

## 广藿香八氢番茄红素脱氢酶 PcPDS1 基因克隆和序列分析

欧阳蒲月<sup>1</sup>, 沈笑飞<sup>2</sup>, 曾少华<sup>3</sup>, 王 瑛<sup>3</sup>, 莫小路<sup>1\*</sup>

1. 广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520

2. 中国科学院武汉植物园, 湖北 武汉 430074

3. 中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650

**摘要:** 目的 为阐明广藿香类胡萝卜素代谢途径, 克隆了广藿香 *Pogostemon cablin* 八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase, PDS) 基因, 并对其相关生物信息学分析。方法 搜索本课题组建立的广藿香转录组数据库, 获得 PDS 基因全长序列, 并设计全长引物进行 PCR 验证; 利用生物信息学软件对 PDS 基因进行生物信息学分析。结果 本研究获得的广藿香 PDS 基因命名为 PcPDS1 (GenBank 登录号为 KC854409), 该基因全长 1 960 个碱基, 编码 569 个氨基酸。基于生物信息学软件分析了 PcPDS1 基因编码蛋白的理化特性。系统进化树分析结果表明, PcPDS1 基因与黄龙胆 *Gentiana lutea* 的 PDS 序列同源性最高, 与烟草 *Nicotiana tabacum*、番薯 *Ipomoea batatas* 次之, 与自然进化关系保持一致。结论 成功克隆、分析了广藿香 PcPDS1 基因。

**关键词:** 广藿香; 八氢番茄红素脱氢酶; PcPDS1 基因; 基因克隆; 生物信息学分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)17-2446-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.17.020

## Cloning and sequence analysis of phytoene desaturase gene in *Pogostemon cablin*

OUYANG Pu-yue<sup>1</sup>, SHEN Xiao-fei<sup>2</sup>, ZENG Shao-hua<sup>3</sup>, WANG Ying<sup>3</sup>, MO Xiao-lu<sup>1\*</sup>

1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China

2. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China

3. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China

**Abstract: Objective** In order to elucidate the carotenoid metabolic pathway in *Pogostemon cablin*, a phytoene desaturase (PDS) of *P. cablin* (PcPDS1) gene was cloned and analyzed bioinformatically. **Methods** The full length PDS gene sequence was retrieved from transcriptomic database of *P. cablin*, the full length primer was designed for PCR verification, and PcPDS1 gene was analyzed using several bioinformatical softwares. **Results** PcPDS1 (NCBI accession, KC854409) contained 1 960 bp length of open reading frame (ORF) and encoded 569 amino acids postulated. Additionally, the physical and chemical properties of PcPDS1-coded protein were analyzed by bioinformatical softwares. Phylogenetic analysis showed that PcPDS1 was tightly clustered with PDS genes in *Gentiana lutea*, *Nicotiana tabacum*, and *Ipomoea batatas*, which is consistent to the phylogenetic relationship of species. **Conclusion** PcPDS1 is successfully cloned and molecularly characterized.

**Key words:** *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth; phytoene desaturase; PcPDS1 gene; gene cloning; bioinformatical analysis

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 为唇形科刺蕊草属植物, 是《中国药典》收录的重要药用植物之一, 以全草入药。其味辛, 性微温, 归脾、胃、肺经, 具有芳香化浊、开胃止呕、发散表邪的功能。广藿香原产于菲律宾、马来西亚、印度等国

家, 自宋代传入我国已有千余年历史<sup>[1]</sup>, 是藿香正气丸(水)、抗病毒口服液等中成药以及大量医药、香料和化妆品等商品的主要原料。迄今为止, 国内外广藿香的研究主要集中在化学成分分析、新化合物筛选和相应化学成分的药理药效、药效成分与群

收稿日期: 2013-04-07

基金项目: 广东省科技厅粤港关键领域重点突破项目(2009A03090101); 广州市科技计划基础研究项目(2013J4100076); 广东食品药品职业学院课题(2012YZ002)

