乌头萜类生物合成代谢的转录组学分析

张大燕，文欢，王伟，彭成，高继海*
（成都中医药大学 药学院，中药资源系统研究与开发利用
省部共建国家重点实验室培育基地，成都 611137）

［摘要］ **目的：**对乌头的 6 个器官组织，主根、侧根、茎、叶、花、果实进行转录组测序分析，以研究参与其萜类次级代谢生物合成相关基因的表达谱，挖掘其功能基因。**方法：**采用 Illumina HiSeq 2500 平台测序、组装得 unigenes，与公共数据库 NR，Swiss-Prot，GO，COG，KOG，KEGG 比对、注释以获得差异基因，使用实时荧光定量聚合酶链式反应（Real-time PCR）验证参与萜类次级代谢生物合成的关键基因。**结果：**本研究共获得 156 967 635 条 Clean Reads（28 254 174 300 bp），经序列合并拼接后获得 103 337 个 unigenes，通过核苷酸和蛋白序列等方面的同源性分析，表明其中 37.31%（38 554 个 unigenes）与其他生物的已知基因具有不同程度的同源性，通过功能分类研究和代谢途径分析（KEGG）获得参与萜类合成 158 个 unigenes（编码 5 个关键酶）。**结论：**这些发现的基因将为乌头萜类化合物的生物合成途径及分子机制提供基础数据。

［关键词］ 乌头；转录组；萜类化合物；次级代谢生物合成
［中图分类号］ R282.2 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903(2017)16-0045-06
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.2017160045
［网络出版地址］ http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170526.1002.026.html
［网络出版时间］ 2017-05-26 10:02

Transcriptional Analysis of Terpenoid Biosynthesis in *Aconitum carmichaelii*

ZHANG Da-yan, WEN Huan, WANG Wei, PENG Cheng, GAO Ji-hai*
(*State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, College Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu* 611137, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To study on the expression of genes involved in the biosynthesis of terpenoid secondary metabolism, and explore the functional genes in *Aconitum carmichaelii* based on transcriptomics sequencing analysis of six *A. carmichaelii* organs (including main root, lateral root, stem, leaves, flower and fruit). **Method**: Illumina Hiseq 2500 was used to detect the sequencing and assemble into unigennes. By comparing with public database, the genes were annotated and differential expressed genes were obtained. Subsequently, Real-time PCR method was used to verify the key genes involved in the terpenoid secondary metabolism biosynthesis. **Result**: Total 156 967 635 Clean Reads (28 254 174 300 bp) were obtained, and 103 337 unigenes were obtained after sequence merging. Homology analysis of nucleotide and protein sequences indicated that 37.31% (38 554 unigenes) had different degree of homology with other creatures. In analysis of the functional classification and metabolic pathway (KEGG), 158 unigenes (encoding 5 enzymes) were involved in terpenoid synthesis. **Conclusion**: These genes will provide the basic data for the terpenoids biosynthetic pathway and molecular mechanism of *A. carmichaelii*.

[**Key words**] *Aconitum carmichaelii*; transcriptome; terpenoid; secondary metabolism biosynthesis

［收稿日期］ 20170323(024)
［基金项目］ 国家自然科学基金项目(81630101)；国家发改委标准化项目(ZYBZH-C-SC-51)；四川省科技支撑计划项目(2015FY111500-140)；四川省科技厅应用基础计划项目(2016JY0089)；中药资源四川省青年科技创新研究团队项目(2015TD0028)
［第一作者］ 张大燕，在读硕士，从事中药学研究，Tel:15828507916，E-mail:184638222@qq.com
［通讯作者］ *高继海，博士后，副研究员，从事分子生药学研究，Tel:13709094661，E-mail:271969318@qq.com

