

分类号: Q819
学号: 20222006044

密级: 公开
单位代码: 10759

石河子大学 硕士学位论文



甘草细胞色素 P450 (CYP450) 影响药用活性成分合成的功能分析

学位申请人	马红霞
指导教师	李鸿彬 沈海涛
申请学位门类级别	理学硕士
学科、专业名称	生物学
研究方向	生物化学与分子生物学
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子

2025年6月

分类号: Q819
学 号: 20222006044

密 级: 公开
单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



甘草细胞色素 P450 (CYP450) 影响药用活性成分合成的功能分析

学 位 申 请 人	马红霞
指 导 教 师	李鸿彬 沈海涛
申请学位门类级别	理学硕士
学 科、专 业 名 称	生物学
研 究 方 向	生物化学与分子生物学
所 在 学 院	生命科学学院

中国·新疆·石河子

2025 年 6 月

**Functional Analysis of *Glycyrrhiza uralensis* Cytochrome P450
(CYP450) Affecting the Synthesis of Medicinal Active Ingredients**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Nature Science

By

(Biochemistry and Molecular Biology)

Dissertation Supervisor: Prof. Li Hong-bin

Associate Prof. Shen Hai-tao

June, 2025

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：马红霞 时间：2025年5月23日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：马红霞 时间：2025年5月23日

导师签名：李刚 时间：2025年5月23日

摘要

【目的】

乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 是豆科甘草属植物, 在医药、食品等领域广泛应用。甘草酸和黄酮类化合物是甘草中的主要活性成分, 也是衡量甘草药用品质的关键指标。栽培甘草是市场供应的主体, 提升栽培甘草中甘草酸及黄酮类活性成分的含量, 是促进甘草种植业发展, 提升甘草种植效益, 降低加工企业的生产成本的重要途径。CYP450 超家族中的 CYP72A 和 CYP88D 是参与甘草酸下游合成途径的两个关键亚家族; 甘草酸与脱落酸 (ABA)、细胞分裂素 (CKs)、赤霉素 (GA) 等植物激素的合成均在 MVA 和 MEP 途径, 其下游的 CYP72A 和 CYP88D 两个基因家族在合成甘草酸的同时对甘草中的内源激素合成可能也有一定的影响。本研究通过转录组分析, 在 CYP72A 和 CYP88D 亚家族中筛选了 3 个与甘草酸合成相关的 *GuCYP450* 基因, 并利用甘草遗传转化体系, 验证其在乌拉尔甘草中的功能。了解 3 个 *GuCYP450* 基因的表达对甘草药用活性成分、内源激素合成以及甘草农艺性状的影响, 初步解析其在甘草中的功能, 为揭示甘草活性成分合成及调控网络提供研究基础, 也为下一步培育优质甘草种质提供候选基因。

【方法】

利用生物信息学方法对乌拉尔甘草 CYP72A 和 CYP88D 两个亚家族进行分析, 并通过转录组分析其在不同组织和非生物胁迫条件下的表达水平, 筛选上述基因家族参与甘草酸合成的候选基因, 利用 qRT-PCR 方法进行验证。构建候选基因的过表达载体, 利用乌拉尔甘草遗传转化体系, 将其转化乌拉尔甘草, 获得转基因甘草植株。利用超高液相色谱/串联质谱 (UPLC-MS/MS) 技术测定转基因甘草地部分活性成分和内源激素含量, 并结合转基因甘草地部分转录组数据, 分析候选基因过表达对活性成分、内源激素合成和积累的影响。

【结果】

(1) CYP88D 与 CYP72A 亚家族成员表达模式分析及关键基因筛选

基于乌拉尔甘草全基因组数据, 对 CYP88D 与 CYP72A 亚家族成员进行鉴定和生物信息学分析, 在乌拉尔甘草中共鉴定出 9 个 CYP72A 基因和 3 个 CYP88D 基因。药用成分甘草酸的积累主要在甘草根部, 基于 9 个 CYP72A 基因和 3 个 CYP88D 基因表达特性, 筛选出了 3 个在乌拉尔甘草根部特异性表达且在非生物胁迫后地下部分表达显著上调的 *GuCYP450* 基因 (*GuCYP72A154*、*GuCYP88D6*、*GuCYP72A566*)。

