

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2019.10087

刘梦迪, 李长福, 章焰生. 葫芦巴环阿屯醇合酶基因的分离及其对薯蓣皂素合成的影响[J]. 植物科学学报, 2019, 37(1): 87~92
 Liu MD, Li CF, Zhang YS. Molecular cloning of cycloartenol synthase from *Trigonella foenum-graecum* L. and its effect on diosgenin biosynthesis[J]. *Plant Science Journal*, 2019, 37(1): 87~92

葫芦巴环阿屯醇合酶基因的分离 及其对薯蓣皂素合成的影响

刘梦迪^{1,2}, 李长福¹, 章焰生^{1*}

(1. 中国科学院武汉植物园, 中国科学院植物种质创新与特色农业重点实验室,
武汉 430074; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 以薯蓣皂素合成植物葫芦巴 (*Trigonella foenum-graecum* L.) 为材料, 从中分离了环阿屯醇合酶基因 *TfCAS*, 并对其序列特征、基因的表达及其对葫芦巴薯蓣皂素生物合成的影响进行了分析。结果显示, 该基因全长 2271 bp, 共编码 756 个氨基酸; 其氨基酸序列与苜蓿苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.)、豌豆 (*Pisum sativum* L.) 及百脉根 (*Lotus japonicus* L.) 环阿屯醇合酶氨基酸序列的同源性分别为 94%、91% 和 89%。利用酵母表达系统对 *TfCAS* 蛋白的生物化学功能进行了验证, 结果表明该蛋白能够催化环阿屯醇的合成。进一步利用葫芦巴发根遗传转化体系在葫芦巴中过量表达 *TfCAS* 基因, 发现该基因的过量表达大幅提高了 *TfCAS* 的表达, 且促进了葫芦巴中 β -谷甾醇和薯蓣皂素的生物合成, 但与对照相比差异不显著。研究结果表明 *TfCAS* 基因参与了葫芦巴薯蓣皂素的生物合成, 但其并非为该合成途径中的限速酶。

关键词: 薯蓣皂素; 葫芦巴; 环阿屯醇合酶; 发根

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2019)01-0087-06

Molecular cloning of cycloartenol synthase from *Trigonella foenum-graecum* L. and its effect on diosgenin biosynthesis

Liu Meng-Di^{1,2}, Li Chang-Fu¹, Zhang Yan-Sheng^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: As a naturally occurring steroid sapogenin, diosgenin is an important intermediate for the synthesis of hundreds of steroid drugs. However, the biosynthetic pathway to diosgenin has not yet been completely elucidated and it remains unclear whether diosgenin biosynthesis originates from lanosterol or cycloartenol. In this study, the gene encoding cycloartenol synthase (CAS), *TfCAS*, was successfully cloned from a diosgenin-producing plant *Trigonella foenum-graecum* L. The open reading frame of the *TfCAS* gene had 2 271 base pairs of nucleotides encoding 756 amino acids. *TfCAS* showed 94%, 91%, and 89% of amino acid identities to the CASs from *Medicago truncatula* Gaertn., *Pisum sativum* L., and *Lotus japonicas* L., respectively. Biochemical analysis using a yeast expression system confirmed that *TfCAS* encodes a functional CAS protein that can convert 2,3-oxidosqualene into cycloartenol. The *TfCAS* transcript level in *Trigonella foenum-graecum* was further genetically modified by overexpressing the *TfCAS* gene via the hairy root transformation system. Real-time PCR

收稿日期: 2018-08-28, 退修日期: 2018-09-25。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670300)。

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (31670300).

作者简介: 刘梦迪(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物天然产物生物合成(E-mail: liumengdi15@mails.ucas.edu.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: zhangys@wbgcas.cn)。

analysis showed that the *TfCAS* transcript level was significantly up-regulated in the *TfCAS*-expressed hairy roots, suggesting success of the transgene events. Compared with the empty vector-transformed lines, the overexpression of *TfCAS* led to a slight but non-significant improvement in the biosynthesis of diosgenin and β -sitosterol. These data indicate that *TfCAS* may not be a rate limiting enzyme but may play a role in the diosgenin synthetic pathway in *Trigonella foenum-graecum*.