乌头是一种应用广泛的药用植物,其衍生药材已应用于临床两千多年[1-2],产品在国内外享有很高的盛誉,其侧根即附子,已被广泛地用作强心剂、镇痛、抗炎、利尿药等。而其主根(也被称为母根)被指定为“川乌”,临床上用于治疗风湿痛[3]。研究证实乌头主要的药效成分为萜类化合物,如去甲二萜生物碱和二萜生物碱(C19 和 C20 二萜生物碱)[4]。乌头作为一种重要的中药材,在维护人类健康和增加山区群众经济收入等方面都发挥着重要作用。目前,药用乌头基本来自人工栽培,然而品种混乱、栽培管理不规范等,严重影响了川乌附子的药效成分。因此,提高川乌附子的品质,弄清其有效成分的合成途径及调控积累机制,以此来指导良种选育、规范化栽培显得尤为重要。

植物次生代谢途径中,萜类化合物不仅可以调控植物的生长发育,还在逆境胁迫及生物间相互作用等方面发挥重要作用[5-6]。乌头的主要有效成分为次生代谢物——萜类化合物,其生物合成分子机制目前还不清楚,有关于药用植物萜类化合物的生物合成骨架研究报道主要集中于长春花、穿心莲等物种[7-8],但是不够完善,对于药用植物乌头的报道也是甚少,所以弄清楚萜类化合物在分子水平上的代谢机制,不仅可以提高川乌附子药材的质量也可为其良种选育及规范化栽培提供理论依据。

由于萜类次级代谢物的生物合成中各种酶起着重要作用,人们对萜类生物合成研究的重点转移到萜类生物合成关键酶基因的鉴定、特性分析、表达以及基因调控的领域。通过转录组分析,可探讨组织特异性基因表达模式以此明确药用植物次生代谢产物的途径和网络,学者官玲亮等[9]利用转录组分析了药用植物艾纳香,获得 4 条萜类代谢通路,并确定了萜类代谢途径过程中的 3 个关键酶;朱畇昊等[10]采用 Illumina HiSeq 2500 技术对地黄脱毒苗进行转录组测序,发掘出地黄转录组中 81 个 unigenes 参与萜类骨架合成;吴琼[11]利用转录组学技术挖掘出西洋参中 24 条 unigenes 可能参与人参皂苷生物合成相关酶的基因,鉴定出甲羟戊酸(MVA)代谢途径中的关键酶基因,明确了西洋参中人参皂苷的生物合成途径。除此之外,杜仲[12]、厚朴[13]、朱砂根[14]、白木香[15]、乌拉尔甘草[16]等具有重要药用的植物都进行了相关转录组测序工作,为进一步挖掘药用植物次生代谢产物合成途径的关键基因提供了丰富的基因资源。

转录组学可从分子、细胞和个体的不同水平上,深入研究中药材次生代谢信号转导分子机制,可最大限度地挖掘中药材自身的生物学潜力。通过转录组学构建完整的全基因组序列,挖掘基因资源,鉴定关键基因、验证调控表达的相关酶,是推动药用植物生物合成和调控研究的有效途径,目前已成为前沿和热点研究领域。本研究采用 Illumina HiSeq 2500 测序技术对乌头 6 个器官组织进行转录组学研究,以期在转录水平上阐述乌头萜类次级代谢产物的合成机制,以提高乌头品与质,促进乌头的良种选育及规范化种植。

1 材料

乌头植株采自江油 GAP 种植基地(河西乡普照寺村),经成都中医药大学卢先明教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli*,采集时间为 10 月中旬(即附子花季与果实成熟季),实验所用花(flowers, FL),果(fruits, FR),叶(leaves, L),茎(stems, S),侧根和主根(lateral roots, LR 和 true / main roots, TR)由 5 株完整的、长势相近的乌头植物分别进行混合所得。侧根与主根全部使用,茎和叶样品由 5 株植株的顶端、中部及底部材料等量混合而得,花和果实样品也由不同发育阶段的花及果实组成。

2 方法

2.1 转录组测序 采用 Trizol 试剂盒(加拿大伯灵顿公司)提取每个样品组织总 RNA,用带有 Oligo (dT)的磁珠分离 mRNA,纯化 mRNA 并分解成短基因片段,反转录成 cDNA 链,从而建立了乌头植物 6 个器官的 cDNA 转录组文库。