(2) 过表达 *GuCYP450* 基因对乌拉尔甘草地部分活性成分及内源激素的影响分析

为进一步验证 3 个 *GuCYP450* 基因的功能, 利用乌拉尔甘草遗传转化体系, 在乌拉尔甘草中过表达 *GuCYP72A154*、*GuCYP88D6*、*GuCYP72A566* 基因, 并对转基因植株中活性成分含量、内源激素及农艺性状进行分析。3 个 *GuCYP450* 基因的过表达会显著提升转基因乌拉尔甘草地部分生物量、分根数和根瘤数量, 并且促进转基因甘草地部分甘草酸和黄酮类化合物 (甘草苷、异甘草素、查尔酮 A) 含量的积累; 且转基因甘草地部分水杨酸 (SA) 和脱落酸含量也均高于野生型, 其中

ABA 含量上升最为显著。表明, *GuCYP72A154*、*GuCYP88D6*、*GuCYP72A566* 基因不仅参与甘草药用成分的合成, 也对 SA 和 ABA 的合成具有重要影响。

(3) 转录组测序分析 *GuCYP450* 基因对乌拉尔甘草活性成分影响的分子机理研究

转录组测序分析 3 个过表达 *GuCYP450* 基因对乌拉尔甘草地下部分基因表达水平的影响, 发现地下部分上调基因数目显著高于下调基因, 上调差异基因 KEGG 富集度高的通路包括倍半萜和三萜生物合成、萜类骨架生物合成、苯丙烷生物合成、黄酮类生物合成和异黄酮生物合成。植物激素信号转导、MPKA 信号通路和植物-病原体互作也在上调基因中显著富集。转基因甘草中, 甘草酸、黄酮类和植物激素 (SA、ABA) 的合成途径以及激素信号转导途径 (SA、ABA、IAA、JA 信号转导途径) 相关基因的表达显著上调, 这与结果 (2) 中转基因甘草活性成分和激素含量变化一致。通过 WGCNA 分析, 筛选了 7 个核心转录因子, 其中 MYB44、bHLH13、bHLH162、ERF、DREB 与激素信号转导和黄酮类生物合成相关, 并且发现 3 个 *GuCYP450* 启动子中存与这些转录因子相结合的顺式作用元件。因此, 推测这些转录因子的表达可能会参与调控甘草黄酮类生物的合成。

【结论】

GuCYP72A154、*GuCYP88D6* 和 *GuCYP72A566* 是甘草酸合成的关键基因, 这 3 个基因的表达对甘草酸含量有显著的促进作用; 并且, 3 个 *GuCYP450* 基因的表达也会影响激素合成及其信号转导途径相关基因的表达, 从而促进黄酮类化合物合成。其中, 转录因子 MYB44、bHLH13、bHLH162、ERF、DREB 在这个过程中可能发挥关键作用, 调控黄酮类生物合成途径中关键基因的表达, 促进药用活性成分的积累; 这为下一步甘草分子育种和培育优质甘草种质资源提供了理论基础。

关键词: 乌拉尔甘草; 细胞色素 P450; 转录组; 活性成分

Abstract

Objective:

Glycyrrhiza uralensis Fisch. is a genus of licorice in the family Leguminosae, which is widely used in pharmaceutical, food and other fields. Glycyrrhizic acid and flavonoids are the main active components in licorice, and they are also the key indicators of licorice medicinal quality. Cultivated licorice is the main body of market supply and enhancing the content of glycyrrhetic acid and flavonoid active ingredients in cultivated licorice is an important way to promote the development of licorice cultivation, enhance the benefits of licorice cultivation, and reduce the production cost of processing enterprises. CYP72A and CYP88D in the CYP450 superfamily are two key subfamilies involved in the downstream synthesis pathway of glycyrrhetic acid; glycyrrhetic acid is associated with abscisic acid (ABA), Cytokinins (CKs), gibberellins (GA) and other phytohormones are synthesized in MVA and MEP pathways, and its downstream CYP72A and CYP88D gene families may synthesize glycyrrhetic acid while the endogenous hormone synthesis in *Glycyrrhiza uralensis* may also have some effects. In this study, we screened 3 *GuCYP450* genes related to glycyrrhizic acid synthesis in the CYP72A and CYP88D subfamilies by transcriptome analysis. By genetic transformation method, their functions were verified in *G. uralensis*. We analyzed the effects of the expression of the 3 *GuCYP450* genes on the medicinal active components, the synthesis of endogenous hormones, and the agronomic traits of *G. uralensis*, and preliminarily resolved their functions in licorice, to provide a research basis for revealing the synthesis of licorice active ingredients and its regulatory network, and also to provide candidate genes for the next step of cultivating high-quality licorice germplasm.

