

罗马洋甘菊吉马烯 A 合成酶基因的克隆与表达分析

闫佳萍¹, 孟想想¹, 朱丽¹, 张威威¹, 常杰^{2,3}, 许锋^{1*}

1. 长江大学园艺园林学院, 湖北 荆州 434025

2. 靶向抗肿瘤药物湖北省协同创新中心, 湖北 荆门 448000

3. 荆楚理工学院化工与药学院, 湖北 荆门 448000

摘要: 目的 从罗马洋甘菊 *Chamaemelum nobile* 中克隆萜类化合物合成关键酶吉马烯 A 合成酶 (germacrene A synthase, GAS) cDNA 全长, 并对其进行生物信息学和组织表达分析。方法 基于前期对罗马洋甘菊转录组测序结果, 设计特异性引物, 利用反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 扩增得到 GAS 的 cDNA 全长, 利用生物信息学手段对其核苷酸和编码的氨基酸序列进行分析, 并预测其编码的蛋白质的理化性质和功能。通过实时定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 检测罗马洋甘菊 GAS 基因 (CnGAS) 在罗马洋甘菊不同组织的表达水平。结果 扩增得到的罗马洋甘菊吉马烯 A 合成酶基因的 cDNA 全长为 1 785 bp, 命名为 CnGAS (GenBank 登录号为 KU589283), 包含 1 个 1 683 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 561 个氨基酸, 预测的相对分子质量和等电点分别为 6 470 和 5.21。CnGAS 基因编码的氨基酸序列与其他植物的 GAS 蛋白高度同源, 且含有 DDxxD 保守序列。系统进化树表明 CnGAS 基因与菊科植物的 GAS 基因的亲缘关系最近。qRT-PCR 结果显示 CnGAS 基因在罗马洋甘菊各组织中均有表达, 且花中表达量最高。结论 从罗马洋甘菊中克隆得到 CnGAS 基因, 分析了该基因在不同组织中的表达水平, 为罗马洋甘菊萜类化合物的生物合成代谢途径的研究奠定了基础。

关键词: 罗马洋甘菊; 吉马烯 A 合成酶; 基因克隆; 生物信息学; 基因表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)09-1851-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.024

Molecular cloning and expression analysis of germacrene A synthase gene in *Chamaemelum nobile*

YAN Jia-ping¹, MENG Xiang-xiang¹, ZHU Li¹, ZHANG Wei-wei¹, CHANG Jie^{2,3}, XU Feng¹

1. College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou 434025, China

2. Hubei Collaborative Innovation Center of Targeted Antitumor Drug, Jingmen 448000, China

3. College of Chemical Engineering and Pharmacy, Jingchu University of Technology, Jingmen 448000, China

Abstract: **Objective** *Chamaemelum nobile* is renowned for its production of essential oils, in which major components are sesquiterpenoids. Germacrene A synthase (GAS) is one of core enzymes involved in sesquiterpenoids. The present study aims to clone the full-length cDNA of GAS gene from *C. nobile* (CnGAS), and characterize and analyze tissue expression pattern of GAS gene. **Methods** The specific primers were designed based on the results of previous transcriptome sequencing and the full-length cDNA of CnGAS was cloned by RT-PCR. The nucleotide sequence and its encoding amino-acid sequence were analyzed by bioinformatics method, and the physicochemical property and function of the encoding protein were predicted. The expression levels of the gene in different organs of *C. nobile* were determined by qRT-PCR technology. **Results** The full-length cDNA of GAS gene, designated as CnGAS, was 1 785 bp (GenBank accession number: KU589283) and contained a 1 683 bp open reading frame (ORF), which encoded a 561 amino-acid protein. The theoretical molecular weight and PI of the deduced CnGAS protein were 6 470 and 5.21, respectively. The encoding amino-acid sequence of CnGAS showed high similarity to GAS proteins in other plants, which contained conserved DDxxD motif. Phylogenetic tree analysis revealed that CnGAS had closer genetic relationship with GASs from Asteraceae plants. The result of qRT-PCR showed that CnGAS gene was expressed in different organs of *C. nobile*, and highly expressed in the flower. **Conclusion** The CnGAS gene is isolated from *C. nobile* and the expression levels of this gene in different organs are analyzed, which will lay a foundation for further study of sesquiterpene biosynthesis pathway in *C. nobile*.

Key words: *Chamaemelum nobile* L.; germacrene A synthase; gene cloning; bioinformatics; gene expression

收稿日期: 2016-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31400603); 大学生创新创业训练计划项目 (201207014)

作者简介: 闫佳萍 (1992—), 女, 硕士研究生, 从事植物分子生物学研究。E-mail: xiaolinyingxue@163.com

*通信作者 许 锋, 男, 教授, 博士, 主要从事药用植物次生代谢研究。E-mail: xufeng198@126.com

罗马洋甘菊 *Chamaemelum nobile* L. 是一年生或多年生的菊科草本植物, 原产于欧洲西部, 目前整个欧洲以及一些温带地区均有种植^[1]。罗马洋甘菊常用来治疗恶心、呕吐、消化不良和食欲不振^[2]。罗马洋甘菊的活性成分主要包括酯类挥发油、类黄酮和萜类化合物等^[3], 其中萜类化合物尤其是倍半萜类物质是其主要药效成分。目前已从罗马洋甘菊中分离鉴定出多种倍半萜类化合物, 如吉马烯内酯、 β -桉叶烯、母菊萜、甜没药醇等^[4]。

