

• 药材与资源 •

铁皮石斛倍半萜合成酶基因的克隆与表达分析

沈王琴, 陈龙龙[#], 张传明, 林毅, 蔡永萍, 樊洪泓^{*}

安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036

摘要: 目的 克隆铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 倍半萜合成酶 (sesquiterpene synthase, SES) 基因, 分析其在铁皮石斛不同组织中的表达差异以及在信号分子茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 诱导下的表达模式。方法 采用 RACE 技术克隆铁皮石斛 SES (DoSES) cDNA 全长, 利用相关软件和在线网站对其进行生物信息学分析, 并使用实时荧光定量 PCR 技术分析 DoSES 的表达模式。结果 获得的 DoSES cDNA 序列 (GenBank 登录号为 KX278311) 全长 1 890 bp, 含有 1 个 1 659 bp 的完整开放阅读框 (ORF), 编码 552 个氨基酸的多肽链, 与其他科属植物的同源性达到 60% 左右。DoSES 基因在铁皮石斛茎中表达量最高, 从高到低依次是叶、花、原球茎、根; 且受到 MeJA 的诱导。结论 克隆了铁皮石斛 DoSES 基因, 为进一步研究调控铁皮石斛萜类代谢奠定了理论基础。

关键词: 铁皮石斛; 倍半萜合成酶; 基因克隆; RACE 技术; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)23-4963-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.23.023

Cloning and expression analysis of sesquiterpene synthase gene in *Dendrobium officinale*

SHEN Wang-qin, CHEN Long-long, ZHANG Chuan-ming, LIN Yi, CAI Yong-ping, FAN Hong-hong

School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: **Objective** To clone the full-length cDNA encoding sesquiterpene synthase (SES) gene from *Dendrobium officinale* (DoSES), then to analyze the expression difference in different tissues and expression patterns of DoSES induced by methyl jasmonate (MeJA). **Methods** RACE was used to clone the full length cDNA of DoSES. Bioinformatics analysis was carried out by using related software and online website. Then, the expression patterns of DoSES were studied by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **Results** The DoSES gene was obtained (GenBank accession number KX278311), and the full-length cDNA was 1 890 bp, encoding the protein of 520 amino acids. DoSES had highest homology ($\approx 60\%$) with SES proteins from other plants. Tissue expression analysis showed that DoSES had the highest expression in the stems, followed by leaves, flowers, protocorm and roots. The results of qRT-PCR analysis suggested that DoSES could be induced by MeJA. **Conclusion** The cDNA encoding DoSES was cloned. The research results provide basic materials for further function analysis of this gene in the future.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; sesquiterpene synthase; gene cloning; RACE; expression analysis

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, 多年生附生草本植物, 是石斛属药用植物的一种, 《中国药典》2015 年版收载了金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl.、鼓槌石斛 *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. 或流苏石斛 *Dendrobium fimbriatum* Hook. 的栽培品及其同属植物的新鲜或干燥茎作为石斛的来源。铁皮石斛是最为珍稀名贵

的品种之一, 其味甘, 性微寒, 归胃、肾经。主要药用功效为益胃生津、滋阴清热、用于阴伤津亏、口干烦渴、食少干呕、病后虚热、目暗不明^[1]。铁皮石斛的成分多种多样, 其中主要有效化学成分为水溶性多糖、生物碱、氨基酸、微量元素, 另外还有酚类、萜类、甙类、甾酮类、倍半萜类、甾体类及香豆素类等^[2]。多糖和生物碱是铁皮石斛最主要

收稿日期: 2017-05-08

基金项目: 安徽省教育厅自然科学重点项目 (KJ2015A005); 安徽省大学生创新创业训练计划项目 (201610364059)

作者简介: 沈王琴 (1991—), 女, 安徽宿松人, 硕士在读, 研究方向为药用植物分子生物学。E-mail: 1976269715@qq.com

*通信作者 樊洪泓 (1980—), 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为药用植物生物技术。