2.2 转录组高通量测序、组装及功能注释 使用 Illumina 公司的 HiSeq 2500 高通量测序平台对乌头 cDNA 转录组文库进行测序。乌头转录组测序后的原始碱基序列通过过滤低质量值数据,获得 Clean reads,使用 Trinity 软件获得短片段(K-mer),长片段(Contig)及片段集合(Component),最后利用 De Bruijn 图的方法和测序 Read 信息,在各个片段集合中分别识别转录本序列,转录组合并组装后即获得海量的 unigenes。将 unigene 与 NR, Swiss-Prot, GO, COG, KOG, KEGG 数据库比对,获得 unigene 功能注释信息。

2.3 差异表达分析 将各样品测序得到的 Reads 与 unigene 库进行比对,根据比对结果,结合 RSEM 软件进行表达量水平估计,利用 FPKM 值表示对应 unigene 的表达丰度,错误率(FDR)$\leqslant 0.05$,计算的绝对值 $\log 2FC \geqslant 2$。采用 DEGseq R 进行样本差异

表达分析,使用 GOseq R,KOBAS 软件对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 富集分析(DEGs),在 DEGs 中通过与全转录组数据进行比对以确定各个基因的功能类别和通路。

2.4 实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)验证试验 采用 Real-time PCR 对转录组数据中参与萜类生物代谢的差异表达基因进行量化,使用肌动蛋白 actin (其转录组编号为 c66153. graph_c0)为内参基因,选取数据库中萜类次级代谢中的关键基因,调出其核苷酸序列,设计 Real-time PCR 引物设计(表 1)。使用 SsoFast™ Eva Green® Superemix (Bio-Rad, USA) 并按照说明书在 Bio-Rad iCycler MyiQ Real-time PCR Systems 平台进行 Real-time PCR 实验。PCR 反应体系为 20 μL:适量 cDNA 样品, SsoFast™ Eva Green® Superemix 10 μL, 引物 1.0 μL和 ddH_2O 7 μL。PCR 程序为 95 ℃, 20 s,1 循环;95 ℃, 5 s, T_m(表 1), 20 s, 45 循环,溶解曲线从65 ~95 ℃,升温程序为 0.5 ℃·s^{-1},结果计算使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$方法,设计 3 个实验重复。

3 结果与分析

3.1 测序及序列拼接 针对同批乌头植物的花、果实、叶、茎、侧根及主根的转录组文库,使用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台对每个样品进行测序,序列组装所得 unigenes 平均长度 653.8 bp, N50 值为 1 073 bp,总长度达 67 567 698 bp(图 1)。unigenes 在花、果实、叶、茎、主根、侧根转录组中的预测总长度分别为 76 793,77 790,69 274,73 045,71 625,67 087 bp。本研究中获得的乌头转录组 N50 超过 1 000,表明本数据库具有较高的质量。

表 1 Real-time PCR 引物设计

Table 1 Real-time PCR primers designed

基因名称(基因 ID 号)	引物序列	序列碱基数	T_m/℃
diphosphomevalonate decarboxylase	上游 5′-CCATTTGCAGTATTCGCTTTG-3′	21	60
(c81256. graph_c0)	下游 3′-TACTGGGTGAACTGTTTAGGT-5′	21	
geranylgeranyl diphosphate synthase	上游 5′-CCACCTACACTCACGAGCATC-3′	21	60
(c83598. graph_c0)	下游 3′-CACTACTAACTCTACCCAGCG-5′	21	
ent-copalyl diphosphate synthase	上游 5′-CTCGTCCACTTCGGAAACCT-3′	20	53
(c64964. graph_c0)	下游 3′-TCCAATCCCAATGACCCAAA-5′	20	
ent-kaurene synthase	上游 5′-GACGGCATTCACATCACTAA-3′	20	53
(c68080. graph_c0)	下游 3′-AAGAAGGAGCCAACATTGTG-5′	20	
isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase	上游 5′-ATACATGCCATATCCCAAAC-3′	20	52
(c72994. graph_c0)	下游 3′-TTACCTCCAATGTTGTCGT-5′	19	
actin	上游 5′-GCCGCCTCCAAGAATCACCTA-3′	21	55
(c66153. graph_c0)	下游 3′-GTAAAGGACACCTGCTATCTA-5′	21	