萜类化合物是一类由数个异戊二烯 (isoprene, C_5) 结构单位所构成的化合物的统称^[5], 是广泛存在于自然界的天然有机化合物。目前已知的萜类化合物及其衍生物有 6 万多种^[6], 根据其结构中包含的异戊二烯单元数量可将其分为单萜 (monoterpene, C_{10})、倍半萜 (sesquiterpene, C_{15})、二萜 (diterpene, C_{20}) 和三萜 (triterpene, C_{30}) 等, 也可以根据其碳环数分为链萜、单环萜、双环萜和三环萜等。萜类化合物除了具有调节植物生长和发育, 抵御氧化胁迫, 直接或间接的植物防御等作用外, 还被广泛地用作香料、调料、化妆品、食物、药品和杀虫剂等^[7]。在生物体中, 萜类化合物的合成途径有 2 条: 甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway, MVA) 和脱氧木酮糖-5-磷酸途径 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway, DXP)。这 2 条途径主要分为 3 个阶段^[8]: 第 1 个阶段生成异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 及其异构体二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP); 第 2 阶段 3 种直接前体物质香叶基二磷酸 (geranyl diphosphate, GPP)、法呢基二磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP)、香叶基香叶基二磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP) 的生成; 第 3 阶段是萜类物质的形成及其骨架修饰。MVA 途径主要在真核生物的细胞质中进行, 最终形成倍半萜、三萜和甾体等化合物; DXP 途径存在于原核生物和植物的质体中, 最终形成单萜、二萜等萜类化合物。无论是 MVA 途径还是 DXP 途径, IPP 都是所有萜类物质合成的中心前体^[9]。3 种直接前体物质 GPP、FPP 和 GGPP 合成后, 在不同的萜类合成酶 (terpene synthase, TPS) 的作用下, 分别生成相应的单萜、倍半萜和二萜, 最后通过各种修饰酶的甲基化、羟基化、糖基化等骨架修饰作用形成结构和功能各异的萜类化合物^[8]。

吉马烯 A 合成酶 (germacrene A synthase, GAS)

催化吉马烯 A 的生物合成, 吉马烯 A 是倍半萜内酯 (sesquiterpene lactones, STLs) 的重要前体物质, 而 STLs 是萜类化合物中的一种, 它作为引诱剂、阻碍剂、拒食剂和植保素在植物与昆虫、微生物之间的相互作用上扮演着重要的生态角色。另外, 它还是许多精油中的重要组成成分, 在香料和化妆品生产上具有很高的商业价值^[10]。研究表明 STLs 在许多菊科植物以及一些其他植物中均来源于相同的吉马烯前体即吉马烯 A^[11]。GAS 催化 FPP 生成吉马烯 A, 随后吉马烯 A 经过一系列的步骤被氧化为吉马烯 A 羧酸^[12], 吉马烯 A 羧酸再进一步氧化生成内酯环, 最后通过功能化或环化生成相应的愈创木内酯、桉烷内酯和吉马烯内酯等 STLs。作为 STLs 生物合成的一个关键酶, GAS 被广泛的研究。迄今为止, GAS 基因在许多植物中已被克隆出来, 包括齿缘苦蕒 *Ixeris dentate* (Thunb.) Nakai^[13]、青蒿 *Artemisia annua* L.^[14]、向日葵 *Helianthus annuus* L.^[15]、朝鲜蓟 *Cynara cardunculus* L.^[16]、欧蓍草 *Achillea millefolium* L.^[17]。本研究首次克隆了罗马洋甘菊 GAS 基因 (CnGAS) 的 cDNA 全长, 分析了其序列的结构功能, 并研究其在罗马洋甘菊各组织中的表达水平, 为解析罗马洋甘菊中 STLs 合成的基因调控网络奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究以长江大学园艺园林学院玻璃温室内栽培并经长江大学园艺园林学院许锋教授鉴定的罗马洋甘菊 *Chamaemelum nobile* L. 为试材, 分别采集了不同时期罗马洋甘菊的根、茎、叶和花, 液氮速冻后于 -80°C 冰箱中储存, 用于 CnGAS 基因的克隆。

1.2 试剂

RNA 提取试剂盒 (MiniBEST Plant RNA Extraction kit)、反转录试剂盒 (PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit)、切胶回收试剂盒 (Agarose Gel DNA purification Kit Ver.4.0)、实时定量试剂盒 (PrimeScriptTM RT reagent Kit Perfect Real Time)、pMD18-T 载体、DH5 α 大肠杆菌感受态细胞、dNTP、RNA 酶、DNA 聚合酶均购自大连宝生物公司, 引物合成和序列的测定委托上海生工生物公司完成。

1.3 总 RNA 的提取和 CnGAS 基因的克隆

总 RNA 的提取方法参照 TaKaRa 公司 RNA 提取试剂盒 (MiniBEST Plant RNA Extraction kit) 说

说明书。按照反转录试剂盒 (PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit) 方法将总 RNA 反转录成 cDNA, 以其作为模板进行 CnGAS 基因的克隆。从罗马洋甘菊转录组测序数据库中找出所有的 CnGAS 基因序列 (表 1), 进行比对分析, 筛选出与其他植物 GAS 基因相似度最高一条 Unigene (Group1_Unigene_BMK.8011) 序列, 设计特异性引物 G1 和 G2 (表 2)。以反转录的 cDNA 为模板进