Key words: Diosgenin; *Trigonella foenum-graecum*; Cycloartenol synthase; Hairy root

薯蓣皂素(Diosgenin)，又称薯蓣皂苷元(或薯蓣皂甙元)，具有抑制肿瘤生长、抗真菌、免疫调节及抗病毒等多种药用活性^[1-6]。此外，该化合物还是200多种甾体激素类药物的合成前体^[7]。甾体激素类药物是仅次于抗生素的世界第二大类药物，因此薯蓣皂素的合成、制备在一定程度影响了生物医药产业链的发展。目前，薯蓣皂素的来源主要是从植物中进行分离、纯化，公开报道的薯蓣皂素合成植物主要有盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)、穿龙薯蓣(*Dioscorea nipponica* Makino)以及葫芦巴(*Trigonella foenum-graecum* L.)等。

薯蓣皂素生源途径至今尚未完全解析，据报道它的合成前体主要是胆固醇^[8-10]，但 β -谷甾醇也有可能是薯蓣皂素的合成前体^[11]。研究表明，植物中谷甾醇可由环阿屯醇合成^[12]，而胆固醇则可以由环阿屯醇和羊毛甾醇分别合成得到^[13]。因此，无论薯蓣皂素的合成是源于胆固醇还是 β -谷甾醇，环阿屯醇很可能是薯蓣皂素合成的必经中间体。环阿屯醇合酶(cycloartenol synthase, CAS)是氧化鲨烯环化酶(oxidosqualene cyclase, OSC)家族中的一个成员，主要参与植物中甾醇和类甾醇物质的生物合成，负责催化2,3-氧化鲨烯至环阿屯醇的转化反应。目前，CAS基因已从豌豆(*Pisum sativum* L.)^[14]、白桦(*Betula platyphylla* Suk.)^[15]和盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)^[16]等多种植物中分离获得，且部分CAS基因的功能也得到了鉴定。如在烟草悬浮细胞中抑制CAS的表达明显抑制了植物甾醇的合成和积累^[17]；醉茄(*Withania somnifera* (L.) Dunal)中CAS基因的表达水平高低显著影响了醉茄内酯化合物的合成^[18]。由此可见，CAS的表达可能是植物甾醇或甾体激素类化合物合成的调控靶点，但是CAS是否为薯蓣皂素生物合成的转录调控位点尚

不清楚。

葫芦巴又名香豆、香草等，是豆科蝶形花亚科的一年生草本植物^[19]。薯蓣皂素是葫芦巴中一种重要的化学成分。本研究前期开展了葫芦巴的转录组学研究，从中检测到了葫芦巴 CAS 基因的表达，但我们在葫芦巴转录组文库中并未检测到羊毛甾醇合酶基因的表达，提示植物中薯蓣皂素的合成途径经了环阿屯醇。因此，本研究从葫芦巴中分离获得全长 *TfCAS* 基因，并利用酵母表达系统对其生化功能进行确认；并进一步利用葫芦巴发根遗传转化体系，在葫芦巴中过量表达该基因，研究其过量表达对薯蓣皂素生物合成的影响，以期为薯蓣皂素生物合成途径的解析奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究以葫芦巴组培苗为实验材料。组培苗的制备参考李晓华等^[20]的方法。葫芦巴种子经消毒后培养于含3%蔗糖的MS固体培养基上^[21]。

1.2 葫芦巴 CAS 基因的克隆

利用本实验室前期建立的葫芦巴转录组文库，通过Blast分析筛选出一条具有完整开放阅读框(ORF)的 CAS 基因序列，设计扩增引物 CAS-1F 和 CAS-1R(表 1)。利用常规 RT-PCR 方法扩增葫芦巴 *TfCAS* 基因的 ORF 全长序列，扩增产物回收后连接至 pEASY blunt simple 载体，经转化后挑取阳性克隆送测序。测序正确的单菌落进行扩大培养，提取质粒。

1.3 酵母表达体系验证 *TfCAS* 基因的生化功能

1.3.1 *TfCAS* 基因在酵母细胞中的表达

采用内切酶 *Bgl*Ⅱ 和 *Spe*Ⅰ 将带有 *TfCAS* 基因的质粒与酵母表达载体 pESC-TRP 进行双酶切，利用 T4 连接酶将 *TfCAS* 基因插入 pESC-TRP 载体，获得酵母表达载体 pESC-TRP-*TfCAS*。采用醋