Tel: (0551)65786216 E-mail: hhfan0551@126.com

[#]为共同第一作者

的药用成分。多糖具有提高免疫系统^[3]和抗氧化的功效^[4]。生物碱有很好的抗肿瘤、退热止痛、抑制心血管等疾病等功效^[5]。多年的研究表明,石斛属植物中的生物碱多属于倍半萜类生物碱或萜类吡啶生物碱^[6],2种生物碱的生物合成都起源于萜类合成途径。植物的萜类物质生物合成有2条途径,即位于细胞质中的甲羟戊酸(MVA)途径和位于质体中的2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)途径^[7]。2条途径都生成萜类结构单位——异戊烯基焦磷酸(IPP)及其异构体二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)。倍半萜类合成酶属于萜类合成酶家族中TPSa亚家族,能对由IPP和DMAPP融合形成的异戊二烯焦磷酸链法尼基焦磷酸(FPP)直接催化环化或重排生成倍半萜骨架。然后倍半萜骨架由内质网上的一些酶修饰形成倍半萜^[7]。

目前,已有研究对拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh^[8]、番茄 *Solanum lycopersicum* L.^[9]等植物中的整个萜类合成酶基因家族进行了深入分析。而倍半萜合成酶基因也已从白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg.^[10-11]、白姜花 *Hedychium coronarium* Koenig^[12]等多种药用植物中得到分离,但在铁皮石斛中仍未见报道。本实验以铁皮石斛为材料,利用本实验室已经获得的铁皮石斛转录组数据,结合 RACE 技术克隆铁皮石斛倍半萜合成酶(DoSES) cDNA 全长,并对其序列进行生物信息学分析,利用实时荧光定量 PCR 分析其在不同组织器官中的特异性表达,以及茉莉酸甲酯(MeJA)诱导下的表达模式,为进一步研究 DoSES 在铁皮石斛萜类物质生物合成途径中的作用提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

铁皮石斛组培苗和类原球茎取自本实验室,经安徽农业大学生命科学学院蔡永萍教授鉴定为铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒 V1.5 购自成都百菲特科技有限公司; SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒、PrimeScript™ RT Reagent Kit、pMD18-T 载体试剂盒、PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 购自 TaKaRa 公司; pEASY-Blunt Simple Cloning Kit、TransStart Tip Green qPCR Mix 购自北京全式金公司。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 合成

取新鲜的铁皮石斛组培苗 0.1 g,用灭菌水清洗

去除残留培养基,并用滤纸吸干,液氮中迅速研磨成粉末,然后按照成都百菲特公司的植物 RNA 提取试剂盒 V1.5 说明书进行总 RNA 提取。利用超微量分光光度计检测 RNA 浓度和质量。并以此为模板按照 FastQuantRT Kit (Tiangen 公司) 说明书进行 cDNA 第一条链合成。

2.2 引物设计

通过对课题组已完成的铁皮石斛转录组数据进行分析,注释到 1 个 SES 基因的 cDNA 片段,利用 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa 公司) 试剂盒将石斛总 RNA 反转录成 cDNA,并利用设计出的特异性引物(表 1)进行末端扩增。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Names and sequences of primers

用途	引物名称	引物序列(5'-3')
3'RACE	SES-3-OUT	GCCAATGCCTTCCTCTGAGACT
	SES-3-IN	GACTACTGAGGCAGCAACGATT
5'RACE	SES-5-OUT	CTTGCTTCTAGCCTTTCAGTTC
	SES-5-IN	GAAATCGTTGCTGCCTCAGTAG
全长	SES-CDS-S	GAATGACATATGCTGAATCATCTA
	SES-CDS-AS	GACCACTTTGACAAAATAGGTTCC
qRT-PCR	SES-Q-S	AATGGTGGAGGATGCATGGAA
	SES-Q-AS	GAGCCGAAGGGATTGGTGTA
	β-actin-S	TCCCAAGGCAAACAGAGAAA
	β-actin-AS	GGCCACTAGCATATAGGGAAAG

2.3 DoSES 基因的 RACE 扩增及全长 cDNA 序列的获得

按照 RACE 试剂盒说明书分别对 SES 基因的 3'和 5'端进行巢式 PCR 扩增,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,根据 DNA 胶回收试剂盒说明书对目的片段进行回收,然后连接克隆载体 pMD18-T,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,经 LB 固体培养基过夜培养后,挑取单菌落经菌液 PCR 鉴定后委托上海生工进行测序。测序完成后利用 DNAMAN 软件将 SES 基因的 3'和 5'端序列进行拼接,获得该基因的全长 cDNA 序列。

根据拼接得到的全长序列,分别在 5'和 3'端设计带有酶切位点的特异性引物 SES-CDS-S、SES-CDS-AS(表 1),进行 PCR 扩增获得目的基因,PCR 反应体系为 50 μL,其中正反向引物各 2 μL,模板 cDNA 2 μL,Prime STAR Max Premix 2× (TaKaRa 公司) 25 μL,用 ddH₂O 补充至总体积 50