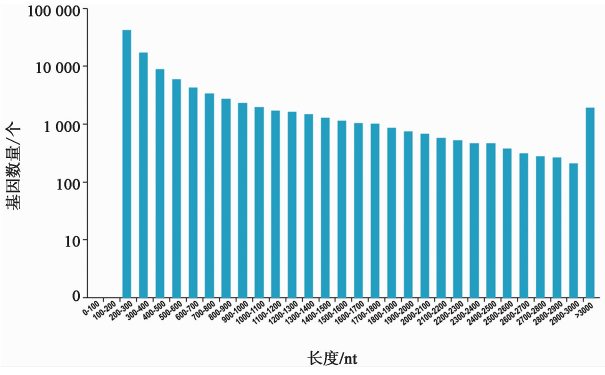


图 1 组装序列长度分布

Fig. 1 Unigene length distribution

3.2 序列比对、功能注释及分类 乌头 6 个器官组织 103 337 个转录序列(unigenes)中,共 38 554 条 unigenes(37.31%)与公共数据库已知基因相匹配,其中 52.82% 与 NR 数据库中的匹配序列表现出较强的同源性($<1\times10^{-45}$),而 47.18% 具备中度同源性(在 1×10^{-5} ~ 1×10^{-45})。对于相似性分布,61.74% 的匹配序列与公共数据库序列相似度高于 60%,而 38.26% 的匹配序列显示相似度在20% ~60%。

在 GO 分析过程中,38 554 个成功获得注释的序列里,20.46% (21 148 个 unigenes)分类入 51 个功能项中,包括 20 个生物过程方面的功能,14 个细胞组成成分功能与 17 个分子功能(图 2)。参与生物合成的"代谢过程"(GO:0008152)有 12 101 个 unigenes,参与"细胞过程"(GO:0009987)有 11 323 个 unigenes,其中"单一生物过程"(GO:0044699)以

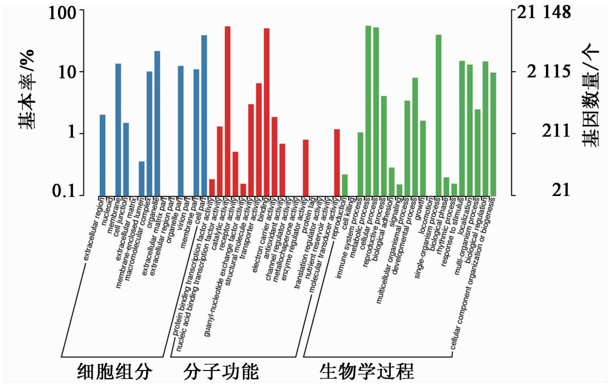
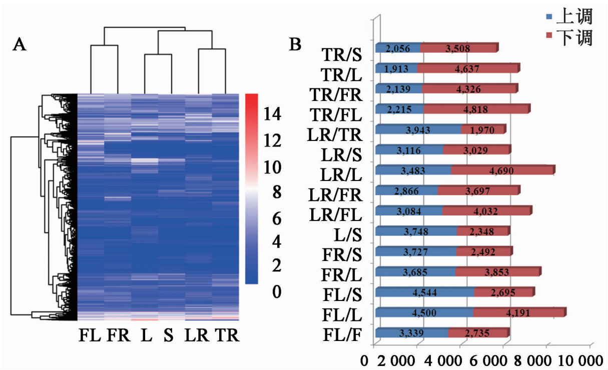