表1 引物信息

Table 1 List of primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
CAS-1F	CGGACTAGTATGTGGAAGCTGAAAGTTGC
CAS-1R	GGAAGATCTTCAGGCCTGCAATACATGACGA
CAS-2F	ACTCTGACCATGGTAGATCTGATGTG-GAAGCTGAAAGTTGC
CAS-2R	AAGTTCTCTCCTTACTAGTGGCCTG-CAATACATGACGAC
1302-F	AATCTCGTCAACATGGTGG
1302-R	TCACCTTCACCCCTCTCCACT
CAS-R	GCACGAGTGGGTGAGGATAG
CAS-F	CTTGGAGTGGTGAATGGCTG
actin-F	GGCGGGATGGTATTGAACCTTGTAC
actin-R	ATCCTGAAACTCATCTTCCTCTAA

酸锂转化法, 将 pESC-TRP-TfCAS 转化进本实验室前期构建的氧化鲨烯高产酵母菌株, 以 pESC-TRP 空载体为对照。将转基因酵母细胞置于 5 mL 色氨酸缺陷型培养基中(含 2% 葡萄糖), 于 30℃、250 r/min 条件下过夜培养; 次日将培养基稀释 10 倍后转接于 20 mL 新鲜培养基中继续培养至 OD₆₀₀ 值为 2.5, 离心收集菌体, 无菌水漂洗 2 次, 重悬菌体至 100 mL 酵母诱导缺陷型培养基(含 2% 半乳糖)中培养 3 d。

1.3.2 产物的提取与检测

将上述酵母培养液离心后分开收集酵母细胞菌体和培养基, 合并源于菌体与培养基中的代谢提取物用于气相色谱-质谱(GC-MS)分析。菌体代谢物提取方法为: 菌体经超纯水漂洗后重悬于丙酮中; 采用高通量组织研磨器进行酵母细胞破碎, 离心获得上清丙酮提取物, 重复 3 次; 提取物挥发后溶于 85 μL 氯仿。培养基中的代谢物提取方法为: 采用等体积的乙酸乙酯进行 2 次抽提, 提取物蒸干后溶于氯仿。合并源于酵母菌体与培养液的提取物, 离心获得上清氯仿溶解液, 用于 GC-MS 分析。

采用安捷伦 7890B/7000C 进行 GC-MS 分析。色谱柱为 HP-5ms; 载气流速 1 mL/min、进样量 1 ~ 5 μL、进样口温度 250℃。分析程序如下: 柱温箱 80℃ 保持 1 min; 然后以 20℃/min 加热至 310℃, 保持 15 min; 质谱扫描范围为 45 ~ 700 m/z。

1.4 TfCAS 基因过量表达后薯蓣皂素含量检测

1.4.1 TfCAS 基因在葫芦巴中的过量表达

利用引物 CAS-2F 和 CAS-2R(表 1)扩增葫芦巴 TfCAS 基因序列, 通过一步克隆法将其克隆到表达载体 pCAMBIA1302 中, 获得植物表达载体 pCAMBIA1302-TfCAS。采用冻融法将 pCAMBIA1302-TfCAS 质粒与空对照分别转化进发根农杆菌 K599 中, 鉴定阳性菌落。将阳性菌落置于 5 mL 的 LB(含链霉素和卡那霉素)培养基中, 于 28℃、220 r/min 过夜培养; 次日转接于 100 mL 新鲜培养基中, 至 OD₆₀₀ 值达到 0.8 ~ 1.2 时, 取 20 mL 菌液进行离心, 弃上清。菌体用 5 mL 的 MS 液体培养基悬浮, 作为发根农杆菌侵染菌液。

以培养 15 d 的葫芦巴组培苗茎段为外植体, 浸泡于上述农杆菌悬浮液中 5 min, 再于 1/2 MS 固体培养基(含 3% 蔗糖, 100 μmol/L 乙酰丁香酮)上培养 3 ~ 5 d, 然后转移至 MS 除菌培养基(含 3% 蔗糖, 400 mg/L 头孢霉素)中培养至无菌斑出现。约 12 d 后侵染茎段出现白点, 发根开始生长。发根生长约 2 个月后用于基因转化的阳性鉴定。方法如下: 剪取 1 cm 的发根, 采用 SDS 法提取 DNA, 进行 PCR 鉴定。PCR 鉴定采用的引物为 1302-F 与 CAS-R, 鉴定转化空载体的引物为 1302-F 和 1302-R(表 1)。