μL; 反应程序为 94 °C、5 min, 94 °C、45 s, 58.5 °C、45 s, 72 °C、2 min, 35 个循环; 72 °C、10 min。PCR 产物回收后, 连接克隆载体 pEASY-Blunt, 同法测序。

2.4 DoSES 基因的生物信息学分析

将所获得的 DoSES 基因编码的氨基酸序列在 GenBank 数据库中进行 Blast P 比对分析, 利用 DNAMAN 对其他物种的 SES 基因编码的氨基酸序列进行同源性分析。通过 MEGA6.0 软件中的 Neighbor-Joining 法构建 DoSES 与其他物种 TPS 蛋白的系统进化树。在线网站分析, 预测相对分子质量及等电点 (<http://web.expasy.org/protparam/>), 进行疏水性分析 (<http://web.expasy.org/protscale/>), 跨膜结构分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>), 预测信号肽 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), 亚细胞定位分析 http://www.cbs.dtu.dk/services/Target_P-1.1/output_php), 蛋白质的二级结构分析 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html), 蛋白质的三级结构分析 (<https://www.swissmodel.expasy.org/interactive>)。

2.5 DoSES 基因的表达分析

将 MeJA (Sigma 公司) 母液滤过除菌溶于已高温灭菌的 MS 培养液中得到终浓度 100 μmol/L 的 MeJA 培养液。取铁皮石斛原球茎转入以上培养液中, 进行悬浮培养, 在 MeJA 培养液中培养的原球茎分别在 2、4、8、12、24、48、72 h 取样, 3 个生物学重复, 取样后立即放入液氮中速冻, 并移至 -80 °C 冰箱保存备用。

采用成都百菲特公司植物 RNA 提取试剂盒

V1.5 说明书分别提取保存样品的总 RNA, 同种方法分别提取铁皮石斛原球茎、根、茎、叶、花总 RNA; 利用超微量分光光度计检测 RNA 浓度和质量。将上述的总 RNA 用 PrimeScript™ RT Reagent Kit (TaKaRa 公司) 反转录成 cDNA。以持家基因 β-actin^[13] (β-actin-S 和 β-actin-AS, 表 1) 为内参, 检测 DoSES 基因的相对表达量。根据 SES 基因的全长 cDNA 序列采用 Primer Premier 6.0 设计实时荧光定量 PCR 引物 SES-Q-S、SES-Q-AS (表 1), 预计扩增片段长度为 100~250 bp。实时荧光定量 PCR 采用 20 μL 反应体系: 10 μL TransStart Tip Green qPCR Mix, 2 μL cDNA, 0.8 μL SES-S 和 SES-AS; 反应程序为 95 °C、30 s, 95 °C、5 s, 60 °C、34 s, 40 个循环。试验进行 3 次重复; 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来计算基因相对表达量。

3 结果与分析

3.1 DoSES 基因全长的克隆

以铁皮石斛总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 利用转录组测序注释到的一个 SES 基因的 cDNA 片段设计 3'RACE 和 5'RACE 引物, 进行 PCR 扩增, 获得 SES 基因的 3'端 1 417 bp (图 1-A) 和 5'端 473 bp (图 1-B)。利用 DNAMAN 进行序列拼接, 得到 SES 基因全长, 然后使用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物, 以铁皮石斛的 cDNA 为模板进行 SES 基因的全长扩增, 得到 cDNA 全长, 为 1 659 bp (图 1-C)。通过开放阅读框 (ORF) 软件分析, 结果显示拼接序列具备完整基因的序列, ORF 长度为 1 659 bp, 编码 552 个氨基酸, 命名为 DoSES, 并提交 GenBank 数据库 (登录号 KX278311)。