Methods:

The two subfamilies of CYP72A and CYP88D in *G. uralensis* were analyzed by bioinformatics methods, and their expression levels in different tissues and abiotic stress conditions were analyzed by transcriptome, and the candidate genes involved in glycyrrhetic acid synthesis of the above gene families were screened and verified by qRT-PCR methods. The overexpression vectors of the candidate genes were constructed and transformed into *G. uralensis* using the *G. uralensis* genetic transformation system to obtain transgenic *G. uralensis* plants. The contents of active ingredients and endogenous hormones in the underground parts of transgenic *G. uralensis* were determined using ultra-high liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), and the effects of overexpression of candidate genes on the synthesis and accumulation of active ingredients and endogenous hormones were analyzed in conjunction with the data of the transcriptome of the underground parts of transgenic *G. uralensis*.

Results:

(1) Analysis of the expression patterns of CYP88D and CYP72A subfamily members and screening of key genes.

Based on the the whole genome data of *G. uralensis* and bioinformatics analysis of CYP88D and CYP72A subfamily members, a total of 9 CYP72A genes and 3 CYP88D genes were identified in *G. uralensis*. The accumulation of the medicinal component glycyrrhizic acid is mainly in the roots of licorice. Based on the expression characteristics of the 9 CYP72A genes and 3 CYP88D genes, 3 *GuCYP450* (*GuCYP72A154*, *GuCYP88D6*, *GuCYP72A566*) genes were screened for their expression in *G. uralensis* roots specifically, and the expression of them in the underground portion of the plant was significantly up-regulated after abiotic stresses.

(2) Analysis of the effect of overexpression of *GuCYP450* gene on the active components and endogenous hormones in the underground parts of *G. uralensis*.

To further validate the functions of the 3 *GuCYP450* genes, we overexpressed *GuCYP72A154*, *GuCYP88D6*, and *GuCYP72A566* genes in *G. uralensis* using the genetic transformation system of *G. uralensis* and analyzed the contents of the active ingredients, endogenous hormones, and agronomic traits in the transgenic plants. Overexpression of the 3 *GuCYP450* genes significantly enhanced the biomass, root division and rhizoma number of the underground parts of transgenic *G. uralensis*, and promoted the accumulation of glycyrrhetic acid and flavonoid (liquiritin, isoliquiritigenin, chalcone A) contents in the underground parts of transgenic *G. uralensis*; and the salicylic acid (SA) and abscisic acid contents of the underground parts of transgenic *G. uralensis* were higher than those of the wild type, with the most significant increase in the content of ABA. This indicates that the *GuCYP72A154*, *GuCYP88D6* and *GuCYP72A566* genes are not only involved in the synthesis of medicinal components of *G. uralensis*, but also have an important influence on the synthesis of SA and ABA.

(3) Transcriptome sequencing analysis of the molecular mechanism of the effect of *GuCYP450* gene on the active components of *G. uralensis*.

Transcriptome sequencing analysis of the effects of overexpression of the 3 *GuCYP450* genes on the expression levels of the genes in the underground part of *G. uralensis*. The number of up-regulated genes was found to be significantly higher than that of down-regulation in the underground part, and the pathways with high KEGG enrichment of the up-regulated differential genes included sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis, terpenoid backbone biosynthesis, phenylpropanoid biosynthesis, flavonoid biosynthesis, and isoflavonoid biosynthesis. Phytohormone signaling, MPKA signaling pathway, and plant-pathogen interactions were also significantly enriched in up-regulated genes. The expression of genes related to synthesis pathways of glycyrrhetic acid, flavonoids and phytohormones (SA, ABA) as well as hormone signaling pathways (SA, ABA, IAA, JA signaling pathways) were significantly up-regulated in

the transgenic *G. uralensis*, which was in accord with the changes in the active components and hormone contents of the transgenic *G. uralensis* in result (2). By WGCNA analysis, 7 core transcription factors were screened, among which MYB44, bHLH13, bHLH162, ERF, and DREB were associated with hormone signaling and flavonoid biosynthesis, and cis-acting elements were found to be present in the promoter of the 3 *GuCYP450* that bind to these transcription factors. Therefore, it is hypothesized that the expression of these transcription factors may be involved in the regulation of flavonoid biosynthesis in *G. uralensis*.