图 2　全转录组序列(unigenes)分类 GO 柱

Fig. 2　Histogram of GO classification of all assembled unigenes

8 661 个 unigenes 为主,对于细胞的组成成分为广大代表的“细胞成分”(GO:0044464,8 504 个 unigenes)和“细胞器”(GO:0043226,4 720 个 unigenes);对于分子功能最丰富的归类为“催化活性”(GO:0003824,11 809 个 unigenes)和“拼接”(GO:0005488,10 979个 unigenes)。

3.3　乌头转录本的差异表达及注释　在乌头的 6 个器官组织的转录本中,有 19 807 个序列(unigenes)显示在至少 2 个器官组织间差异表达量超过 2 倍(log2FC≥2 或者≤ −2)。差异表达最为显著的显示为叶和花之间(8 691个 unigenes),其次为叶和侧根之间(8 173个 unigenes),大多数上调基因出现于花和茎的比较(4 544个 unigenes)(图 3)。研究发现相对于乌头的地上器官(花/果/叶/茎),地下部分(侧根/主根)包含 15 个下调基因。



TR. 主根;LR. 侧根;S. 茎;L. 叶;F. 果实;F. 花(图 4 同)

A. 6 个器官组织中总差异表达热图,样品显示于热图下,颜色深浅表明表达水平从低(蓝色)到高(红色);B. 6 个器官组织间上调和下调基因数量

图 3　乌头 6 个器官组织中所有差异表达基因及表达丰度

Fig. 3　Expression of all differentially expressed genes (DEGs) among six organs in *Aconitum carmichaelii*

对于萜类合成代谢,本次研究确定了 5 条参与其合成的途径,如萜类骨架生物合成(ko00900,62 个 unigenes 和 23 DEGs),二萜生物合成(ko00904,42 个 unigenes 和 17 DEGs),泛醌和其他萜醌的生物合成(ko00130,40 个 unigenes 和 22 DEGs),倍半萜和三萜生物合成(ko00909,8 个 unigenes 和 3 DEGs)以及单萜的合成(Ko00902,6 个 unigenes 和 5 DEGs)。

3.4　乌头萜类生物合成相关基因的鉴定　研究发现了参与萜类的生物合成过程的 5 条通路,这 5 条途径中共包含有获得明确功能注释的 158 个序列(表 2),几乎参与了整个萜类生物合成途径,其中有 9 个基因参与胞浆甲羟戊酸(MEV)途径,15 个基因参与质体-2C-甲基-*D*-赤藓糖醇-4-磷酸盐(MEP)途径,42 个基因参与二萜类生物合成,在这些途径中比较关键的酶有二磷酸甲羟戊酸脱羧酶(MVD),香叶基焦磷酸合成酶(GGPPS),内根-柯巴焦磷酸合成酶(CPS),内根-贝壳杉烯合酶(KS 或 KSL),内根-贝壳杉烯氧化酶(KO),内根-贝壳杉烯羟化酶(KAO),异戊二烯基二磷酸异构酶(IDI 或 IPI)等。

3.5　乌头萜类生物合成相关基因的活性验证　为验证转录组数据库中的萜类生物合成关键基因的转录丰度,课题组使用 Real-time PCR 对其 RNA 中的表达量进行(基因信息及引物序列见表 1,图 4)。结果显示使用 Real-time PCR 方法获得的各基因在乌头 6 个器官中的相对表达丰富与转录组数据基本一致。其中异戊烯基焦磷酸异构酶(c72994 graph_c0)是转录组数据库中转录本最丰富的,其在 PCR 结果中也是表达量信号最强的。

4　讨论

近年来兴起的全转录组测序(RNA sequencing, RNA-Seq)技术使转录组学研究进入了数字化、信息化的时代,通过转录组数据的分析,能够发掘得到新的功能基因和代谢通路,对发展中药品种培育及规范化栽培具有重要意义。在这种背景条件下,利用转录组学研究乌头转录组中已注释的基因、充分挖掘未能够注释的功能分子,从分子机制水平上揭示乌头萜类合成分子机制,将有助于附子优良品种的培育,以保证道地药材的产量及质量。