本实验共获得 TfCAS 基因转化的阳性发根 18 根, 获得空载体转化的阳性发根 15 条。将上述转化 TfCAS 基因与空载体对照的阳性发根各分为 3 组, 经液氮速冻、磨碎后保存于 -80℃。

1.4.2 代谢物含量的检测

采用荧光定量 PCR 仪 7500FAST 检测阳性发根中 TfCAS 基因的表达量, 以 actin 基因为内参, TfCAS 基因转录本采用引物 CAS-F 和 CAS-R(表 1)扩增。荧光定量 PCR 程序为: 95℃预变性 10 min; 95℃变性 15 s, 60℃退火 1 min; 共 40 个循环。

β-谷甾醇和环阿屯醇代谢物的提取参考汪波等^[22]的方法。采用氯仿进行提取, 以 60 μg 熊果酸为内标, 提取上清液用于 HPLC 分析。薯蓣皂素的提取需进行酸化处理, 过程如下: 上清提取液蒸干后重悬于 2 mL 的 1.5 mol/L H₂SO₄ 中, 然后于 100℃下反应 4 h; 反应体系冷却后加入 2 mL 正己烷抽提, 重复 3 次; 合并正己烷提取物并加入

2 mL 1%的NaHCO₃洗涤,再经过2次ddH₂O冲洗,离心收集正己烷提取物上清,挥发后溶于90%的乙腈,取20~25 μL用于HPLC检测。液相色谱分析仪为岛津LC-20AT,色谱柱为岛津C18(5 μm, 4.6 mm × 250 mm)。 β -谷甾醇含量分析条件如下:流动相100%甲醇、柱箱30℃、流速0.6 mL/min、检测波长210 nm;分析程序为0~55 min 100%甲醇。薯蓣皂素HPLC分析条件如下:流动相0.1%磷酸水(A)与100%甲醇(B)、柱箱30℃、流速0.6 mL/min、检测波长203 nm;分析程序为:0~25 min 95% B;30~60 min 100% B;60.01~63 min 95% B。

2 结果与分析

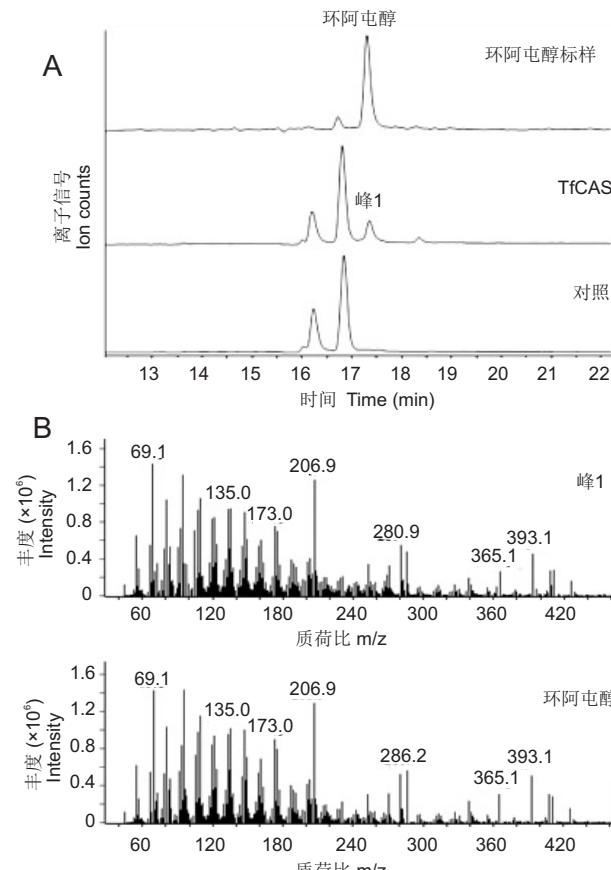
2.1 葫芦巴 *TfCAS* 基因的分离

研究结果表明,葫芦巴 *TfCAS* 基因全长2271 bp,共编码756个氨基酸(GenBank登录号:KX148475.1)。序列分析结果显示,该基因与来源于其它植物的 CAS 具有一定同源性,其中与蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula* Gaertn.),豌豆(*Pisum sativum* L.)及百脉根(*Lotus japonicus* L.)CAS 基因的同源性分别为95%、91%和90%。酵母表达实验结果发现,转入葫芦巴 *TfCAS* 的转基因酵母较对照(转空载体的酵母)生成了一个新的产物,该产物与环阿屯醇标样出峰保留时间一致(图1: A)。进一步的质谱分析结果显示,该产物的碎片断裂模式与环阿屯醇标样高度相似(图1: B)。说明本研究分离的葫芦巴 *TfCAS* 基因的编码蛋白具有环阿屯醇合酶的活性。