Conclusion:

GuCYP72A154, *GuCYP88D6* and *GuCYP72A566* are the key genes for glycyrrhetic acid synthesis, and the expression of these 3 genes significantly promoted glycyrrhetic acid content; moreover, the expression of the three *GuCYP450* genes also affects the expression of the genes related to the hormone synthesis and its signaling pathway, which in turn promotes flavonoid synthesis. Among them, the transcription factors MYB44, bHLH13, bHLH162, ERF, and DREB may play key roles in this process, regulating the expression of key genes in the flavonoid biosynthesis pathway and promoting the accumulation of medicinal active ingredients; This provides a theoretical basis for the next step of *G. uralensis* molecular breeding and cultivation of high-quality *G. uralensis* germplasm resources.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch; Cytochrome P450; Transcriptome; Active Ingredients

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
中英文缩写对照表.....	IX
引言.....	1
第 1 章 文献综述.....	2
1.1 甘草的概述.....	2
1.2 甘草药用活性成分研究进展.....	2
1.2.1 甘草酸生物合成途径研究进展.....	2
1.2.2 甘草黄酮类生物合成途径研究进展.....	4
1.3 细胞色素 P450 酶概述.....	5
1.4 细胞色素 P450 生物学功能研究进展.....	6
1.4.1 细胞色素 P450 参与三萜化合物的合成.....	6
1.4.2 细胞色素 P450 参与植物生长发育.....	6
1.4.3 细胞色素 P450 参与植物激素代谢.....	7
1.4.4 细胞色素 P450 参与植物胁迫响应.....	7
1.5 甘草遗传转化的研究进展.....	8
1.6 研究意义和技术路线.....	9
1.6.1 研究意义.....	9
1.6.2 技术路线.....	9
第 2 章 甘草酸合成途径 <i>GuCYP450</i> 基因的生物信息学分析.....	10
2.1 实验材料、试剂与设备.....	10
2.1.1 实验材料.....	10
2.1.2 实验试剂.....	10
2.1.3 实验设备.....	10
2.2 实验方法.....	11
2.2.1 CYP72A 和 CYP88D 亚家族系统进化分析.....	11
2.2.2 基因结构、保守基序、结构域及顺式作用元件分析.....	11
2.2.3 CYP72A 和 CYP88D 亚家族成员表达模式分析.....	11
2.2.4 样本收集与处理.....	11
2.2.5 实时荧光定量 RCR.....	12
2.2.6 候选基因克隆.....	13
2.2.7 候选基因结构分析.....	15
2.3 结果与分析.....	15

2.3.1 CYP72A 和 CYP88D 亚家族系统进化分析	15
2.3.2 基因结构、保守基序和结构域分析	17
2.3.3 顺式作用元件分析	17
2.3.4 CYP72A 和 CYP88D 亚家族成员的组织表达特异性分析	18
2.3.5 非生物胁迫下甘草 CYP72A 和 CYP88D 亚家族基因的表达分析	19
2.3.6 候选 <i>GuCYP450</i> 基因克隆及测序	20
2.3.7 候选基因序列及结构分析	21
2.3.8 候选基因表达分析	23
2.4 讨论	24
2.5 小结	26
第 3 章 <i>GuCYP450</i> 对乌拉尔甘草根部形态、药用活性成分及内源激素的影响	27
3.1 实验材料、试剂和设备	27
3.1.1 实验材料	27
3.1.2 实验试剂	27
3.1.3 实验设备	27
3.2 实验方法	28
3.2.1 植物表达载体构建	28
3.2.2 植物表达载体转化农杆菌 GV3101	29
3.2.3 植物表达载体转化乌拉尔甘草	29
3.2.4 甘草转化植株分子鉴定	30
3.2.5 转基因乌拉尔甘草生物量的测定	31
3.2.6 转基因乌拉尔甘草有效成分和内源激素测定	31
3.3 结果与分析	32
3.3.1 植物过表达载体构建及测序	32
3.3.2 植物过表达载体构建转化农杆菌	32
3.3.3 农杆菌介导甘草下胚轴转化及再生	34
3.3.4 过表达转基因甘草鉴定	34
3.3.5 <i>GuCYP450</i> 对乌拉尔甘草形态的影响	36
3.3.6 转基因乌拉尔甘草地下部分中药用活性成分含量	37
3.3.7 转基因乌拉尔甘草地下中部分内源激素含量	39
3.4 讨论	40
3.5 小结	41
第 4 章 <i>GuCYP450</i> 转基因乌拉尔甘草转录组测序及数据分析	42
4.1 实验材料、试剂与设备	42