作者简介: 欧阳蒲月(1978—), 女, 湖南邵阳人, 硕士, 讲师, 从事生物技术与药用植物资源研究。

Tel: (020)28854935 E-mail: ouyangpy@gdyzy.edu.cn

\*通信作者 莫小路 Tel: (020)28854883 E-mail: moxl@gdyzy.edu.cn

体遗传学之间的内在联系以及离体培养和植株再生等方面<sup>[2-10]</sup>。广藿香的功效成分主要为萜类和黄酮类化合物,而有关其萜类化合物的生物合成途径及代谢调控方面的研究鲜有报道。

类胡萝卜素是自然界广泛存在的一大类色素,是植物、藻类、光合细菌、蓝细菌等生物生存所必不可少的,在光合作用中发挥作用。类胡萝卜素是一些色素蛋白复合体的必要组成成分<sup>[11]</sup>,具有抗癌活性<sup>[12]</sup>,同时也是赤霉素、脱落酸、维生素A和动物形态发生所需的类维生素A复合物的前体<sup>[13]</sup>。八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)是类胡萝卜素生物合成过程中的一个限速酶。对该基因进行研究将有助于了解萜类化合物尤其是四萜化合物的生物合成过程,为利用基因工程调控广藿香药用成分的合成提供研究基础。至今,仅从杏、万寿菊、甘薯<sup>[14-15]</sup>等少数植物中分离到该基因,而分离、克隆广藿香PDS基因未见报道。因此,研究广藿香PDS编码基因的克隆,具有重要的科学理论价值和实践应用价值。

基于本研究组所得到的广藿香转录组数据,从中挖掘出大量参与类胡萝卜素代谢相关基因信息。本实验对广藿香的PDS基因进行了克隆及生物信息学分析,为阐明广藿香的类胡萝卜素生物合成途径奠定基础。

## 1 材料

本实验材料采自于广东食品药品职业学院药用植物标本园广藿香栽培地。海南广藿香 *P. cablin* (Blanco) Benth. cv *hainanensis* 经广东省中药研究所蔡岳文教授鉴定,展开幼叶及成熟黄褐色叶,迅速放入装有液氮的保温瓶中,后置于 $-75^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

## 2 方法

### 2.1 总RNA的提取

取 $-75^{\circ}\text{C}$ 保存的幼叶及成熟叶,在 $180\sim 200^{\circ}\text{C}$ 烘烤过的研钵中用液氮将其充分研磨,迅速倒入焦磷酸二乙酯(DEPC)处理过的离心管中,待液氮挥发后,按 $1\text{ mL}/100\text{ mg}$ 材料加入适量的Trizol(植物RNA提取试剂TIANGEN DP421),混匀,室温放置 $10\text{ min}$ 。向上清液中加入 $0.2$ 倍Trizol体积的三氯甲烷,并充分混匀,室温放置 $3\sim 5\text{ min}$ 。 $4^{\circ}\text{C}$ , $12\ 000\text{ r/min}$ 离心 $10\text{ min}$ ,吸取上层水相至另一离心管。向水相中加入等体积的异丙醇,并充分混匀后,室温放置 $20\sim 30\text{ min}$ 。 $12\ 000\text{ r/min}$ , $4^{\circ}\text{C}$ ,

离心 $10\text{ min}$ ,弃上清,并保留沉淀。加入 $1\text{ mL}$ 75%乙醇(用RNase-free ddH<sub>2</sub>O配制)洗涤沉淀, $5\ 000\text{ r/min}$ , $4^{\circ}\text{C}$ ,离心 $3\text{ min}$ ,倒出液体,注意不要倒出沉淀。室温放置晾干,将沉淀溶解于 $50\text{ mL}$ 的RNase-free ddH<sub>2</sub>O中,反复吹打,混匀,充分溶解RNA。