本次乌头转录组数据库中,发现了与乌头萜类生物合成相关基因的关键酶有 MVD,GGPPS,CPS,KS 或 KSL,KO, KAO, IDI 或 IPI。萜类化合物生物合成过程中,异戊二烯基二磷酸异构酶(IDI 或 IPI)为萜类前体物质 IPP 和二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)异构化过程的限制酶[17]。研究发现 IDI 或 IPI 过度表达可提高杜仲反式聚甲基丁二烯的生成[18],在乌

表 2 乌头中与萜类次级代谢相关的序列(unigenes)数量

Table 2 Number of unigenes related to terpenoid secondary metabolites in *Aconitum carmichaelii* 个

次级代谢通路	Pathway ID	合计	花	果	叶	茎	侧根	主根
萜类骨架生物合成	ko00900	62	57	59	59	58	55	58
二萜生物合成	ko00904	42	34	33	35	36	34	31
泛醌等萜醌类生物合成	ko00130	40	37	35	34	31	33	29
倍半萜及三萜生物合成	ko00909	8	6	6	5	6	7	6
单萜生物合成	ko00902	6	6	6	6	6	5	6

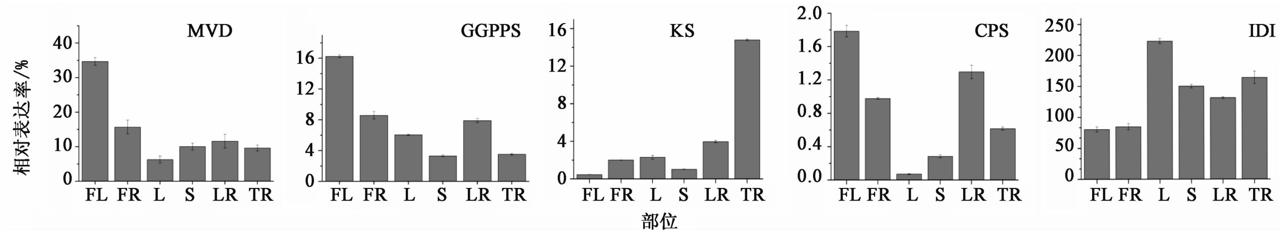


图 4 乌头萜类代谢重要基因序列的 Real-time PCR 验证

Fig. 4 Real-time PCR verification for some important unigenes in terpenoid metabolic pathways

头转录组数据库中,c72994. graph_c0 序列与 IDI/IPI 基因具有较好的相似度,通过 Real-time PCR 技术,其在所有器官中均可检测到表达,尤其显示在叶中含量最为丰富,这种转录模式与长春花中的 *CrIDI*1 基因和丹参中的 *SmIPI*1 基因相一致[19-20]。

乌头转录组本中的 7 个 GGPPS 序列(unigennes)经测序发现有 4 个(c67274. graph_c1, c76338. graph_c0, c79809. graph_c0 和 c75217. graph_c0)在叶中表达最高,有 2 个(c2937. graph_c0 和 c82780. graph_c0)在主根中,1 个(c83598. graph_c0)在花中。c76338. graph_c0 基因表达水平表现出最大的组织差异性,其在叶片中表达是植物其他部分的 8~180 倍,因此推测附子 GGPPS 基因可能与甘薯中的 IbGGPS 蛋白有着相似的分布部位[21],即都存在于叶片的质膜和叶绿体的特定区域,与色素合成密切相关。也正因为如此,GGPP 经常用来作为类胡萝卜素相关基因工程的研分子材料。作为一个同源性基因家族,GGPPSs 在植物中可能扮演着多种角色,例如雷公藤里的 TwGGPPS4 和 TwGGPPS5 蛋白参与了次丹参酮二烯生物合成,TwGGPPS1 和 TwGGPPS4 可能参与了雷公藤内酯的生物合成[22];在拟南芥中的 GGPPSs 可增强抗渗透胁迫和增加类胡萝卜素的含量[23-24]。利用其分子表达的相关分析和次生代谢产物积累探索乌头 GGPPS 的附子品质形成相关的功能,这将是一个可行的方法,也是分子生药学在中药材研究中的主要策略之一。