2.2 葫芦巴 *TfCAS* 基因过量表达对薯蓣皂素生物合成的影响

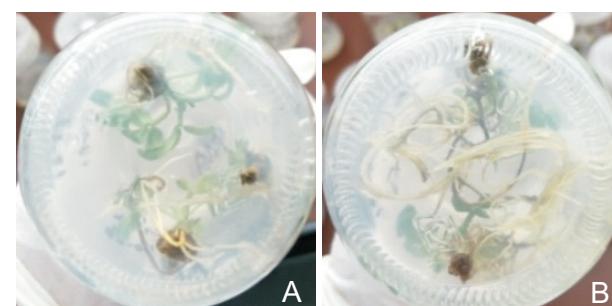
为进一步研究 CAS 基因是否为薯蓣皂素生物合成调控的限速靶点,本研究将 *TfCAS* 基因在葫芦巴发根中进行过量表达,采用空载体为对照进行转化。发根农杆菌侵染茎段长出的发根经PCR鉴定,结果显示阳性发根转化率约为50%(图2),相比对照,过量表达 *TfCAS* 基因促进了葫芦巴发根的生长,说明 *TfCAS* 基因的过量表达干扰了发根的发育。荧光定量PCR分析结果表明,过量表达 *TfCAS* 显著上调了该基因在葫芦巴发根中的表达(图3)。

HPLC分析结果显示, *TfCAS* 基因过量表达根系中的薯蓣皂素与 β -谷甾醇,相比对照分别提高了24%与13%(图4),但差异未达到显著水平($P > 0.05$)。



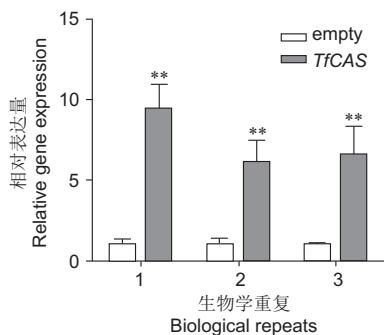
A: 抽提质荷比为426与365.1的离子色谱图; B: 峰1与环阿屯醇的离子碎片图。
A: Alignment of chromatogram at ions of m/z 426 and 365.1; B: Mass spectra of cycloartenol and peak 1.

图1 酵母产物分析
Fig. 1 Analysis of yeast products



A: 转 pCAMBIA1302 空载体的葫芦巴发根; B: 转 pCAMBIA1302-TfCAS 载体的葫芦巴发根。
A: Empty vector pCAMBIA1302-transformed hairy roots; B: *TfCAS*-overexpressed hairy roots.

图2 转基因发根的诱导
Fig. 2 Induction of transgenic hairy roots



Empty: 转空载体 pCAMBIA1302 发根中 *TfCAS* 的表达量;
TfCAS: 过表达后发根中 *TfCAS* 的表达量; ** 表示在 $P < 0.01$ 水平上差异极显著。

Empty: Expression level of *TfCAS* gene in pCAMBIA1302-transformed hairy roots; *TfCAS*: Expression level of *TfCAS* gene in *TfCAS*-overexpressed hairy roots; **: Difference significant at the 0.01 level.