电泳检测总RNA的质量,并用紫外分光光度计(NANODROP 2000c)测定总RNA的浓度和纯度。

### 2.2 PcPDS基因全长的获得

**2.2.1 第一链cDNA的合成** 初始反应体系的建立:Oligo dT( $20\text{ pmol}/\mu\text{L}$ ,广州凯基生物有限公司) $2\ \mu\text{L}$ ;RNA $10\ \mu\text{L}$ (嫩叶及老叶RNA各 $5\ \mu\text{L}$ );dNTPmix( $25\ \mu\text{mol/L}$ ) $2\ \mu\text{L}$ ;RNase-free ddH<sub>2</sub>O $12\ \mu\text{L}$ ,将反应体系于 $65^{\circ}\text{C}$ 变性 $5\text{ min}$ ,取出后置于冰上 $1\text{ min}$ 以上,向初始反应体系中加入下列试剂: $5\times$  first-strand 缓冲液 $8\ \mu\text{L}$ ;  $0.1\text{ mol/L}$  DTT $4\ \mu\text{L}$ ; Superscript III 反转录酶( $200\text{ U}/\mu\text{L}$ ) $2\ \mu\text{L}$ , H<sub>2</sub>O $2\ \mu\text{L}$ ,再将总反应体系于 $42^{\circ}\text{C}$   $50\text{ min}$ , $70^{\circ}\text{C}$   $15\text{ min}$ ,于PCR仪上进行第一链cDNA的合成。反转录产物cDNA可在 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

**2.2.2 基因克隆** 反应体系: $3\ \mu\text{L}$ 的第一链cDNA(反转录产物稀释 $10$ 倍)为模板; $2.5\ \mu\text{L}$  LA PCR 缓冲液; $2\ \mu\text{L}$  正向及反向特异引物( $10\text{ mmol/L}$ ):正向引物(PDS1,5'-CCCCCTTTTCAATGTGCTAA-3')和反向引物(PDS2,5'-TTCCATGAACCCTATTTGGTC-3'), $0.25\ \mu\text{L}$  LA Taq-DNA 聚合酶(大连宝生物工程有限公司);用无菌去离子水将体系补至 $25\ \mu\text{L}$ 。PCR反应条件: $94^{\circ}\text{C}$ 预变性 $5\text{ min}$ ;  $94^{\circ}\text{C}$ 变性 $30\text{ s}$ , $57^{\circ}\text{C}$ 退火 $30\text{ s}$ , $72^{\circ}\text{C}$ 延伸 $2\text{ min}$ , $30$ 个循环; $72^{\circ}\text{C}$ 延伸 $10\text{ min}$ 。取PCR产物 $5\ \mu\text{L}$ ,用1%琼脂糖电泳检测。

**2.2.3 PCR回收产物的纯化、连接、转化、克隆及测序** 将上述PCR产物割胶,使用Axygen公司凝胶回收试剂盒过柱回收。回收程序依据试剂盒提供方法进行。各取 $4.5\ \mu\text{L}$ 回收产物,克隆到PMD19-T载体过夜连接。将连接产物转入DH-5 $\alpha$ 大肠杆菌感受态细胞,经涂布培养,在氯苄抗性平板上进行阳性克隆筛选,各取 $4\sim 8$ 个进行菌液PCR验证,后各取 $2$ 个阳性克隆进行双向测序(上海生工生物工程有限公司)。

**2.2.4 序列的生物信息学分析** 先将所测得的序列在美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中进行BLAST搜索,初步确定这些基因类别。使用ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)进行开放阅读框预测,然后进行PcPDS基因

的一系列分析：其编码蛋白的理化性质预测采用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)；利用在线工具 (<https://www.predictprotein.org/>) 进行其蛋白二级结构预测；PcPDS 蛋白质结构搜索采用 NCBI 在线工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)。使用 SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行分泌蛋白预测；利用 WOLFP SORT (<http://wolfsort.org/>) 进行蛋白定位信号预测；跨膜区预测利用在线工具 HMMTOP ([http://www.enzim.hu/hmmtop/html/adv\\_submit.html](http://www.enzim.hu/hmmtop/html/adv_submit.html))；分析氨基酸序列/疏水性分析 (<http://web.expasy.org/protscale>)，用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> 检测跨膜结构，使用 Conserved domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) 进行蛋白保守结构域搜索。采用 MEGA5.1 软件，内置的 NJ 法构建进化树。所有软件如无特殊说明，均采用默认参数。