CPS(12 个 unigenes)和 KSL(8 个 unigenes)在乌头转录本中是最丰富的,且都是二萜合成酶(diTPS)家族的关键成员。在丹参中 SmCPS 和 SmKSL 逐步催化 GGPP 生成次丹酮二烯;穿心莲中的 *ApCPS*2 也能催化合成香叶基焦磷酸(GGPP)[8]。类似于 *ApCPSs* 基因,乌头转录组中的 c70404. graph_c2 和 c86542. graph_c0 也在叶片中优先表达,然而 12 个 CPSs 蛋白中的 7 个蛋白在叶中未检测到转录活性,尤其是 c110247. graph_c0 和 c35028. graph_c1 只能在侧根和生殖器官中被分别检测到,这表明这些序列可能在乌头的不同器官中发挥着不同的功能。CPS 基因的生物学作用差异在一些植物如水稻中被证实,其 OsCPS1 的转录主要位于维管束组织内,类似于拟南芥的 CPS,其负责赤霉素的生物合成,而 OsCPS2 转录主要位于表皮细胞内以抵抗环境压力如病原体攻击[25],由此提示乌头 CPSs 蛋白中的 c110247. graph_c0 和 c35028. graph_c1 或许可以应对环境压力,有抵抗病原体攻击的能力,可为附子根腐病找到应对方法。

此外,本次研究发现的下调基因主要集中于几个功能类别,如光和作用(GO:0015979,GO:0009765,GO:0009773),光合体系(GO:0009538,GO:0009522,GO:0009523,GO:0009654),叶绿素合成(GO:0016168)和电子载体活性(GO:0009055)。因为乌头根系中缺乏叶绿体,所以与地上器官相比,根部组织的光合系统相关基因较少表达或不表达。然而相比于地上器官,乌头根中也发现有 62 个上调 unigenes,这其中包括了 9 个组织特异性序列,如内根-贝壳杉烯合酶(c74022. graph_c0, $\log_2 FC = 5$),病菌相关蛋白样基因(Pathogen -related protein -like, c30671. graph_c0, $\log_2 FC = 5.9$)等,它们大多数参与了光合作用-天线蛋白代谢(ko00196)和植物激素信

号转导(ko04075)途径。内根-贝壳杉烯合酶是 1 个催化二萜合成的关键酶,其主要在根中表达尤其是乌头的侧根中,或许这个蛋白酶基因在乌头各器官中的表达量与各自器官中的二萜类含量有着某种关系。

此次研究组织特异性序列中出现了病菌相关蛋白样基因,其在根中含量最多,其次是茎和叶,而花和果中未能检测到,其转录水平似乎呈现出与土壤距离的负关性,很可能受到土壤微生物的影响,这类基因的挖掘与功能研究,在农业化种植的附子作物日益被根腐病、白绢病侵害的状况下,显得尤为必要和重要,也是目前国内附子研究课题中被忽略的方向。

[参考文献]

[1] Singhuber J, ZHU M, Prinz S, et al. Aconitum in traditional Chinese medicine: a valuable drug or an unpredictable risk? [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 126 (1):18-30.

[2] TAI C J, El-Shazly M, WU T Y, et al. Clinical aspects of Aconitum Preparations[J]. Planta Med, 2015, 81 (12/13):1017-1028.

[3] ZHOU G, TANG L, ZHOU X, et al. A review on phytochemistry and pharmacological activities of the processed lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 160(3):173-193.

[4] Shim S H, Lee S Y, Kim J S, et al. Norditerpenoid alkaloids and other components from the processed tubers of *Aconitum carmichaeli* [J]. Arch Pharm Res, 2005, 28(11):1239-1243.

[5] 房凯. 植物激素生理作用与检测技术的研究现状及进展[J]. 安徽农学通报, 2010, 6(8):35-36.