行 PCR 扩增, 反应体系为 25 μ L, 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 61 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后进行切胶, 回收目的条带, 然后将目的片段连接到 pMD18-T 载体上, 再转化到 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中, 挑取单菌落, 进行菌液验证阳性克隆, 将阳性克隆送至上海生工生物公司进行测序。

表 1 罗马洋甘菊转录组数据库中预测为 GAS 基因的 Unigene

Table 1 Predicted unigene of GAS in *C. nobile* transcriptome

序列 ID	编码序列/bp	Unigene 预测的生物学功能注释 (植物)
Group1_Unigene_BMK.8011	1 686	GAS (除虫菊 <i>Tanacetum cinerariifolium</i>)
Group1_Unigene_BMK.23604	736	GAS (加拿大一枝黄花 <i>Solidago canadensis</i>)
Group1_Unigene_BMK.23753	201	GAS (加拿大一枝黄花)
Group1_Unigene_BMK.25261	263	GAS (菊苣 <i>Cichorium intybus</i>)
Group1_Unigene_BMK.26639	241	GAS (加拿大一枝黄花)
Group1_Unigene_BMK.56492	156	GAS (朝鲜蓟 <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>)
Group1_Unigene_BMK.94449	297	GAS (尖裂假还阳参 <i>Crepidiastrum sonchifolium</i>)
Group1_Unigene_BMK.114094	1 590	GAS (菊苣)
Group1_Unigene_BMK.117600	478	GAS (加拿大一枝黄花)
Group1_Unigene_BMK.118763	684	GAS1 (向日葵 <i>H. annuus</i>)
Group1_Unigene_BMK.119630	1 389	GAS (朝鲜蓟)
Group1_Unigene_BMK.123322	795	GAS (加拿大一枝黄花)
Group2_Unigene_BMK.33909	531	GAS1 (向日葵)
Group2_Unigene_BMK.33910	1 217	GAS (菊苣)
Group2_Unigene_BMK.61982	337	GAS (朝鲜蓟)
Group2_Unigene_BMK.71438	468	GAS3 (向日葵)

Group1_Unigene_BMK.8011 为本研究筛选出的 GAS 序列

Group1_Unigene_BMK.8011 is the GAS sequence we selected in this study

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

引物	序列 (5'→3')
CnGAS 基因上游引物 (G1)	ATGGCAGCGGTTCAAGCTAAT
CnGAS 基因下游引物 (G2)	TTACACGGGTAGAGATCCACAAAC
qRT-PCR 上游引物 (R1)	GTCCAAGCAAACACTAAAACCTCTG
qRT-PCR 下游引物 (R2)	CTCAAATCCTCCTTCGGCTTCTC
18 S RNA 上游引物 (S1)	TTGGTCTCCCGTGCTAATGG
18 S RNA 下游引物 (S2)	CGAAGCGTCATCCTAAGACAACA

1.4 CnGAS 基因的生物信息学分析

将测序得到的基因序列信息, 在 <http://www.ncbi.com> 网站上用 BLAST 工具进行核苷酸序列和推导出的氨基酸序列的同源性比对, 获得相似度最高的序列。利用 Vector NTI 11.5 进行开放阅读框 (ORF) 分析以及推导出的 CnGAS 的氨基酸序列与已知该基因家族成员的同源性比对。借助

CLUSTAL X 2 和 MEGA6 软件将推导出的氨基酸序列与 GenBank 上的其他同源序列进行系统进化分析, 采用邻位相接法 (neighbor-Joining, NJ) 构建系统进化树, 利用 ExPASy 在线服务器 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白质的相对分子质量、理论等电点等。

1.5 CnGAS 基因的表达水平分析

从罗马洋甘菊根、茎、叶、花样品中提取 RNA 并反转录成 cDNA。根据已知序列, 设计可扩增 CnGAS 基因片段的 qRT-PCR 引物 R1、R2 (表 2), 以反转录的 cDNA 为模板, 选取 18 S RNA 作为内参基因^[18], 进行 qRT-PCR 扩增。18 S RNA 上游引物 S1, 下游引物 S2。反应体系 25 μ L, 反应程序参照 TaKaRa 实时定量说明书 (PrimeScript™ RT reagent Kit Perfect Real Time)。每个样品设置 3 次重复, 以超纯水为阴性对照, 18 S RNA 做内参基因。

数据的处理采用相对定量法, 参照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行结果分析^[19]。

2 结果与分析

2.1 CnGAS 基因 cDNA 全长克隆

从罗马洋甘菊转录组测序数据库中找到了 16 条 GAS 基因序列 (表 1), 将这些序列与其他植物的 GAS 基因序列进行比对, 筛选出与其他植物 GAS 基因相似