### 3 结果与分析

#### 3.1 广藿香 RNA 的提取

将采用 TRizol 方法提取获得的总 RNA 进行琼脂糖电泳质量检测，结果如图 1-A 所示 (H1 为嫩叶，H2 为老叶)，28S 和 18S 的两条带清晰，其中 28S RNA 亮度约为 18S RNA 的 2 倍。紫外分光光度计 NANODROP 2000c 检测表明，样品 H1 的  $A_{260}$  和  $A_{280}$  吸光度分别为 1.80 和 0.41，质量浓度为 230 ng/ $\mu$ L；样品 H2 的  $A_{260}$  和  $A_{280}$  吸光度分别为 1.93 和 0.99，质量浓度为 563.3 ng/ $\mu$ L。琼脂糖电泳和紫外分光光度计检测结果表明，运用该方法所提取的

广藿香叶片总 RNA 完整性好、质量高。

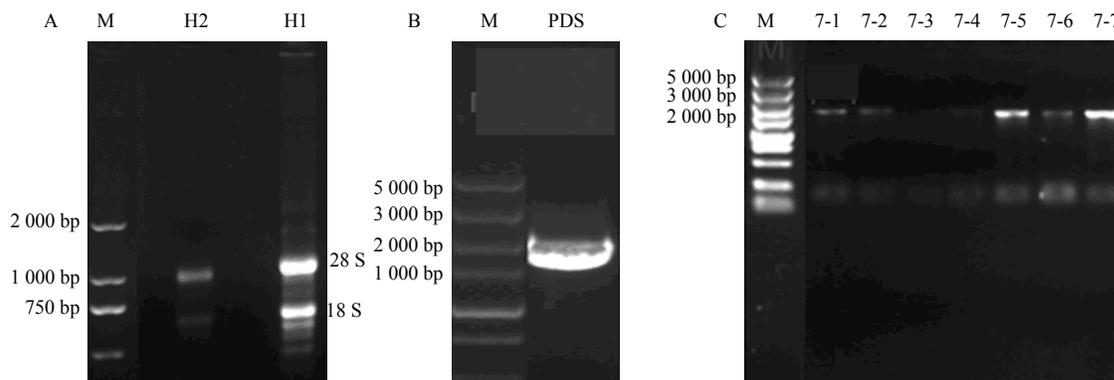
#### 3.2 PcPDS 基因克隆

从广藿香转录组数据库筛选获得的 Unigene 5299 经 BLAST 分析表明，2 482 bp EST 序列编码 PDS 基因。利用 ORF Finder 软件预测开放阅读框；在此基础上，利用 PRIMER3 软件在 PcPDS 的 Untranslated Regions (UTR) 区域设计全长引物，并进行 PCR 克隆验证。将广藿香老叶 RNA 与嫩叶 RNA 进行混合，以混合 RNA 进行逆转录获得单链 cDNA 为模板，经 PCR 扩增得到 1 条 2 000 bp 左右的条带 (图 1-B)；将该特异性条带经回收、连接、转化、阳性克隆检测 (图 1-C) 后，进行测序获得验证。测序结果表明，该基因特异性条带序列与 Unigene 5299 序列一致。ORF Finder 预测表明，该序列含有 1 个长为 1 960 bp 的完整开放阅读框，编码 569 个氨基酸 (图 2)。将该基因命名为 PcPDS1，并登陆于 GeneBank (登陆号为 KC854409)。PcPDS 氨基酸比对分析见图 3。

#### 3.3 PcPDS1 编码蛋白特性分析

**3.3.1 理化性质** PcPDS1 预测编码 569 个氨基酸，利用 ExPASy PROSITE 对 PcPDS1 基因编码蛋白的理化性质进行预测分析。推测 PcPDS1 的分子式为  $C_{2881}H_{4507}N_{755}O_{826}S_{24}$ ，总相对分子质量为  $6.371 \times 10^4$ ，等电点为 6.41；带负电残基 (Asp+Glu) 为 68，带正电残基 (Arg+Lys) 为 65。该蛋白的不稳定系数为 44.93，脂肪系数为 90.35，亲水性系数为 -0.181。

**3.3.2 PcPDS1 的二级结构预测** 利用在线 Predictprotein 软件对 PcPDS1 基因编码蛋白的二级结构进行预测，结果表明该蛋白的二级结构中： $\alpha$ -螺旋结构 (H) 占 27.9%， $\beta$  片层 (E) 占 11.6%，