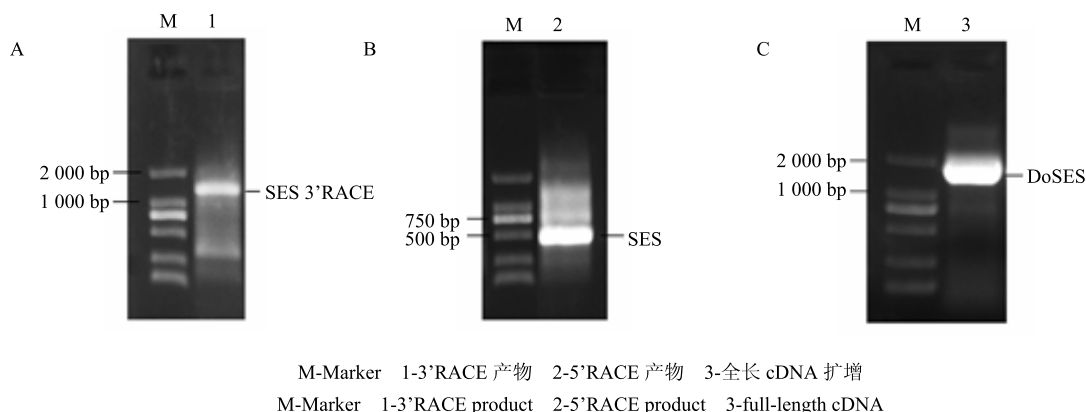


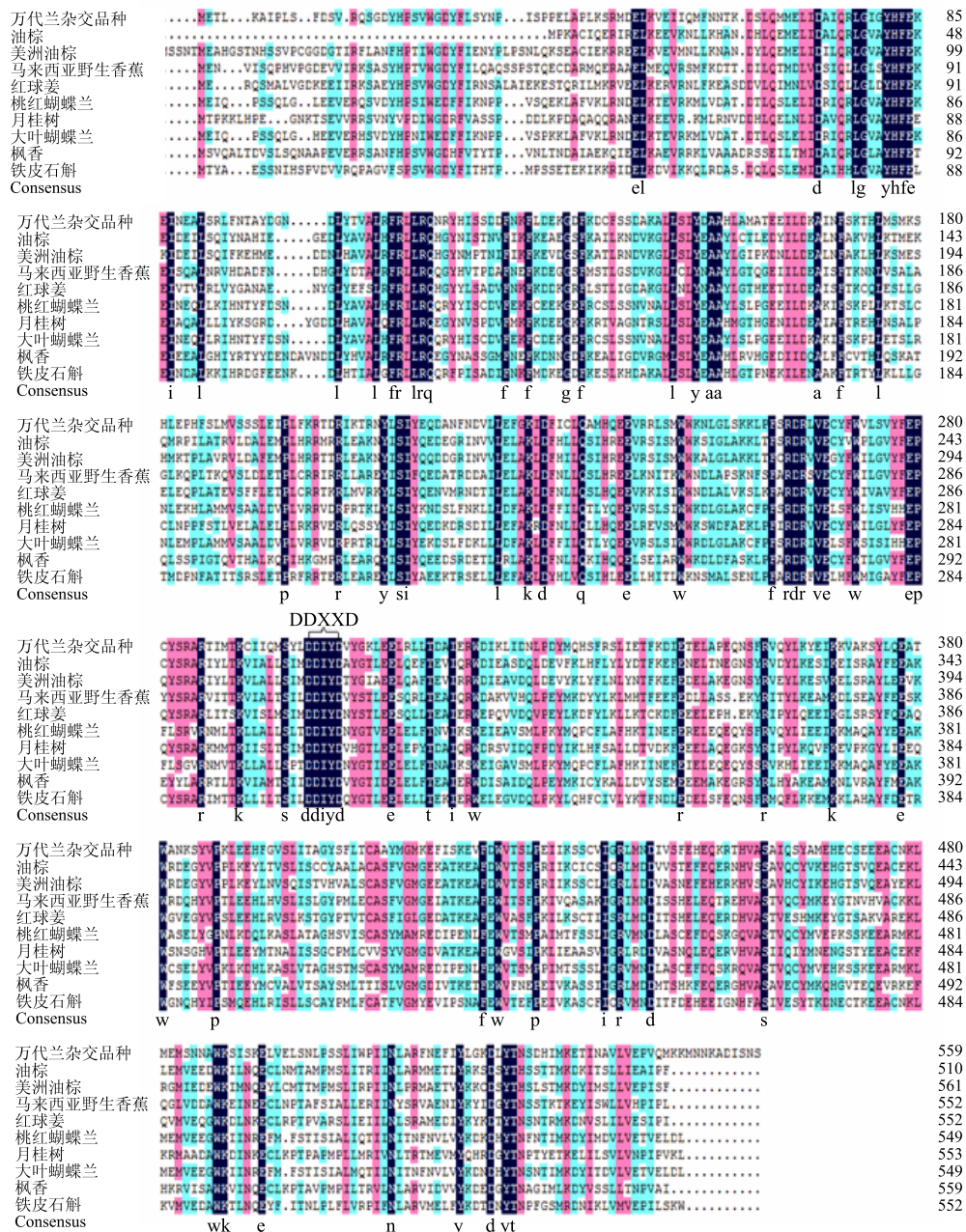
图 1 DoSES 基因全长 cDNA 扩增

Fig. 1 Clone of full-length cDNA of DoSES

3.2 DoSES 基因生物信息学分析

将铁皮石斛 DoSES 编码的氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blast P 比对, 发现与多个其他植物倍半萜合成酶具有较高的相似性, 通过 DNAMAN 软件与多种植物进行比对分析 (图 2), 比对结果表明相似性最高的是万代兰杂交种倍半萜合成酶 (sesquiterpene synthase, ABX57720.1), 达 46.81%, 与油棕草烯合成酶 (alpha-humulene synthase, XP_01090538.2)