图 3 葫芦巴转基因发根中 *TfCAS* 基因的表达量

Fig. 3 Expression level of *TfCAS* gene

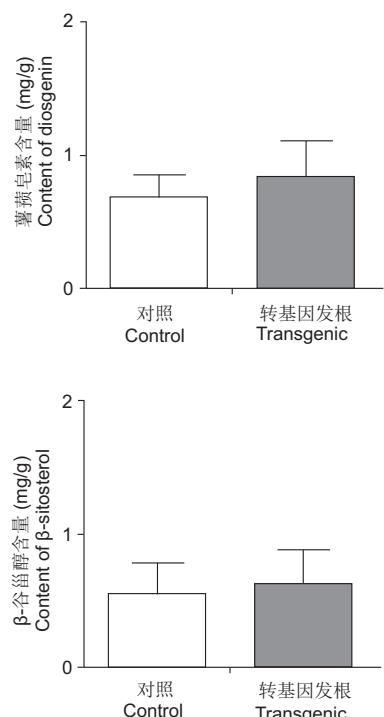


图 4 阳性发根中产物的含量

Fig. 4 Content of products in positive hairy roots

3 讨论

研究发现, 薯蓣皂素具有很好的抗癌功效^[1-3], 是 200 多种甾体激素类药物的前体物质^[7], 具有重要的药用价值。目前已报道的薯蓣皂素合成植物主要有盾叶薯蓣、穿龙薯蓣以及葫芦巴等植物^[23]。薯蓣皂素在植物中的生物合成机制至今尚未完全解析, 如植物中薯蓣皂素前体物质胆固醇或谷甾醇的

生物合成是途径环阿屯醇还是羊毛甾醇尚无定论。本研究前期以葫芦巴为薯蓣皂素合成植物, 对葫芦巴进行转录组学分析, 结果发现葫芦巴转录组中并未检测到羊毛甾醇合酶基因, 而环阿屯醇合酶基因的表达较为明显, 这一结果与盾叶薯蓣和穿龙薯蓣转录组学研究中的结论相似^[24, 25], 表明薯蓣皂素前体物质胆固醇很可能是途径环阿屯醇。

研究表明, 盾叶薯蓣皂素含量的增加伴随着环阿屯醇合酶基因表达量的上调^[26], 说明环阿屯醇合酶有可能是调控薯蓣皂素合成的关键位点。本研究从薯蓣皂素合成植物葫芦巴中分离了环阿屯醇合酶基因, 通过酵母表达系统, 证实本实验分离的葫芦巴环阿屯醇合酶基因能够表达有催化活性的环阿屯醇合酶。为揭示环阿屯醇合酶是否为葫芦巴薯蓣皂素生物合成的调控限速酶, 本研究进一步利用葫芦巴发根遗传转化体系, 在葫芦巴中过量表达环阿屯醇合酶基因, 结果显示过量表达该基因上调了薯蓣皂素与谷甾醇的合成, 但整体上调比例不大, 与对照差异不显著。因此, 本研究结果表明环阿屯醇合酶参与了薯蓣皂素的生物合成, 过量表达环阿屯醇合酶基因能够促进终产物薯蓣皂素的生物合成; 葫芦巴中环阿屯醇合酶可能不是薯蓣皂素合成途径中的限速酶, 且不同薯蓣皂素合成植物的生物合成调控位点可能有所差异。

参考文献:

- [1] Rajalingam K, Sugunadevi G, Arokia VM, Kalaimathi J, Suresh K. Anti-tumour and anti-oxidative potential of diosgenin against 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene induced experimental oral carcinogenesis [J]. *Pathol Oncol Res*, 2012, 18(2): 405-412.
- [2] Tong QY, He Y, Zhao QB, Qing Y, Huang W, Wu XH. Cytotoxicity and apoptosis-inducing effect of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* Wright against cancer cells [J]. *Steroids*, 2012, 77(12): 1219-1227.
- [3] Man SL, Gao WY, Zhang YJ, Huang LQ, Liu CX. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(7): 703-714.
- [4] Sautour M, Mitaine-Offer AC, Miyamoto T, Dongmo A, Lacaille-Dubois MA. Antifungal steroid saponins from *Dioscorea cayenensis* [J]. *Planta Med*, 2004, 70(1): 90-92.
- [5] 于海荣, 王济兴, 陈建双, 周小春, 宋鸿儒. 穿山龙总皂苷含药血清对小鼠脾淋巴细胞增殖及 IL-6 产生影响的实验研究 [J]. 江苏中医药, 2007, 39(1): 57-58.