A-RNA 提取普通琼脂糖电泳检测图；B-PcPDS1 PCR 产物；C-PcPDS1 7 个阳性克隆检测结果；M-Marker  
A-total RNA from *P. cablin*; B-PcPDS1 PCR product; C-PcPDS1 Seven positive clone test results; M-Marker

图 1 凝胶电泳结果

Fig. 1 Results of gel electrophoresis



**3.3.4 疏水性分析** 应用 protscale 预测 PcPDS1 蛋白的氨基酸序列/疏水性, 结果表明 PcPDS1 多肽链第 231 位的亮氨酸具有最高的分值 2.489, 疏水性最强; 第 145 位的甘氨酸具有最低的分值 -2.711, 亲水性最强。整个来看, 其亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸, 为亲水蛋白 (图 4)。

**3.3.5 PcPDS1 结构域分析** 利用 Conserved Domains 数据库预测基因的蛋白保守区。由图 3 和图 5 可知, PcPDS1 蛋白包含 NAD (P)-binding Rossmann-like 结构域 (pfam13450) 和 PDS 结构域 (PLN02612) 2 个保守结构域, 它们属于 NAD\_binding\_8 超级家族。

**3.3.6 PcPDS1 基因的系统进化** 从 NCBI 数据库

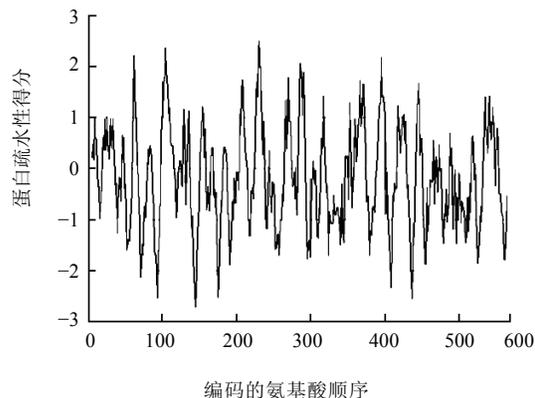


图 4 PcPDS1 酶蛋白疏水性分析

Fig. 4 Hydrophobicity profile of PcPDS1 protein

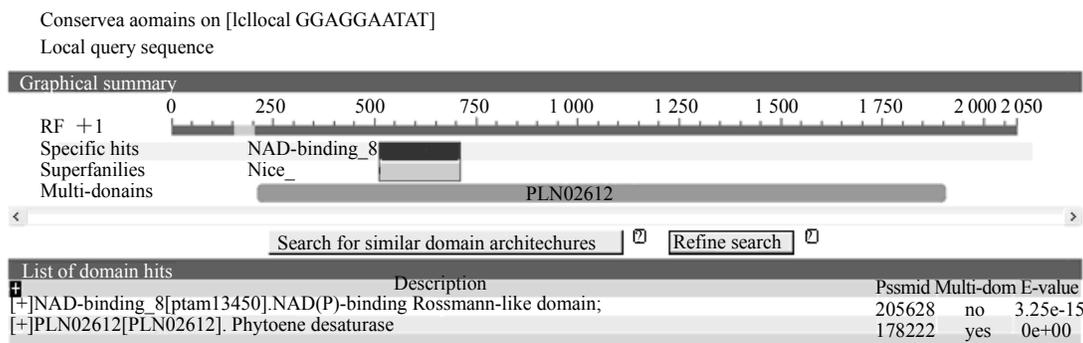


图 5 PcPDS1 基因的氨基酸序列保守区推测

Fig. 5 Prediction for conserved domains of deduced amino acid sequence in PcPDS1 gene