基因, 美洲油棕倍半萜合成酶 (sesquiterpene synthase, AAC31570.2) 基因, 马来西亚野生香蕉草烯合成酶 (alpha-humulene synthase-like isoform X1, XP_009410179.1) 基因, 红球姜倍半萜合成酶 3 (sesquiterpene synthase 3, BAG50433.1) 基因, 桃红蝴蝶兰萜烯合酶 (terpene synthase, ABW98503.1) 基因, 月桂树萜类合成酶 1 (terpene synthase 1, AKQ19357.1) 基因, 大叶蝴蝶兰萜烯



深蓝色表示完全相同, 其他颜色表示部分相同

Navy blue represent identical and others represent partly identical

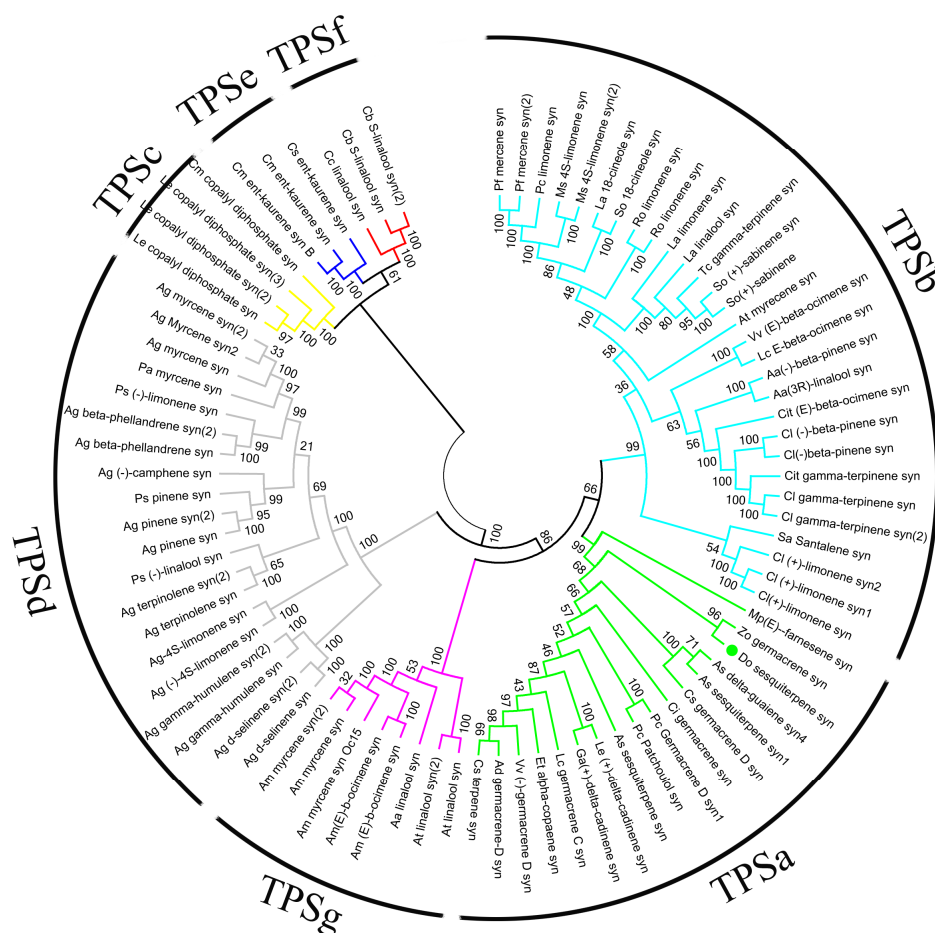
图 2 铁皮石斛与其他植物 SES 氨基酸序列同源性比对

Fig. 2 Homologous comparison of amino acid sequence of SES in *D. officinale* and other plants