度最高的一条 Unigene (Group1_Unigene_BMK.8011) 序列, 设计合成特异性引物 (表 2), 以反转录的 cDNA 作为模板, 进行 PCR 扩增, 经测序获得全长为 1 785 bp 的 CnGAS 基因序列。经 Vector NTI 11.5 分析结果表明 CnGAS 基因包含一个 1 683 bp 的 ORF, 编码 561 个氨基酸 (图 1), 命名为 CnGAS (GenBank 登录号为 KU589283)。

```

1 GGGCACTGCGGCAGTGCAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGATT
45 ATGGCAGCGGTTCAAGCTAATGTTACTACTGGTGTCCAAGCAAACACTAAAACCTCTGCAAAGCCCGTGCCTCCG
1 M A A V Q A N V T T G V Q A N T K T S A K M P V R P
120 TTGGCCAACTTTCCTCCTTCAGTATGGGGTACTCGGTTCTCTCATTCTCGCTTGACAAATCGGAATTCGAGAGA
26 L A N F P P S V W G T R F L S F S L D K S E F E R
195 TATGCCATGGCTATGGAGAAGCCGAAGGAGGATTGAGAACTTGATCGTGGATCCCAAAATGGATTCAAATGAG
51 Y A M A M E K P K E D L R N L I V D P K M D S N E
270 AAAGTGGCTGATTATCTGTGCATCGTCTCGGTTTGACATATATCTTCTTGAAGAGATCGAAAGCCAACTT
76 K L G L I Y S V H R L G L T Y I F L E E I E S Q L
345 GACAAGCTTTCAACGAGTTAGCTTACAAGACTTGAAGATGTTGATCTATATACTATTTCGATTAACTTTCAA
101 D K L F N E F S L Q D Y E D V D L Y T I S I N F Q
420 GTTTTCGACACCTTGGTTACAAGCTAGCTTGTGATGTCTTAAACAAATCAAGGATGTTAGCTCGGGTACTTTC
126 V F R H L G Y K L A C D V F N K F K D V S S G T F
495 AAGGAATCCATTACAAGTATGTAAGGGGATGTTGGGCTTATATGAATCTGCACAGTTGCGAATAAGAGGAGAA
151 K E S I T S D V R G M L G L Y E S A Q L R I R G E
570 AAAATCTTGATGAAGCCTCGGTTTTCATCGAAGGTAAACTCAAGAGTGTAGTAAACACTCTTGAATGTAACCTT
176 K I L D E A S V F I E G K L K S V V N T L E C V L E
645 GCACAACAAGTGAACAATCTTTAAAGAGACCATTCCATCAAGGATGCCAATTGTAGAGGCAAGGCTGTATTTC
201 A Q Q V K Q S L K R P F H Q G M P I V E A R L Y F
720 TCTAATATGAAGAAGATGTTCTCCTCACATGACTCGCTATTTAAGCTTGCAAAGCTACACTTCAAGTATTTGGAG
226 S N Y E E E C S S H D S L F K L A K L H F Y L E
795 CTACAACAAAAAGAAGAACTTCGAATTGTAACAAAGTGGTACAAGGATATGAGGTTTCAGGAGGATACTCCGTAT
251 L Q Q K E E L R I V T K W Y K D M R F Q E D T P Y
870 GTAAGAGATAGAGTACCAGAGATTACTTGTGGATATGGGATTATACTTTGAGCCTCATTACTCCTTGGCAAGA
276 V R D R V P E I Y L W I L G L Y F E P H Y S L A R
945 ATCATCGCAACAAAAATAACATTGTTCTCCTCATTTTGGATGACACATATGATGCGTATGCTACCATTGATGAG
301 I I A T K I T L F L L I L D D T Y D A Y A T I D E
1 020 ATTCGCCTTCTAACATATGCGATAAACAAGTGGGATATAAGTGCTATGGAGCAAATTCGGAGTATATTAGACCA
326 I R L L T Y A I N K W D I S A M E Q I P E Y I R P
1 095 TTTTCAAAAGTTCTTATAAATGAATATGCTGAAATTGAGAAGAAAATGGCTAAAGAAGGGAGAGCAAACTACTGTA
351 F Y K V L I N E Y A E I E K K M A K E G A N T V
1 170 ATCGCTTCAAAAGAAGCGTTCCAAGACATAGCCAGAGGTCACCTTGAAGAAGCTGAATGGACAAACAGCGGATAT
376 I A S K E A F Q D I A R G H L E E A E W T N S G Y
1 245 GTAGCATCATTTCCGGATTATATGAAGAATGGATTAAATCACGTCGGGTATATAATCTCATTTCAAATTCGGCTTTA
401 V A S F P D Y M K N G L I T S G Y N L I S K S A L
1 320 GTTGGTATGGGTGATAACGTTGGTGAAGATGCTTTGGCTTGGTATGAAAGTCATCAAAGCCTTTGCAAGCTTCC
426 V G M G D N V G E D A L A W Y E S H P K P L Q A S
1 395 GAGTTGATTTCAAGACTTCAAGATGATGTCATGACTTACCAGTTTGAGCGTGAAGAGGACAATCGGCCACTAGC
451 E L I S R L Q D D V M T Y Q F E R E R G Q S A T S
1 470 GTTGATGCATATATCAAGACTTACGGCGTGTGAGAAAAGAAAGCTATAGATGAGCTCAAGAGCATGATTGAAAAAT
476 V D A Y I K T Y G V S E K K A I D E L K S M I E N
1 545 GCATGGAAGATATTAAACGAGGATGCTTAAAGCCGAGACAAAGTCCAAATGGATTGCTTGCCATAATTCTTAAC
501 A W K D I N E G C L K P R Q V P M D L L A I I L N
1 620 CTTGCAAGAATGATAGATGTGATATATAGGTACGACGACGGGTTCACCTTTCAAGGATCGACTATGAAGGAGTAT
526 L A R M I D V I Y R Y D D G F T F Q G S T M K E Y
1 695 ATCAATATTTGTTTGTGGATTCTACCCGTGTAAATCTCTAGAGGATCCCGGGTACCGAGCTCGAATCGTA
551 I N I L F V D S L P V *
1 770 ATCATGTCATGTCCCC

