、*PfICYP71-5*、*PfICYP71-6* 基因，SDAM02000779.1 染色体上的 *PfICYP71-38*、*PfICYP71-39* 基因，SDAM02005225.1 染色体上的 *PfICYP71-60*、*PfICYP71-61* 基因等。

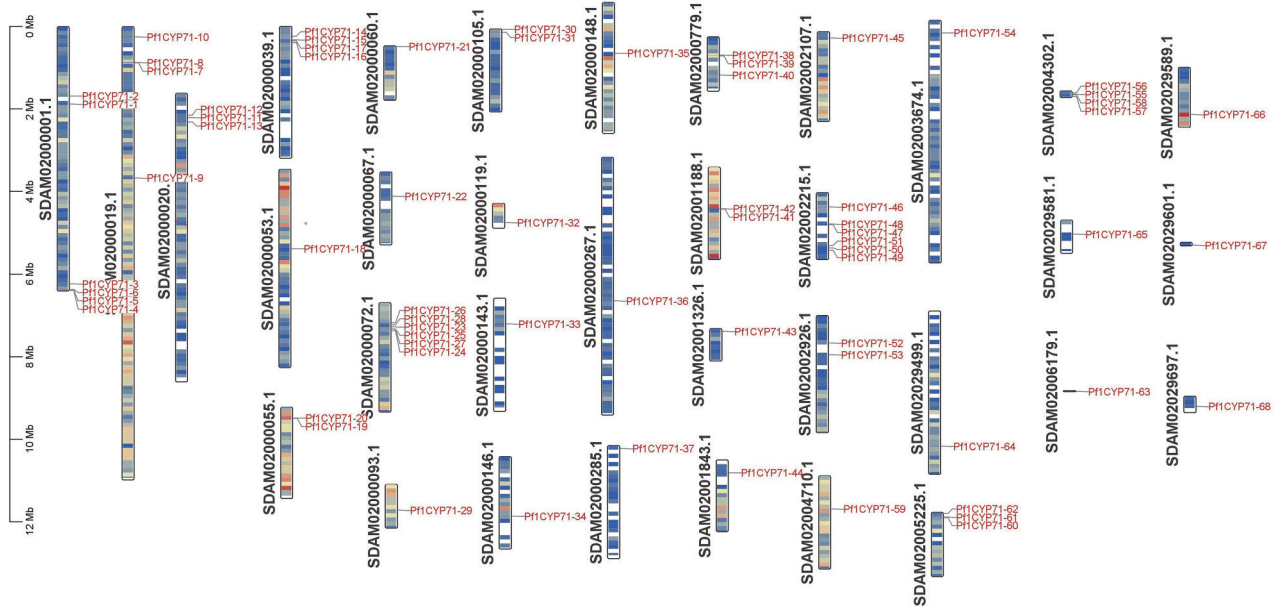


图4 二倍体紫苏 *CYP71* 家族成员的染色体定位

Fig. 4 Chromosome location of *CYP71* family members of diploid *perilla frutescens*

为了进一步研究二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族的系统发育机制,探究二倍体紫苏和拟南芥 *CYP71* 基因家族成员的共线性关系,构建了二者的同源比较图谱,并通过 TBtools 软件进行了可视化分析,结

果显示有 2 个二倍体紫苏 *CYP71* 基因与拟南芥之间存在共线性关系,即二倍体紫苏和拟南芥间共有两对同源基因,分别为 *PfICYP71-26/At-3* 和 *PfICYP71-52/At-4*。见图 5。

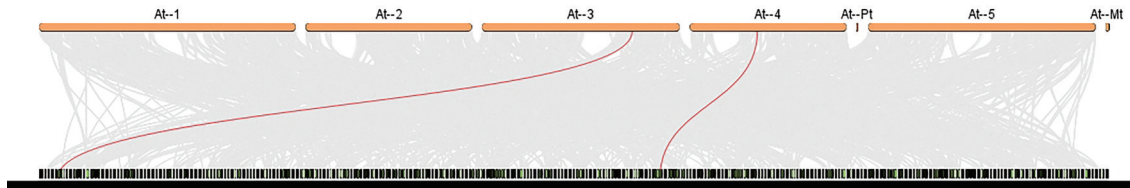


图5 二倍体紫苏(下)和拟南芥(上)的共线性分析

Fig. 5 Collinearity analysis of diploid *perilla frutescens* (bottom) and *Arabidopsis thaliana* (top)

**2.6 二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族顺式作用元件预测** 选取二倍体紫苏 *CYP71* 基因上游 2 kb 的序列进行 *CYP71* 基因家族成员顺式作用元件的预测,顺式作用元件能够调控基因表达,进而反映出基因功能。二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族成员的顺式作用元件预测结果显示,共预测到 21 类顺式作用元件,包括创伤响应元件、光响应元件、脱落酸响应元件、赤霉素响应元件、茉莉酸甲酯响应元件、水杨酸响应元件、厌氧诱导元件、玉米醇溶蛋白代谢调控元件、抗病和胁迫响应元件、干旱诱导元件、昼夜节律调控、分生组织表达、生长素反应性、类黄酮生物合