合酶 (terpene synthase, ABW98504.1) 基因, 枫香萜类合成酶 1 (terpene synthase1, AIO10964.1) 基因也有较高同源性, 分别为 44.30%、43.01%、44.60%、45.42%、43.66%、42.31%、42.57%、41.00%。将 DoSES 和几个相似性较高的蛋白氨基酸序列共同比对, 结果显示 DoSES 基因具有倍半萜合成酶亚家族典型的保守序列 DDXXD, 推测其可能编码植物倍半萜类合成酶蛋白。萜类合成酶根据其氨基酸序列的相关性, TPS 家族分为 7 个亚家族 (TPSa~TPSg), 同一亚家族的不同成员之间至少有 40% 的同源性^[14]。与被子植物次生代谢相关的萜类合成酶聚类为 TPSa 和 TPSb, TPSa 由大部分的倍半萜合

成酶和二萜合成酶组成^[12]。DoSES 基因编码的氨基酸序列与 GenBank 中其他物种萜类合成酶的氨基酸序列进行同源性比对, 使用 MEGA6.0 软件中的 NJ 法构建进化树 (图 3), 从结果可以看出, 本课题研究的的目的基因 DoSES 被分到主要由被子植物倍半萜合成酶基因组成的 TPSa 亚家族, 可确定其编码倍半萜类合成酶蛋白。

利用在线网站 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测 DoSES 蛋白相对分子质量为 64 918.53, 等电点 5.4, 化学式 $C_{2946}H_{4536}N_{754}O_{848}S_{26}$ 。利用网上跨膜结构分析程序 Expasy 的 HMMHMM Server V.2.0 服务器对 DoSES 蛋白进行跨膜结构预测, 结果分



As-沉香 Cs-甜橙 Ad-猕猴桃 Vv-葡萄 Et-五加 Le-番茄 Pc-广藿香 Cl-柠檬 Cit-蜜柑 So-鼠尾草 Tc-百里香 La-薰衣草 Ms-薄荷 Pf-紫苏 Ro-迷迭香 Sa-檀香 Am-金鱼草 Aa-软枣猕猴桃 At-拟南芥 Ag-大冷杉 Ps-北美云杉 Pa-云杉 Cm-笋瓜 Cb-仙女扇 Cc-克拉花 Pf-白紫苏 Lc-光叶百脉根 Ci-菊苣属 Ga-棉花 Mp-薄荷属 Zo-姜 Do-铁皮石斛

As-Aquilaria crassna Cs-Citrus sinensis Ad-Actinidia deliciosa Vv-Vitis vinifera Et-Eleutherococcus trifoliatus Le-Solanum lycopersicum Pc-Pogostemon cablin Cl-Citrus limon Cit-Citrus unshiu So-Salvia officinalis Tc-Thymus caespitius La-Lavandula angustifolia Ms-Mentha spicata Pf-Perilla frutescens Ro-Salvia rosmarinus Sa-Santalum album Am-Antirrhinum majus Aa-Actinidia arguta At-Arabidopsis thaliana Ag-Abies grandis Ps-Picea sitchensis Pa-Picea abies Cm-Cucurbita maxima Cb-Clarkia breweri Cc-Clarkia concinna Pf-Perilla frutescens Lc-Lotus japonicus Ci-Cichorium intybus Ga-Gossypium arboreum Mp-Mentha x piperita Zo-Zingiber officinale Do-Dendrobium candidum

图 3 植物萜类合成酶基因家族系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of genes in plant TPS family

析表明无跨膜结构。通过 ProtScale 工具亲水性/疏水性分析表明, DoSES 蛋白的最高值为 2.133 在第 300 位, 疏水性最强, 在第 385 位的最低值为 2.633, 亲水性最强。疏水氨基酸的数值小于亲水氨基酸的数目, 所以推断该蛋白为亲水性蛋白质。在网站 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 预测 DoSES 蛋白无信号肽。蛋白亚细胞定位分析 DoSES 蛋白定位于叶绿体的机率是 0.136, 线粒体为 0.169, 其他细胞器为 0.641。利用 SOPMA 预测 DoSES 蛋白的二级结构, 结果显示 DoSES 蛋白由 α -螺旋、伸展链、 β -转角和无规卷曲组成。其中 α -螺旋共 349 个, 占总氨基酸的 63.22%; β -转角 30 个, 占总氨基酸的 5.43%; 伸展链 51 个, 占总氨基酸的 9.24%; 无规卷曲 122 个, 占总氨基酸的 22.10%。在 SWISS-MODEL 上对 DoSES 编码的蛋白质进行三级结构预测 (图 4), 用于建立三级结构模型的氨基酸残基为 16~550 位, 以 [4rnq.1.A] 蛋白为模板, 同源性和为 36.02%。