中的非冗余蛋白数据库 (Nr) 中选取与 PcPDS1 基因编码蛋白相似性较高的 14 条蛋白序列, 采用 MEGA5.1 软件, 内置的 NJ 法构建进化树。结果 (图 6) 表明: 已经克隆到的广藿香 PcPDS1 基因与黄龙胆 (*Gentiana lutea* L., BAB82461) 的 PDS 序列同源性最高, 与烟草 (*Nicotiana tabacum* Linn., ABY25272)、番薯 (*Ipomoea batatas* Lam., BAI47573) 次之, 与柿树 (*Diospyros kaki* Linn. f., ACY78343)、葡萄 (*Vitis vinifera* L. Fl. Sp., AFP28796) 再次之。甜橙 (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, AEQ29524)、苦瓜 (*Momordica charantia* Linn., AAR86105)、番木瓜 (*Carica papaya* Linn., ABG72807)、杏 (*Prunus armeniaca* L. var. *typica* Maxim, AAX33347)、牛奶子 (*Elaeagnus umbellata* Thunb., ACT34016)、黑藻 (*Hydrilla verticillata* (Linn. f.), AAT76434)、菊花新品种 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat., BAE79552)、万寿菊 (*Tagetes erecta* L. Sp., AAG10426)、甘蓝 (*Brassica oleracea* L. Sp., ABV46593) 等植物的序列同源性较低。

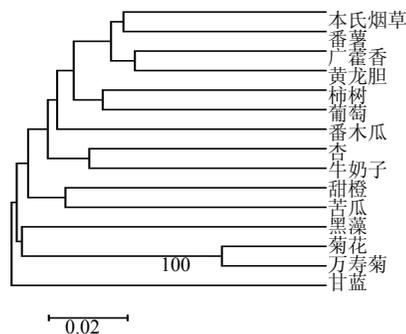


图 6 基于 PDS 基因利用 NJ 法构建的不同物种间的进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree establishment of different species based on PDS gene using NJ method

#### 4 讨论

类胡萝卜素是人类日常膳食中不可缺少的重要成分; 此外, 类胡萝卜素具有多种重要的营养保健功能, 尤其某些类胡萝卜素如  $\beta$ -胡萝卜素是合成维生素 A 的前体, 具有抗癌和提高免疫力等功效。另外, 类胡萝卜素还广泛应用于医药和化妆品工业。在高等植物中, 类胡萝卜素是在质体中通过类异戊

二烯途径合成的<sup>[16]</sup>。其中, PDS 是继八氢番茄红素合成酶 (PSY) 之后, 类胡萝卜素代谢途径中第 2 步关键酶; 而且 PDS 是类胡萝卜素合成途径限速酶<sup>[17]</sup>。因此, 克隆、研究 PDS 基因功能, 具有重要的科学理论意义和商业应用价值。

通过高通量测序技术结合生物信息学分析是快速挖掘非模式药用植物药用成分合成相关基因的有效手段<sup>[18-20]</sup>。目前, 通过 454 高通量测序技术中已发现大量的参与活性成分合成及调控的候选基因。目前已知的植物 PDS 序列相似性较高, 氨基酸残基的个数为 550~600。广藿香 PcPDS1 编码 569 个氨基酸, 相对分子质量  $6.371 \times 10^4$ , 与草莓、番红花的 PDS 基因相似<sup>[21-22]</sup>。基于 PDS 基因利用 NJ 法构建的 14 个不同物种间的进化树表明 PcPDS1 基因与黄龙胆的 PDS 序列同源性最高, 与烟草、番薯次之, 这与自然进化关系保持一致。WOLFPSORT 预测结果表明 PcPDS1 基因最可能定位在叶绿体中, 而萜类的代谢中 MEP 途径就是在质体中进行的<sup>[23-25]</sup>。因此, 上述预测结果证明了本研究中所克隆的 PcPDS1 基因的正确性。

广藿香药效活性成分主要是倍半萜和单萜等萜类化合物, 但目前国内外对广藿香萜类生物合成途径相关基因的研究较少。本研究成功克隆了广藿香萜类合成途径中的关键酶基因——PcPDS1, 并对其测序及相关的生物信息学进行分析。由于 PcPDS1 是广藿香合成四萜类胡萝卜素化合物的重要关键酶基因, 因此构建 PcPDS1 RNAi 干扰载体、遗传转化广藿香, 有可能阻断类胡萝卜素合成而提高倍半萜和单萜类药效活性成分的量。因此, 利用本研究克隆得到的 PcPDS1 基因, 为通过基因操作提高广藿香药效活性成分的量奠定基础。