```

方框内为倍半萜类合成酶保守结构域 DDxxD; “*”表示终止密码子

The box is the DDxxD conserved domain of sesquiterpene synthase; “*” represents the stop codon

图 1 CnGAS 的核苷酸序列和推导出的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of CnGAS

ExPASy-ProtParam 在线分析结果显示蛋白质的理论相对分子质量为 6 470, 等电点为 5.21。CnGAS 基因的核苷酸序列与其他植物的 GAS 基因序列具有高度同源性 (表 3), CnGAS 基因与其他植物 GAS

基因的核苷酸序列的一致性均在 80%以上, 与番茄 GAS 基因的一致性高达 98%, 表明 CnGAS 基因是 GAS 基因家族的一个成员, 推测其可能编码植物倍半萜合成酶类吉马烯 A 合成酶蛋白。

表3 CnGAS的核苷酸序列与其他植物GAS基因的相似性比对
Table 3 Nucleotide sequence of CnGAS similarity to GAS gene of other plant species

物种	基因库登录号	同源性/%	E 值
除虫菊	KC441 526.1	94	0
欧蓍草	KC145 534.1	94	0
青蒿	AB786 707.1	91	0
苦艾	AB786 706.1	91	0
莴苣	AF489 964.1	83	0
朝鲜蓟	JN383 985.1	8	0
向日葵	EU327 785.1	82	0
尖裂假还阳参	DQ186 657.1	81	0
龙蒿	AY860 850.1	92	1×10^{-90}
番茄	DQ449 030.2	98	2×10^{-13}

2.2 CnGAS 蛋白质分析

CnGAS 基因编码的氨基酸序列在 NCBI 网站上进行 BLAST-protein 比对, 结果显示 CnGAS 蛋白质序列与其他植物 GAS 蛋白序列高度同源, 其中同源性最高的为除虫菊 GAS (AGO03788.1), 高达 92%, 与艾菊 *Tanacetum parthenium* L. (AEF41844.1)、欧蓍草 (AGD80135.1)、青蒿 (BAN81913.1)、苦艾 (BAN81912.1)、莴苣 (AAM11626.1)、朝鲜蓟 (AET95645.1)、向日葵 (ACZ50512.1) 等的 GAS 也有较高的同源性, 分别为 91%、91%、89%、88%、82%、81%、81%。运用 AlignX 软件将罗马洋甘菊转录组数据库的 4 条 GAS 蛋白质序列与 GAS 酶的氨基酸序列进行比对, 结果显示它们均含有植物倍半萜类合成酶家族典型的保守序列 DDxxD (图 2), 其中 CnGAS 与 GAS 酶的同源性最高, 其余 3 条 (Group1_Unigene_BMK.114094, Group2_Unigene_BMK.33910 和 Group1_Unigene_BMK.119630) 与 GAS 酶的同源性较低, 表明本实验克隆的 CnGAS 与其他植物 GAS 基因具有相似的功能, 进一步确定克隆的 CnGAS 基因编码萜类合成酶类蛋白。

2.3 CnGAS 基因分子进化分析

为了解 CnGAS 与其他植物 GAS 蛋白的分子进化关系, 利用 CLUSTAL X 2 和 MEGA6 软件, 将 CnGAS 蛋白质序列与转录组数据库中的 3 条 GAS 序列以及 GenBank 上其他物种的萜类合成酶 (19 条) 进行同源性分析, 利用 NJ 法构建系统进化树。由图 3 所示, 进化树被分为 2 大支: 第 1 支为草本植物菊科 (Asteraceae), 包括菊科中已经鉴定出的 GAS 基因分支及 3 条 GAS 基因的

Unigene 形成的一个分支; 第 2 支为木本植物包括杨柳科 (Salicaceae)、锦葵科 (Malvaceae)、蔷薇科 (Rosaceae) 和檀香科 (Santalaceae)。GAS 系统进化树结果表明, 萜类合成酶基因广泛存在于植物中, 其中 CnGAS 与欧蓍草的亲缘关系最近, 其次是艾菊、除虫菊、德国洋甘菊 *Matricaria chamomilla* L. (AFM43736.1)、青蒿、苦艾、向日葵、莴苣、尖裂假还阳参 *Crepidiastrum sonchifolium* (Houtt.) Nakai (ABB00361.1), 它们均为菊科植物, 说明同为菊科的 GAS 遗传关系最相近, CnGAS 与菊科植物的 GAS 蛋白亲缘关系最近, 进一步证明克隆得到的 CnGAS 基因为倍半萜类合成酶蛋白。另外, CnGAS 与檀香科亲缘关系是最远的, 这可能是由于檀香科是单子叶植物, 而其他 4 个科 (菊科、杨柳科、锦葵科、蔷薇科) 是双子叶植物, 进一步表明双子叶植物在遗传关系上更为接近。