成基因调控元件、低温响应元件、缺氧特异性诱导响应元件、细胞周期调控、胚乳表达、种子特异性调节等,其中参与光响应和茉莉酸甲酯响应的顺式作用元件最多,分别为 201 和 212 个,在所有的二倍体紫苏 *CYP71* 基因中均有涉及。其次预测到的厌氧诱导元件有 96 个,脱落酸响应元件有 156 个,低温响应元件有 54 个,而预测到的创伤响应元件、种子特异性调节元件、类黄酮生物合成基因调控元件、细胞周期调控元件及缺氧特异性响应元件数目最少,分别为 7、6、9、3、5 个。这些说明了 *CYP71* 基因家族不同成员不仅能广泛的参与二倍体紫苏的生

长发育过程包括激素代谢、生长调控、信号转导等,而且还能响应生物与非生物胁迫,比如低温响应、抗病和胁迫响应、干旱诱导、缺氧特异性诱导等。见增强出版附加材料。

**2.7 二倍体紫苏 *CYP71* 基因互作网络分析** 根据二倍体紫苏和拟南芥 *CYP71* 基因家族的共线性分析得到了二者的同源序列,分别是 Pf1CYP71-26 和 Pf1CYP71-52,将这 2 个基因的蛋白序列提交到 STRING 网站进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络预测,物种选择拟南芥(*Arabidopsis thaliana*),结果显示和二倍体紫苏 *Pf1CYP71-26* 和 *Pf1CYP71-52* 两个基因的蛋白序列相似度最高的是 CYP71A26 和 CYP71B34,使用 Cytoscape 软件进行优化和可视化,见增强出版附加材料,形状大小代表互作强度的强弱,故从图中可以看出与 CYP71A26 蛋白互作强度较高的是 CYP51G1、SQS1、BAS、ERG28 及 LUP2 蛋白,这些蛋白基本上是萜类化合物家族蛋白<sup>[24]</sup>、萜烯环化酶<sup>[25]</sup>或者是参与甾醇生物合成的关键酶<sup>[26]</sup>。而与 CYP71B34 蛋白互作强度较高的是 PUM6、MSL6、FLA17 及 VEP1,这些蛋白能够与 NAD(P)H 结合<sup>[27]</sup>、参与细胞表面黏附<sup>[28]</sup>、调节 mRNA 稳定性<sup>[29]</sup>和翻译及作为通道压力响应蛋白<sup>[30]</sup>。

### 3 讨论

本研究从二倍体紫苏 PC99 全基因组中鉴定出了 68 个 *CYP71* 基因,这些基因不均匀的分布在二倍体紫苏 34 条染色体上,出现了基因成簇排列和多基因串联重复的现象,这些可能是基因复制<sup>[31]</sup>导致的。这些基因编码的氨基酸长度在 481~530 aa,等电点、总平均亲水性及不稳定系数等理化性质存在差异,亚细胞定位预测显示这些基因表达的蛋白在细胞核、细胞膜、细胞质、叶绿体及线粒体中不均匀的分布,其中只有 Pf1CYP71-62 蛋白的亚细胞定位预测在细胞核,这些表明 *CYP71* 基因家族可能更多的参与二倍体紫苏次生代谢产物的调控中,极少的参与二倍体紫苏的遗传表达,这也与 CYP450 酶在植物中通常与内质网、线粒体、质体等细胞器等膜性细胞器结合在一起,参与多种次生代谢产物等的生物合成相符合。

系统发育分析表明,根据拟南芥 *CYP71* 基因家族可以将二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族划分成 *CYP71A*、*CYP71B* 两个亚家族,并且包含一些归属于不同家族的 CYP 基因。基因结构和保守基序分析表明同一分支的成员具有较高的保守性,二倍体

紫苏 *CYP71* 基因家族成员几乎都含有 2~3 个外显子和 1~2 个长短不一的内含子,而且都含有规律排列的 10 个保守基序,只有 5 个基因存在保守基序增加或缺失的现象,这可能是基因家族在进化过程中结构发生了改变。顺式作用元件分析表明,二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族存在多种功能的顺式作用元件,其中参与光响应、创伤响应、分生组织表达、昼夜节律调控、细胞周期调控、胚乳表达、种子特异性调节及玉米醇溶蛋白代谢调控的顺式元件说明 *CYP71* 基因家族广泛参与二倍体紫苏的生长发育过程,在二倍体紫苏的种子萌发和茎的发育过程占据重要作用,其中的赤霉素、脱落酸、水杨酸及茉莉酸甲酯响应元件说明 *CYP71* 基因家族也参与二倍体紫苏植物激素的调控,表明这些激素可能在二倍体紫苏的生长及代谢调控中发挥重要作用,剩下的厌氧诱导、干旱诱导、抗病和胁迫响应及低温响应、类黄酮生物合成基因调控顺式作用元件说明二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族成员在应对生物或者非生物胁迫方面的作用不可忽视。