4.1.1 实验材料	42
4.1.2 实验试剂与设备	42
4.2 实验方法	42
4.2.1 转基因甘草总 RNA 提取、cDNA 文库构建以及 RNA 测序	42
4.2.2 测序数据处理与分析	43
4.2.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)	43
4.2.4 数据处理	43
4.3 结果与分析	43
4.3.1 转录组测序数据质量分析	43
4.3.2 转基因乌拉尔甘草差异基因表达分析	44
4.3.3 GO 功能注释分析	45
4.3.4 GO 富集分析	47
4.3.5 KEGG 注释分析	50
4.3.6 KEGG 富集分析	52
4.3.7 甘草酸合成途径 UDEGs 分析	53
4.3.8 黄酮类合成途径 UDEGs 分析	55
4.3.9 植物激素信号转导水平的 DEGs 分析	57
4.3.10 水杨酸生物合成途径的 DEGs 分析	59
4.3.11 脱落酸生物合成途径的 DEGs 分析	59
4.3.12 WGCNA 分析转基因甘草中影响黄酮类生物合成的转录因子	60
4.3.13 qRT-PCR 对测序结果验证	64
4.4 讨论	66
4.5 小结	68
第 5 章 结论与展望	70
5.1 结论	70
5.2 展望	70
参考文献	71
附录	84
致谢	87
作者简介	88
石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表	89

中英文缩写对照表

英文缩写 Abbreviation	英文名称 English Name	中文名称 Chinese Name
LB	Luria Broth	LB 培养基
MS	Murashige and Skoog	MS 培养基
ddH ₂ O	Distilled and deionized water	双蒸水
RNase	Ribonucleic acid enzyme	核糖核酸酶
bp	Base pair	碱基对
Hyg	Hygromycin	潮霉素
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Kan	Kanamycin	卡那霉素
Rif	Rifampicin	利福平
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
qRT-PCR	Real-time quantitative PCR	实时定量 PCR
MVA	Mevalonic acid	甲羟戊酸
MEP	2-methyl-d-erythritol-4-phosphate	2-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸
HMGS	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase	3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶
HMGR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶
SQS	Squalene synthetase	鲨烯合成酶
FPPS	Farnesyl pyrophosphate synthase	法尼基焦磷酸合酶
SQE	Squalene epoxidase	角鲨烯环氧酶
β-AS	β-amyrin synthetase	β-香树脂醇合成酶
CYP88D6	Cytochrome P450	细胞色素 P450
CYP72A154	Cytochrome P450	细胞色素 P450
CYP72A566	Cytochrome P450	细胞色素 P450

中英文缩写对照表（续表）

英文缩写 Abbreviation	英文名称 English Name	中文名称 Chinese Name
UGT73P12	Glycosyltransferase	糖基转移酶
CHS	Chalcone synthase	查尔酮合成酶
CHI	Chalcone isomerase	查尔酮异构酶
C4H	Trans cinnamic acid-4-hydroxylase	反式肉桂酸-4-羟化酶
IFS	Isoflavone synthetase	异黄酮合成酶
HIDH	2-hydroxyisoflavone dehydratase	2-羟基异黄酮脱水酶
PAL	Phenylalanine ammonia lyase	苯丙氨酸解氨酶
ICS	Isochorismate synthase	异戊二烯酸合成酶
NCED	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	9-顺-环氧类胡萝卜素双加氧酶
AIM1	Abnormal inflorescence meristem 1	异常花序分生组织
FDR	False discovery rate	错误发现率
DGEs	Differentially expressed genes	差异表达基因
UDGEs	Upregulated differentially expressed genes	上调差异表达基因
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes	京都百科全书基因和基因组
GO	Gene ontology	基因本体论
JA	Jasmonic acid	茉莉酸
ABA	Abscisic acid	脱落酸
IAA	Indole-3-acetic acid	吲哚乙酸
SA	Salicylic acid	水杨酸
GA	Gibberellin	赤霉素