2.4 CnGAS 基因组织表达分析

根据前期转录组测序获得的罗马洋甘菊转录组序列为参考数据, 进行基因注释, 基因的表达量采用 RPKM 法 (Reads Per Kb per Million reads) [20], 根据 RPKM 筛选出满足错误发生率 (False Discovery Ratio, FDR) ≤ 0.001 , 并且差异倍数不低于 2 倍 ($\log_2 \text{FDR} \geq 1$) [21-22] 的基因作为差异表达基因。本研究选择的 Group1_Unigene_BMK.8011 (CnGAS) 基因即为差异表达基因, 它在罗马洋甘菊根、茎、叶和花中的 RPKM 值分别为 0.05、1.29、14.19、28.14, 可以看出它在不同部位的表达量有明显的差异, 尤其在花中表达量最高 (图 4)。根据扩增得到的 CnGAS 基因进行 qRT-PCR 检测, 结果表明 qRT-PCR 检测结果与转录组 RNA-seq 结果相一致, CnGAS 基因在根、茎、叶和花中均有表达, 且在花中的表达量最高, 显著高于其他组织中的表达量 (图 4)。

3 讨论

菊科植物家族多富含丰富的药用成分, 如洋甘菊、青蒿、欧蓍草、艾菊、蒲公英等。尽管它们体内的化学成分变化很大, 但有些成分已被鉴定出来。这些从菊科植物中提取出来的化合物多用作药物, 如抗炎药、抗菌剂、抗出血药、解痉药和保肝药等 [23]。罗马洋甘菊植株中富含的活性物质有萜类化合物 (母菊萜、甜没药醇、STLs)、黄酮类化合物 (槲皮素、芹黄素、木犀草素)、香豆素、当归酸