[6] 付佳, 王洋, 阎秀峰. 萜类化合物的生理生态功能及经济价值[J]. 东北林业大学学报, 2003, 31(6):59-62.

[7] ZHU X, ZENG X, SUN C, et al. Biosynthetic pathway of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*[J]. Front Med, 2014, 8(3):285-293.

[8] Garg A, Agrawal L, Misra R C, et al. Andrographis paniculata transcriptome provides molecular insights into tissue-specific accumulation of medicinal diterpenes[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1):659-667.

[9] 官玲亮, 夏奇峰, 庞玉新, 等. 艾纳香萜类物质生物合成途径分析[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(9):1585-1591.

[10] 朱畇昊, 赵乐, 董诚明, 等. 地黄环烯醚萜合成后修饰相关基因的挖掘与分析[J]. 现代食品科技, 2016, 32(10):84-89.

[11] 吴琼. 三种产萜类药用植物转录组分析和产地适宜性研究[D]. 北京:中国协和医科大学, 2010.

[12] 杨丽华, 林丽美, 王智民, 等. 乌头属藏药化学成分研究进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 41(3):362-376.

[13] 查良平, 杨健, 刘爽, 等. 厚朴 1-脱氧-*D*-木酮糖-5-磷酸合成酶基因的鉴定及挥发油成分分析[J]. 中国中药杂志, 2015, 46(24):3734-3739.

[14] 杨君. 朱砂根的转录组测序及与三萜皂苷合成相关基因的差异分析[D]. 成都:四川农业大学, 2015.

[15] 蒋研风羊. MeJA 诱导白木香不定根产生倍半萜类物质的研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2015.

[16] LI Y, LUO H M, SUN C, et al. EST analysis teveals putative genes involved in glycyrrhizin biosynthesis [J]. BMC Genomics, 2010, 11(1):268-279.

[17] Berthelot K, Estevez Y, Deffieux A, et al. Isopentenyl diphosphate isomerase: a checkpoint to isoprenoid biosynthesis[J]. Biochimie, 2012, 94(8):1621-1634.

[18] Chen R, Harada Y, Bamba T, et al. Overexpression of an isopentenyl diphosphate isomerase gene to enhance trans-polyisoprene production in *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. BMC Biotechnol, 2012, 12(1):78-90.

[19] Guirimand G, Guihur A, Phillips M A, et al. A single gene encodes isopentenyl diphosphate isomerase isoforms targeted to plastids, mitochondria and peroxisomes in *Catharanthus roseus*[J]. Plant Mol Biol, 2012, 79(4/5):443-459.

[20] ZHANG X, GUAN H, DAI Z, et al. Functional analysis of the isopentenyl diphosphate isomerase of *Salvia miltiorrhiza via* color complementation and RNA Interference [J]. Molecules, 2015, 20 (11): 20206-20218.

[21] CHEN W, HE S, LIU D, et al. A sweetpotato geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene, IbGGPS, increases carotenoid content and enhances osmotic stress tolerance in arabidopsis thaliana[J]. PLoS One, 2015, 10(9):e0137623.

[22] ZHANG M, SU P, ZHOU Y J, et al. Identification of geranylgeranyl diphosphate synthase genes from *Tripterygium wilfordii* [J]. Plant Cell Rep, 2015, 34 (12): 2179-2188.

[23] Beck G, Coman D, Herren E, et al. Characterization of the GGPP synthase gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 2013, 82(4/5):393-416.

[24] Ruiz-Sola M A, Coman D, Beck G, et al. Arabidopsis GERANYLGERANYL DIPHOSPHATE SYNTHASE 11 is a hub isozyme required for the production of most photosynthesis-related isoprenoids [J]. New Phytol, 2016, 209(1):252-264.

[25] Toyomasu T, Usui M, Sugawara C, et al. Transcripts of two ent-copalyl diphosphate synthase genes differentially localize in rice plants according to their distinct biological roles[J]. J Exp Bot, 2015, 66(1):369-376.

[责任编辑 邹晓翠]