引言

乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 隶属豆科甘草属, 是重要的大宗药材, 以干燥的根及根茎入药, 具有抗菌消炎、抗病毒、清热解毒以及抗癌等功效^[1]。野生甘草具有良好的抗旱及耐盐碱能力, 在我国西北地区具有重要的防风固沙作用, 对于维护土壤生态平衡和防止沙漠化具有重要意义^[2]。因其用途广泛, 市场需求较大, 导致野生甘草资源过度采挖, 加剧了西北地区的水土流失和土地沙化等生态环境恶化^[3]。人工栽培甘草成为主要解决途径, 但人工栽培存在质量不稳定的问题, 其活性成分低于野生甘草 30%~40%^[4], 达不到《中华人民共和国药典》标准^[5]。由于甘草为多年生草本植物, 生长周期较长, 大约 2~3 年开花, 极大增加了传统育种的难度。而随着生物技术的不断进步, 植物转基因育种技术已日渐成熟, 这为未来甘草分子育种研究奠定了良好的基础。

细胞色素 P450 参与萜类、生物碱及黄酮类等次生代谢物的积累, CYP72A、CYP88D 和 CYP93E 亚家族成员参与豆类三萜皂苷的合成^[6]。目前在工程酵母中已经验证 CYP72A154 和 CYP88D6 参与甘草酸的合成, 为甘草酸的人工合成生产提供了基础^[7,8]。但 CYP72A 和 CYP88D 亚家族成员在甘草中对药用活性成分影响的分子机制并不清楚。本研究通过本课题组干旱胁迫、盐胁迫和乌拉尔甘草不同组织的转录组数据, 筛选了 3 个与甘草酸合成相关的 *GuCYP450* 基因并进行克隆。利用根癌农杆菌介导的遗传转化体系, 在乌拉尔甘草中过表达 *GuCYP72A154*、*GuCYP72A566*、*GuCYP88D6* 基因, 并获得了转基因甘草植株, 发现转基因甘草地下部分的生物量、活性成分、内源激素含量相较于野生型显著提升。基于转录组分析, 揭示 *GuCYP450* 基因合成甘草活性成分合成的分子机制。为下一步培育质优的甘草种质提供了理论基础。

第1章 文献综述

1.1 甘草的概述

甘草，又名国老、密草、甜草和美草^[9]，属于豆科甘草属植物，其根及根茎经过干燥后被用作药材。野生甘草在我国西北地区广泛分布，主要以新疆、甘肃、宁夏、内蒙古为主，胀果甘草主要在甘肃、新疆、陕西等地分布，光果甘草主要在新疆和青海大量分布^[10,11]。甘草的药用活性成分主要包括三萜皂苷类和黄酮类^[12,13]。迄今为止，已从乌拉尔甘草中分离出 244 种化合物，其中黄酮类和三萜类化合物最多，还包括香豆素、生物碱、氨基酸、挥发性成分和多糖等其他类化合物^[14]。甘草中的主要药用成分具有多种药理作用，如抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、抗炎、免疫调节剂等^[15]。甘草味甘性平，具有清热解毒、祛痰止咳及调和诸药的功效，还具有“中药之王”的美称^[16]。甘草在食品和化妆品中广泛应用，可作为甜味剂、抗氧化剂等，还具有美白抗衰的功效^[17]。在畜牧业中，甘草可作为添加剂用于动物生产，以提高生产性能和改善饲料转化率，从而减少抗生素的依赖^[18,19]。此外，甘草还具有改良土壤的功能^[20]。

甘草作为重要的生态植物，对我国西北荒漠地区固沙具有关键作用。由于长期过度采挖和生态环境恶化，野生甘草资源显著减少^[2]。据统计，内蒙古和新疆等主要产区的野生甘草储量已不足 20 世纪 80 年代的 30%。近年来，医药和食品行业的需求持续增长，已不能满足巨大市场需求，人工栽培甘草是主要的解决途径，在宁夏、内蒙古、甘肃、新疆等地已有大面积的种植^[21]，而人工栽培的甘草有效成分远低于野生甘草，大多不符合我国药典标准，其中甘草酸含量最为显著^[5]。因此，如何提高栽培甘草品质成为当前面临的主要问题。

1.2 甘草药用活性成分研究进展

甘草作为重要的大宗药材，其有效成分大多是次生代谢产物。其中三萜皂苷和黄酮类化合物是甘草中最主要的有效成分。甘草次酸、甘草酸是三萜皂苷的主要活性成分；甘草素、异甘草素和甘草苷是黄酮类最重要的药用活性成分。

1.2.1 甘草酸生物合成途径研究进展

目前，已分离到的三萜皂苷中，甘草酸药用最广且含量最高^[22]。甘草酸又被称为甘草甜素，作为甘草中最主要的活性成分，具有显著的抗炎、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、