CnGAS	MAAVQANV-----TTGVAQANTKTSAKPVPRPLANFPSPVWGTFRFLSFSLLKSEERYAM
AaGAS	MAAVQANV-----VTGIKANTKTSAPVPRPLANFPSPVWGDRLSFSLLRSELEYAI
AmGAS	MAAVQA-----TTGIQANTKTSAPVPRPLANFPSPKNGERFLSFSLLKSELEYAI
CcGAS	MAAVEAN-----ATLQASTNATAEPVPRPLANFPSPVWGDQFLSFSLLNSELEYAK
HaGAS3	MAAVDTN-----ATLICE-KTTAGPVPRPLANFPSPVWGDRLSFTLLNSELEYAK
LsGAS	MAAVEAN-----GILQANTKTTTEPVPRPLANFPSPVWGDRLSFSLLNTELEYAK
TcGAS	MAAVQANV-----TTGIQANTKTSAPVPRPLANFPSPVWGDRLSFSLLKSEERYAM
114094	ARSINSHNIAFINHTSKPISFTTTIHLQEMAANESN-----PILKTN-NETTTTPVRPLANFLPSIHWGDRFLSESFLKSELKALGK
33910	LEAKLILNPKEMATHEPYSILNGNTKTPTEMRPLASFPSPSIHWGDRFLSLSVETHELNACAK
119630	-----
CnGAS	AMEKPKEDLRRLIVDPKMDSEKILGLIYSVHRLGLTYFLQEIHSQLDKLFNEHSLODYEDVDLYTISINQVFRHLGYKLPCDVFNKF
AaGAS	AMEKPKEDLRRLIVDPKMDSEKILGLIYSVHRLGLTYFLQEIHSQLDKLFNEHSLODYEDVDLYTISINQVFRHLGYKLPCDVFNKF
AmGAS	DMEKPKEDLRRLIVDPKMDSEKILGLIYSVHRLGLTYFLQEIHSQLDKLFNEHSLODYEDVDLYTISINQVFRHLGYKLPCDVFNKF
CcGAS	DMEVPEKEDLRRLIVDPKMDSEKILGLIYSVHRLGLTYFLQEIHSQLDKLFNEHSLODYEDVDLYTISINQVFRHLGYKLPCDVFNKF
HaGAS3	AMEAPKEELRRLIVDPKMDSEKILGLIYSVHRLGLTYFLQEIHSQLDKLFNEHSLODYEDVDLYTISINQVFRHLGYKLPCDVFNKF
LsGAS	AMEEPEKEVRLRLIVDPKMDSEKILGLIYSVHRLGLTYFLQEIHSQLDKLFNEHSLODYEDVDLYTISINQVFRHLGYKLPCDVFNKF
TcGAS	AMEKPKEDLRRLIVDPKMDSEKILGLIYSVHRLGLTYFLQEIHSQLDKLFNEHSLODYEDVDLYTISINQVFRHLGYKLPCDVFNKF
114094	ATEEPKEELRRLILNTAMDPNEKILGLIYSVHRLGLTYFLQEIHSQLDKLFNEHSLODYEDVDLYTISINQVFRHLGYKLPCDVFNKF
33910	ATEAPKEEMRRLILSQSMDSEKILGLIYSVHRLGLTYFLQEIHSQLDKLFNEHSLODYEDVDLYTISINQVFRHLGYKLPCDVFNKF
119630	-----KELDLEDYKADLYTISINQVFRHLGYKLPCDVFNKF
CnGAS	VSSGTFKESITSDVRGMLGLYESAQLRIRGEKILDEASVTEGKRLKSVVNTLEGDLAQGVQSLRRPFHOGMPVVEARLYFSNYEBCS
AaGAS	VSSGTFKESITSDVRGMLGLYESAQLRIRGEKILDEASVTEGKRLKSVVNTLEGDLAQGVQSLRRPFHOGMPVVEARLYFSNYEBCS
AmGAS	VANSSTFKESITSDVRGMLGLYESAQLRIRGEKILDEASVTEGKRLKSVVNTLEGDLAQGVQSLRRPFHOGMPVVEARLYFSNYEBCS
CcGAS	VANSSTFKESITSDVRGMLGLYESAQLRIRGEKILDEASVTEGKRLKSVVNTLEGDLAQGVQSLRRPFHOGMPVVEARLYFSNYEBCS
HaGAS3	VANSSTFKESITSDVRGMLGLYESAQLRIRGEKILDEASVTEGKRLKSVVNTLEGDLAQGVQSLRRPFHOGMPVVEARLYFSNYEBCS
LsGAS	VSSGTFKESITSDVRGMLGLYESAQLRIRGEKILDEASVTEGKRLKSVVNTLEGDLAQGVQSLRRPFHOGMPVVEARLYFSNYEBCS
TcGAS	VSSGTFKESITSDVRGMLGLYESAQLRIRGEKILDEASVTEGKRLKSVVNTLEGDLAQGVQSLRRPFHOGMPVVEARLYFSNYEBCS
114094	VSSGTFKESITSDVRGMLGLYESAQLRIRGEKILDEASVTEGKRLKSVVNTLEGDLAQGVQSLRRPFHOGMPVVEARLYFSNYEBCS
33910	VSSGTFKESITSDVRGMLGLYESAQLRIRGEKILDEASVTEGKRLKSVVNTLEGDLAQGVQSLRRPFHOGMPVVEARLYFSNYEBCS
119630	-----
CnGAS	SIDSDF-KLAKLHFKYLLQKKEELRIVTKWKDMRFQETTPYIRDRVPEIYLWILGLYFEPYSLARIATKITLFLVLDDTYDYAT
AaGAS	YIDSLL-KLAKLHFKYLLQKKEELRIVTKWKDMRFQETTPYIRDRVPEIYLWILGLYFEPYSLARIATKITLFLVLDDTYDYAT
AmGAS	AIDSDF-KLAKLHFKYLLQKKEELRIVTKWKDMRFQETTPYIRDRVPEIYLWILGLYFEPYSLARIATKITLFLVLDDTYDYAT
CcGAS	MIGSLL-KLAKLHFKYLLQKKEELRIVTKWKDMRFQETTPYIRDRVPEIYLWILGLYFEPYSLARIATKITLFLVLDDTYDYAT
HaGAS3	THECLL-KLAKLHFKYLLQKKEELRIVTKWKDMRFQETTPYIRDRVPEIYLWILGLYFEPYSLARIATKITLFLVLDDTYDYAT
LsGAS	THESLV-KLAKLHFKYLLQKKEELRIVTKWKDMRFQETTPYIRDRVPEIYLWILGLYFEPYSLARIATKITLFLVLDDTYDYAT
TcGAS	SIDSDF-KLAKLHFKYLLQKKEELRIVTKWKDMRFQETTPYIRDRVPEIYLWILGLYFEPYSLARIATKITLFLVLDDTYDYAT
114094	YINSIQ-NLANAHFRLQLHKEELHNMWKWKDMRFQETTPYIRDRVPEIYLWILGLYFEPYSLARIATKITLFLVLDDTYDYAT
33910	YIDSLL-KLAKLHFKYLLQKKEELRIVTKWKDMRFQETTPYIRDRVPEIYLWILGLYFEPYSLARIATKITLFLVLDDTYDYAT
119630	YIDSLL-KLAKLHFKYLLQKKEELRIVTKWKDMRFQETTPYIRDRVPEIYLWILGLYFEPYSLARIATKITLFLVLDDTYDYAT
CnGAS	IDEIRLLTDALNKWDISAMEQIPEYIRPFYKILLDEYAEIEKKMAKEGRANTVIASKAFAQDIARGYLEEAEWNSGVASFPEYMKNGL
AaGAS	IDEIRLLTDALNKWDISAMEQIPEYIRPFYKILLDEYAEIEKKMAKEGRANTVIASKAFAQDIARGYLEEAEWNSGVASFPEYMKNGL
AmGAS	IDEIRLLTDALNKWDISAMEQIPEYIRPFYKILLDEYAEIEKKMAKEGRANTVIASKAFAQDIARGYLEEAEWNSGVASFPEYMKNGL
CcGAS	IDEIRLLTDALNRWELCASEQIPEYIRPFYKILLDEYAEIEKKMAKEGRANTVIASKAFAQDIARGYLEEAEWNSGVASFPEYMKNGL
HaGAS3	IDEIRLLTDALNRWELCASEQIPEYIRPFYKILLDEYAEIEKKMAKEGRANTVIASKAFAQDIARGYLEEAEWNSGVASFPEYMKNGL
LsGAS	IDEIRLLTDALNRWELCASEQIPEYIRPFYKILLDEYAEIEKKMAKEGRANTVIASKAFAQDIARGYLEEAEWNSGVASFPEYMKNGL
TcGAS	IDEIRLLTDALNRWELCASEQIPEYIRPFYKILLDEYAEIEKKMAKEGRANTVIASKAFAQDIARGYLEEAEWNSGVASFPEYMKNGL
114094	IDEIRLLTDALNRWELCASEQIPEYIRPFYKILLDEYAEIEKKMAKEGRANTVIASKAFAQDIARGYLEEAEWNSGVASFPEYMKNGL
33910	IDEIRLLTDALNRWELCASEQIPEYIRPFYKILLDEYAEIEKKMAKEGRANTVIASKAFAQDIARGYLEEAEWNSGVASFPEYMKNGL
119630	IDEIRLLTDALNRWELCASEQIPEYIRPFYKILLDEYAEIEKKMAKEGRANTVIASKAFAQDIARGYLEEAEWNSGVASFPEYMKNGL
CnGAS	ITSAGNLSKSAVGMGDIVSEDALAWYESHPKTLQASELISRLQDDVMTYQFERERGC-SATGVDAIKITYGVSEKKAIDELKMIENA
AaGAS	ITSAGNLSKSAVGMGDIVSEDALAWYESHPKTLQASELISRLQDDVMTYQFERERGC-SATGVDAIKITYGVSEKKAIDELKMIENA
AmGAS	ITSAGNLSKSAVGMGDIVSEDALAWYESHPKTLQASELISRLQDDVMTYQFERERGC-SATGVDAIKITYGVSEKKAIDELKMIENA
CcGAS	ITSAGNLSKSAVGMGDIVSEDALAWYESHPKTLQASELISRLQDDVMTYQFERERGC-SATGVDAIKITYGVSEKKAIDELKMIENA
HaGAS3	ITSAGNLSKSAVGMGDIVSEDALAWYESHPKTLQASELISRLQDDVMTYQFERERGC-SATGVDAIKITYGVSEKKAIDELKMIENA
LsGAS	ITSAGNLSKSAVGMGDIVSEDALAWYESHPKTLQASELISRLQDDVMTYQFERERGC-SATGVDAIKITYGVSEKKAIDELKMIENA
TcGAS	ITSAGNLSKSAVGMGDIVSEDALAWYESHPKTLQASELISRLQDDVMTYQFERERGC-SATGVDAIKITYGVSEKKAIDELKMIENA
114094	ITSAGNLSKSAVGMGDIVSEDALAWYESHPKTLQASELISRLQDDVMTYQFERERGC-SATGVDAIKITYGVSEKKAIDELKMIENA
33910	ITSAGNLSKSAVGMGDIVSEDALAWYESHPKTLQASELISRLQDDVMTYQFERERGC-SATGVDAIKITYGVSEKKAIDELKMIENA
119630	ITSAGNLSKSAVGMGDIVSEDALAWYESHPKTLQASELISRLQDDVMTYQFERERGC-SATGVDAIKITYGVSEKKAIDELKMIENA
CnGAS	WKDINEGCLKPRQVSMDDLAPILNLARMIDVVYRYDDGFTFPGKTLKEYINLLFVGSLLPV---
AaGAS	WKDINEGCLKPRQVSMDDLAPILNLARMIDVVYRYDDGFTFPGKTLKEYINLLFVGSLLPV---
AmGAS	WKDINEGCLKPRQVSMDDLAPILNLARMIDVVYRYDDGFTFPGKTLKEYINLLFVGSLLPV---
CcGAS	WKDINEGCLKPREVSMDDLAPILNLARMIDVVYRYDDGFTFPGKTLKEYINLLFVGSLLPV---
HaGAS3	WKDINEGCLKPREVSMDDLAPILNLARMIDVVYRYDDGFTFPGKTLKEYINLLFVGSLLPV---
LsGAS	WKDINEGCLKPREVSMDDLAPILNLARMIDVVYRYDDGFTFPGKTLKEYINLLFVGSLLPV---
TcGAS	WKDINEGCLKPREVSMDDLAPILNLARMIDVVYRYDDGFTFPGKTLKEYINLLFVGSLLPV---
114094	WKDINEGCLKPREVSMDDLAPILNLARMIDVVYRYDDGFTFPGKTLKEYINLLFVGSLLPV---
33910	WKDINEGCLKPREVSMDDLAPILNLARMIDVVYRYDDGFTFPGKTLKEYINLLFVGSLLPV---
119630	WKDINEGCLKPREVSMDDLAPILNLARMIDVVYRYDDGFTFPGKTLKEYINLLFVGSLLPV---