图 4 铁皮石斛 DoSES 蛋白的三级结构预测

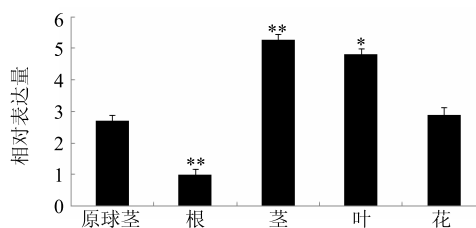
Fig. 4 Predicted 3D structure of DoSES in *D. officinale*

3.3 DoSES 基因在铁皮石斛中的组织特异性表达分析

利用实时荧光定量 PCR 技术, 选择持家基因 β -actin^[13] 为内参, 对铁皮石斛不同组织部位即原球茎、根、茎、叶和花中 DoSES 基因相对表达量进行分析。结果显示, DoSES 基因在铁皮石斛各组织中都有表达, 在根中的表达量最低, 茎中的表达量最高, 其次是叶, 原球茎和花中表达量接近。其中茎中该基因的表达量是根中的 5.2 倍。

3.4 DoSES 基因在信号分子 MeJA 诱导下的表达模式分析

MeJA 是重要的植物激素, 也是植物体内重要的信号分子, 不仅可调控植物的初生代谢, 如调节植物生长, 而且参与植物的次生代谢过程^[15]。实验结果表明 (图 6), DoSES 表达量在 MeJA 处理后的趋势都是先上升后下降, 在 MeJA 处理 24 h 后,



*表示差异性显著, $P < 0.05$ **表示差异性极显著, $P < 0.01$, 下同

*indicates that the difference is significant **indicates that the difference is very significant, same as below

图 5 DoSES 基因在铁皮石斛中的组织特异性表达分析

Fig. 5 Tissue-specific expression of DoSES in *D. officinale*

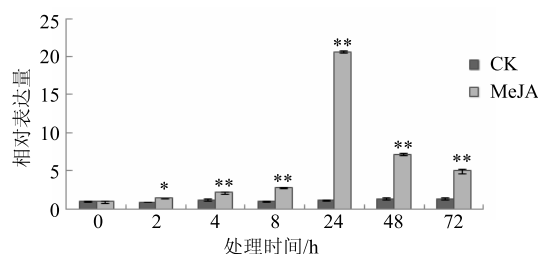


图 6 MeJA 诱导下的 DoSES 基因表达模式分析

Fig. 6 Methyl jasmonate induced expression patterns of DoSES

基因表达量达到峰值, 与对照相比提高了 19 倍; 在 48 h 后出现下降的趋势。

4 讨论

铁皮石斛是我国的传统名贵中药材, 是石斛中的上品, 具有重要的药用价值和保健功效。而萜类化合物是主要的药效成分之一^[16]。本课题从铁皮石斛中克隆出萜类合成途径下游关键酶萜类合酶基因家族中的一个成员——DoSES。萜类合酶是萜类化合物合成的直接催化者。研究表明, DoSES 全长 1 890 bp, 编码了 552 个氨基酸; 同源性和分析表明 DoSES 与其他植物 SES 具有较高同源性, 并发现含有倍半萜合成酶亚家族典型的保守序列 DDXXD; 同时由进化树的聚类结果可知, DoSES 基因编码的蛋白质与其他倍半萜合酶一起被分到 TPSa 亚家族, 说明其编码的蛋白可能是倍半萜合成酶。研究发现倍半萜合成酶没有信号肽, 定位于细胞质中^[17], 对 DoSES 编码的蛋白的生物信息学分析结果与先前的研究一致, 进一步确定 DoSES 是倍半萜合成酶。