根据二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族的 KEGG 通路富集分析和 GO 功能富集分析可以得出,*CYP71* 基因主要参与萜类化合物包括倍半萜类和三萜类化合物及异黄酮类化合物的生物合成、氨基酸代谢过程及其他次级代谢物的生物合成过程中,主要功能包括具有氧化还原酶活性或者单加氧酶活性、作为配对供体提供或者掺入分子氧等。根据二倍体紫苏和拟南芥共线性分析得到的两个同源蛋白序列进行 PPI 网络分析表明二倍体紫苏 *CYP71* 基因家族蛋白与萜类化合物家族蛋白、萜烯环化酶或者是参与甾醇生物合成的关键酶密不可分,并且有一部分蛋白能够参与到与 NAD(P)H 结合或者调节 mRNA 稳定性等,这些都进一步说明研究 *CYP71* 基因家族对紫苏单萜类化合物的生物合成具有至关重要的作用。

基于已发表的药用植物基因组,通过对植物不同时期或者不同药用部位进行转录组、蛋白质组及代谢组等多组学分析,从而挖掘出调控药用植物有效成分如萜类物质的关键基因,并对其关键基因进行解析和功能研究,对研究药用植物有效成分的生物合成途径和提高药用植物资源利用率促进其开发至关重要。SONG 等<sup>[32]</sup>通过对菊花进行基因组学研究,初步鉴定出了菊花中参与类黄酮和萜类生物合成的基因;JIANG 等<sup>[33]</sup>通过分析不同品种紫苏叶片的转录组和代谢组学数据,共鉴定出编码 15 种

酶的77个类黄酮生物合成的候选基因。但是目前紫苏挥发油的合成调控机制和关键基因仍然没有得到很好的鉴定和解析,所以研究紫苏二倍体CYP71基因家族对于开展接下来的紫苏多组学分析并进一步挖掘其关键基因具有重要的意义。

综上所述,本研究基于二倍体紫苏PC99的全基因组数据,筛选、比对、鉴定到了68个CYP71基因,在对这68个CYP71基因进行命名的基础上,开展了全面的生物信息学分析,包括基因家族的理化性质、系统发育关系、基因结构、保守结构域、染色体定位、共线性分析及KEGG、GO富集分析和蛋白互作网络预测、顺式作用元件预测等,为初步了解二倍体紫苏CYP71基因家族的基因结构、功能分类及蛋白质作用奠定了基础,并为进一步结合转录组、代谢组学技术研究紫苏中单萜类化合物的生物合成途径和定向培育优良紫苏品种提供数据支持。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 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,2020:354.

[2] 古建兰,任久强,韦雪娇,等. 紫苏不同器官活性成分分布及功能性分析研究进展[J]. 北方农业学报, 2021,49(5):118-126.

[3] AHMED H M. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological investigations of *Perilla frutescens* (L.) Britt[J]. Molecules, 2019,24:102.

[4] DHYANI A, CHOPRA R, GARG M. A review on nutritional value, functional properties and pharmacological application of *Perilla* (*Perilla Frutescens* L.) [J]. Biomed Pharmacol J, 2019, 12(2):649-660.

[5] 闫钰,易红,张东,等. 基于HPLC多成分含量测定的紫苏叶质量标准探讨[J]. 中国中药杂志, 2021,46(16):4051-4060.

[6] 赵奕栋,孙文豪,陈天源,等. 紫苏叶有效成分药理作用研究进展[J]. 江苏中医药, 2022,54(8):79-82.

[7] XU L, LI Y, FU Q, et al. Perillaldehyde attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury-triggered overexpression of inflammatory cytokines via modulating Akt/JNK pathway in the rat brain cortex [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 454(1): 65-70.

[8] HOU T, NETALA V R, ZHANG H, et al. *Perilla frutescens*: A rich source of pharmacological active compounds[J]. Molecules, 2022,27(11):3578.

[9] GUERRY-FORCE M L, COGGESHALL J, SNAPPER

J, et al. Morphology of noncardiogenic pulmonary edema induced by *Perilla ketone* in sheep [J]. Am J Pathol, 1988,133(2):285-297.

[10] WILSON B J, GARST J E, LINNABARY R D, et al. *Perilla ketone*: A potent lung toxin from the mint plant, *Perilla frutescens* Britton [J]. Science, 1977, 197(4303):573-574.