- [6] Wang YJ, Pan KL, Hsieh TC, Chang TY, Lin WH, Hsu JTA. Diosgenin, a plant-derived saponin, exhibits anti-viral activity *in vitro* against Hepatitis C virus [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(4) : 580–584.
- [7] Dong J, Lei C, Lu D, Wang Y. Direct biotransformation of dioscin into diosgenin in rhizome of *Dioscorea zingiberensis* by *Penicillium dioscin* [J]. *Indian J Microbiol*, 2015, 55 (2) : 200–206.
- [8] Bennett RD, Heftmann E. Biosynthesis of *Dioscorea* saponins from cholesterol [J]. *Phytochemistry*, 1965, 4(4) : 577–586.
- [9] Stohs SJ, Kaul B, Staba EJ. The metabolism of 14C-cholesterol by *Dioscorea deltoidea* suspension cultures [J]. *Phytochemistry*, 1969, 8(9) : 1679–1686.
- [10] Joly RA, Bonner J, Bennett RD, Heftmann E. The biosynthesis of steroid saponins in *Dioscorea floribunda* from doubly labelled cholesterol [J]. *Phytochemistry*, 1969, 8 (9) : 1709–1711.
- [11] Stohs SJ, Sabatka JJ, Rosenberg H, Stohs SJ, Sabatka JJ, Rosenberg H. Incorporation of 4-¹⁴C-22, 23-³H-sitosterol into diosgenin by *Dioscorea deltoidea* tissue suspension cultures [J]. *Phytochemistry*, 1974, 13(10) : 2145–2148.
- [12] Caspi E, Sliwowski J. Letter: on the role of cycloartenol in the formation of phytosterols. Biosynthesis of (19-2H) sitosterol in deuterium oxide germinated peas [J]. *J Am Chem Soc*, 1975, 97(17) : 5032–5034.
- [13] Sonawane PD, Pollier J, Panda S, Szymanski J, Massalha H, et al. Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism [J]. *Nat Plants*, 2016, 3 (1) : 16205.
- [14] Morita M, Shibuya M, Lee MS, Sankawa U, Ebizuka Y. Molecular cloning of pea cDNA encoding cycloartenol synthase and its functional expression in yeast [J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20(7) : 770–775.
- [15] Zhang H, Shibuya M, Yokota S, Ebizuka Y. Oxidosqualene cyclases from cell suspension cultures of *Betula platyphylla* var. *japonica*; molecular evolution of oxidosqualene cyclases in higher plants [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(5) : 642–650.
- [16] 陈迪, 陈永勤, 杨之帆, 张艳艳, 肖柳青. 盾叶薯蓣环阿屯醇合酶基因克隆与表达 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(2) : 221–228.
- Chen D, Chen YQ, Yang ZF, Zhang YY, Xiao LQ.
- Molecular cloning and expression of cycloartenol synthase gene from *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2009, 29(2) : 221–228.
- [17] Gaspascual E, Simonovik B, Schaller H, Bach TJ. Inhibition of cycloartenol synthase (CAS) function in tobacco BY-2 Cells [J]. *Lipids*, 2015, 50(8) : 773–784.
- [18] Mishra S, Bansal S, Mishra B, Sangwan RS, Asha, et al. RNAi and homologous over-expression based functional approaches reveal triterpenoid synthase gene-cycloartenol synthase is involved in downstream withanolide biosynthesis in *Withania somnifera* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2) : e0149691.
- [19] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第42卷, 第2分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [20] 李晓华, 李长福, 黎佳, 刘梦迪, 章焰生. 两种影响因子对葫芦巴发根转化率的影响 [J]. 植物科学学报, 2017, 35(5) : 735–740.
- Li XH, Li CF, Li J, Liu MD, Zhang YS. Effect of two key treatments on the transformation efficiency of fenugreek hairy roots [J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(5) : 735–740.
- [21] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Physiol Plantarum*, 2010, 15(3) : 473–497.
- [22] 汪波. 丹参酚酸和薯蓣皂苷生物合成基因的挖掘与分析 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2015.
- [23] 黄亚辉, 盛孝邦. 薯蓣皂甙元的研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2005, 24(5) : 20–23.
- Huang YH, Sheng XB. Advances in research of diosgenin [J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2005, 24(5) : 20–23.
- [24] Li J, Liang Q, Li CF, Liu MD, Zhang YS. Comparative transcriptome analysis identifies putative genes involved in dioscin biosynthesis in *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Molecules*, 2018, 23(2) : 454.
- [25] Sun W, Wang B, Yang J, Wang W, Liu A, et al. Weighted gene co-expression network analysis of the dioscin rich medicinal plant *Dioscorea nipponica* [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 789.
- [26] Diarra ST, He J, Wang J, Li J. Ethylene treatment improves diosgenin accumulation in *in vitro* cultures of *Dioscorea zingiberensis* via up-regulation of CAS and HMGR gene expression [J]. *Electron J Biotechnol*, 2013, 16(5) : 6–16.