DoSES 基因的组织表达特异性分析表明, 其在不同组织均有表达, 但存在一定的差异。DoSES 基因在茎、叶、花中的表达量均高于对照 (原球茎),

在茎中的表达量最高。这与在丹参中的4个倍半萜合酶基因的表达特征不同,丹参的4个基因在叶中的表达量相对较高,茎中的表达量均最少^[18]。这表明同种基因在不同植物的不同组织部位表达量存在很大差异,而同一植物不同部位基因的表达量也有很大区别。有研究表明,直接添加外源信号分子也能调控萜类化合物的合成,例如长春花萜类吲哚生物碱合成研究中发现一些外源信号分子或诱导子诸如真菌诱导子(YE)、茉莉酸(JA)、乙烯、一氧化氮(NO)以及水杨酸也能够通过协同或拮抗的方式介导萜类化合物合成的调控^[19]。本实验中,添加MeJA 24 h后,基因表达量比对照提高了19倍,这与玉米中的一个倍半萜合酶TPS10表达受JA的诱导^[20]类似,表明DoSES基因的表达也受到JA的诱导。研究DoSES基因在铁皮石斛中的不同组织中的表达特征以及MeJA处理后的基因表达变化对研究调控萜类代谢具有一定的指导作用。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 邹成勇, 刘 燕. 我国石斛属植物研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(12): 6164-6166.
- [3] Liu X F, Zhu J, Ge S Y, *et al.* Orally administered *Dendrobium officinale* and its polysaccharides enhance immune functions in BALB/c mice [J]. *Nat Prod Commun*, 2011, 6(6): 867-870.
- [4] 杨兵勋, 于善凯, 孙继军, 等. 铁皮石斛与大豆异黄酮提取物协同抗氧化作用评价 [J]. 中国现代应用药学, 2009(11): 885-887.
- [5] 郭 勇, 程晓磊. 石斛在恶性肿瘤治疗中的作用 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2007, 17(7): 454-455.
- [6] Guo X, Li Y, Li C, *et al.* Analysis of the *Dendrobium officinale* transcriptome reveals putative alkaloid biosynthetic genes and genetic markers [J]. *Gene*, 2013, 527(1): 131-138.
- [7] Lange B M, Ahkami A. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes-current status and future opportunities [J]. *Plant Biotechnol J*, 2012, 11(2): 169-196.
- [8] Aubourg S, Lecharny A, Bohlmann J. Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Molecular Genet Genomics*, 2002, 267(6): 730-745.
- [9] Falara V, Akhtar T A, Nguyen T T, *et al.* The tomato terpene synthase gene family [J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(2): 770-789.
- [10] 何 欣, 叶 伟, 高晓霞, 等. 白木香倍半萜合成酶As-SesTPS1基因的克隆、生物信息学和表达分析 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 733-739.
- [11] 吴宏清, 王 磊, 何 欣, 等. 白木香倍半萜合成酶基因As-SesTPS的克隆及生物信息学与表达分析 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 94-101.
- [12] 李瑞红, 范燕萍, 余让才, 等. 白姜花倍半萜合成酶基因的克隆及表达 [J]. 园艺学报, 2008, 35(10): 1527-1532.
- [13] Jin Q, Yao Y, Cai Y, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Dendrobium* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62352.
- [14] Cheng A X, Lou Y G, Mao Y B, *et al.* Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions [J]. *J Integr Plant Biol*, 2007, 49(2): 179-186.
- [15] Wang Q J, Zheng L P, Sima Y H, *et al.* Methyl jasmonate stimulates 20-hydroxyecdysone production in cell suspension cultures of *Achyranthes bidentata* [J]. *Plant Omics*, 2013, 6(2): 116-120.
- [16] 吴秋菊, 武梅娟, 王 翔, 等. 铁皮石斛1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因的克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 405-411.
- [17] 孙 晋. 番茄萜类化合物生物合成途径相关酶基因的克隆与分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [18] Cui M, Lin Y, Zu Y, *et al.* Ethylene increases accumulation of compatible solutes and decreases oxidative stress to improve plant tolerance to water stress in *Arabidopsis* [J]. *J Plant Biol*, 2015, 58(3): 193-201.
- [19] Xiaoxuan, Xinyi, Zeng, *et al.* Biosynthetic pathway of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* [J]. *Frontiers Med*, 2014, 8(3): 285-293.
- [20] Lenk C, Köllner T G, Erb M, *et al.* Two enzymes responsible for the formation of herbivore-induced volatiles of maize, the methyltransferase AAMT1 and the terpene synthase TPS23, are regulated by a similar signal transduction pathway [J]. *Entomol Exp Appl*, 2012, 144(1): 86-92.