[11] YUBA A, HONDA G, KOEZUKA Y, et al. Genetic analysis of essential oil variants in *Perilla frutescens* [J]. Biochem Genet, 1995,33(9/10):341-348.

[12] FUJIWARA Y, ITO M. Molecular cloning and characterization of a *Perilla frutescens* cytochrome P450 enzyme that catalyzes the later steps of perillaldehyde biosynthesis [J]. Phytochemistry, 2017, 134:26-37.

[13] LUPIEN S, KARP F, WILDUNG M, et al. Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha*) species: cDNA isolation, characterization, and functional expression of ( - )-4S-limonene-3-hydroxylase and ( - )-4S-limonene-6-hydroxylase [J]. Arch Biochem Biophys, 1999,368(1):181-192.

[14] COLLU G, UNVER N, PELTENBURG-LOOMAN A M, et al. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis [J]. FEBS Lett, 2001,508(2):215-220.

[15] WERCK-REICHHART D, FEYEREISEN R. Cytochromes P450: A success story [J]. Genome Biol, 2000,1(6):1-9

[16] WEITZEL C, SIMONSEN H T. Cytochrome P450-enzymes involved in the biosynthesis of mono- and sesquiterpenes [J]. Phytochem Rev, 2015,14(1):7-24.

[17] HALLAHAN D L, NUGENT J H, HALLAHAN B J, et al. Interactions of Avocado [*Persea americana*] cytochrome P-450 with monoterpenoids [J]. Plant Physiol, 1992,98(4):1290-1297.

[18] KIMURA M, ITO M. Bioconversion of essential oil components of *Perilla frutescens* by *saccharomyces cerevisiae* [J]. J Nat Med, 2020,74(1):189-199.

[19] ZHANG Y, SHEN Q, LENG L, et al. Incipient diploidization of the medicinal plant *Perilla* within 10,000 years [J]. Nat Commun, 2021,12(1):5508.

[20] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Mol Plant, 2020,13(8):1194-1202.

[21] LU S, WANG J, CHITSAZ F, et al. CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020 [J]. Nucleic

- Acids Res, 2020, 48(D1): D265-D268.
- [22] 万志庭, 鲁梦, 吴沙沙, 等. 中药火麻仁基原植物大麻 MIKC 型 MADS-box 基因家族鉴定与表达分析[J]. 药学学报, 2021, 56(11): 3173-3183.
- [23] 怀浩, 董林林, 宁康, 等. 中药火麻仁基原植物 Hsp20 基因家族鉴定及表达分析[J]. 药学学报, 2022, 57(4): 1203-1215.
- [24] HUSSELSTEIN-MULLER T, SCHALLER H, BENVENISTE P. Molecular cloning and expression in yeast of 2, 3-oxidosqualene-triterpenoid cyclases from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 2001, 45(1): 75-92.
- [25] MORITA M, SHIBUYA M, KUSHIRO T, et al. Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea [*Pisum sativum* new alpha-amyrin-producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase] [J]. Eur J Biochem, 2000, 267(12): 3453-3460.
- [26] MIALOUNDAMA A S, JADID N, BRUNEL J, et al. *Arabidopsis* ERG28 tethers the sterol C4-demethylation complex to prevent accumulation of a biosynthetic intermediate that interferes with polar auxin transport [J]. Plant Cell, 2013, 25(12): 4879-4893.
- [27] HERL V, FISCHER G, REVA V A, et al. The VEP1 gene (At4g24220) encodes a short-chain dehydrogenase/reductase with 3-oxo-delta4, 5-steroid 5beta-reductase activity in *Arabidopsis thaliana* L [J]. Biochimie, 2009, 91(4): 517-525.
- [28] JOHNSON K L, JONES B J, BACIC A, et al. The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis* A multigene family of putative cell adhesion molecules [J]. Plant Physiol, 2003, 133(4): 1911-1925.
- [29] WANG M, OGE L, PEREZ-GARCIA M D, et al. The PUF protein family: Overview on PUF RNA targets, biological functions, and post transcriptional regulation [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 410.
- [30] PIVETTI C D, YEN M R, MILLER S, et al. Two families of mechanosensitive channel proteins [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67(1): 66-85.
- [31] JEFFARES D C, PENKETT C J, BAHLER J. Rapidly regulated genes are intron poor [J]. Trends Genet, 2008, 24: 375-378.
- [32] SONG C, LIU Y, SONG A, et al. The chrysanthemum nankingense genome provides insights into the evolution and diversification of chrysanthemum flowers and medicinal traits [J]. Mol Plant, 2018, 11(12): 1482-1491.
- [33] JIANG T, GUO K, LIU L, et al. Integrated transcriptomic and metabolomic data reveal the flavonoid biosynthesis metabolic pathway in *Perilla frutescens* (L.) leaves [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 16207.
- [责任编辑 顾雪竹]