#### 参考文献

- [1] 吴友根, 郭巧生, 郑焕强. 广藿香本草及引种历史考证的研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(20): 2114-2117.
- [2] 魏刚, 符红, 王淑英, 等. GC-MS 法建立广藿香挥发油指纹特征图谱研究 [J]. 中成药, 2002, 24(6): 90-94.
- [3] Blank A F, Sant'ana T C P, Santos P S, et al. Chemical characterization of the essential oil from patchouli accessions harvested over four seasons [J]. *Ind Crop Prod*, 2011, 34: 831-837.
- [4] Ding W B, Lin L D, Liu M F, et al. Two new sesquiterpene glycosides from *Pogostemon cablin* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13: 599-603.
- [5] Hu L F, Li S P, Cao H, et al. GC-MS fingerprint of *Pogostemon cablin* in China [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 42: 200-206.
- [6] Sundaresan V, Singh S R, Mishra A N, et al. Composition and comparison of essential oils of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Patchouli) and *Pogostemon travancoricus* Bedd. var. *travancoricus* [J]. *J Essent Oil Res*, 2009, 21: 220-222.
- [7] Wu H Q, Li L, Li J, et al. Acaricidal activity of DHEMH, derived from patchouli oil, against house dust mite, *Dermatophagoides farinae* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2012, 60: 178-182.
- [8] Kiuchi F, Matsuo K, Ito M, et al. New sesquiterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Pogostemon cablin* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52: 1495-1496.
- [9] Kiyohara H, Ichino C, Kawamura Y, et al. Patchouli alcohol: *in vitro* direct anti-influenza virus sesquiterpene in *Pogostemon cablin* Benth [J]. *J Nat Med*, 2012, 66: 55-61.
- [10] Niyogi K K. Photo protection revisited: genetic and molecular approaches [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 333-359.
- [11] Moskalenko, Kara Petyan. Structural role of carotenoids in photosynthetic membranes [J]. *Z Naturforsch*, 1996, 51c: 763-771.
- [12] Gerster H. The Potential role of lycopene for human health [J]. *J Am Coll Nutr*, 1997, 16: 109-126.
- [13] Armstrong G. Eubaeteria show their true colors: genetics of caortenoid pigment biosynthesis from microbes to pants [J]. *J Bact*, 1994, 176: 4795-4802.
- [14] 陈选阳. 甘薯  $\beta$ -胡萝卜素合成途径系列酶基因的克隆及相关研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2005.
- [15] 王飞. 甘薯类胡萝卜素合成相关基因片段的克隆 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [16] Lichtenthaler H K, Schwender J, Disch A, et al. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway [J]. *FEBS Lett*, 1997, 400(3): 271-274.
- [17] Chamovitz D, Sandmann G, Hirschberg J. Molecular and biochemical characterization of herbicide-resistant mutants of cyanobacteria reveals that phytoene desaturation is a rate-limiting step in carotenoid biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(23): 17348-17353.
- [18] Sun Y Z, Niu Y Y, Li Y, et al. Cloning and bioinformatics analysis of PqERF1 gene in *Panax quinquefolius* [J]. *Acta Pharm Sin*, 2011, 46: 1008-1014.

- [19] Luo H M, Sun C, Sun Y Z, *et al.* Analysis of the transcriptome of *Panax notoginseng* root uncovers putative triterpene saponin biosynthetic genes and genetic markers [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(Suppl 5): S5.
- [20] Li Y, Sun C, Luo H M, *et al.* Transcriptome characterization for *Salvia miltiorrhiza* using 454 GS FLX [J]. *Acta Pharm Sin*, 2010, 45: 524-529.
- [21] 白洁. 番红花 (*Crocus sativus*) 八氢番茄红素脱氢酶 CsPDS 基因的克隆、表达及含西红花资源植物的研究 [D]. 成都: 四川大学, 2003.
- [22] 李永平. 草莓类胡萝卜素合成相关基因的克隆 [D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [23] Yu F N A, Utsumi R. Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(18): 3043-3052.
- [24] Newman J D, Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: Carbon partitioning within the cytoplasmic pathway [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1999, 34(2): 95-106.
- [25] Goldstein J L, Brown M S. Regulation of the mevalonate pathway [J]. *Nature*, 1990, 343(6257): 425-430.