CnGAS-罗马洋甘菊 GAS AaGAS-青蒿 GAS AmGAS-欧蓍草 GAS CcGAS-朝鲜蓟 GAS HaGAS3-向日葵 GAS LsGAS-莴苣 GAS TcGAS-除虫菊 GAS 114094-Group1_Unigene_BMK.114094 33910-Group2_Unigene_BMK.33910 119630-Group1_Unigene_BMK.119630 黑底白字部分表示完全一致,灰底白字部分表示保守区,方框内为倍半萜类合成酶保守结构域 DDxxD

CnGAS-*C. nobile* GAS AaGAS-*A. annua* GAS AmGAS-*A. millefolium* GAS CcGAS-*C. cardunculus* GAS HaGAS3-*H. annuus* GAS LsGAS-*L. sativa* GAS TcGAS-*T. cinerariifolium* GAS 114094-Group1_Unigene_BMK.114094 33910-Group2_Unigene_BMK.33910 119630-Group1_Unigene_BMK.119630 Shaded in black are identical sequence. Shaded in gray are conservative sequence. The box is DDxxD conserved domain of sesquiterpene synthase

图 2 CnGAS 编码蛋白与已知 GAS 蛋白的相似性分析

Fig. 2 Similarity analysis of CnGAS-coding protein and other known GAS proteins

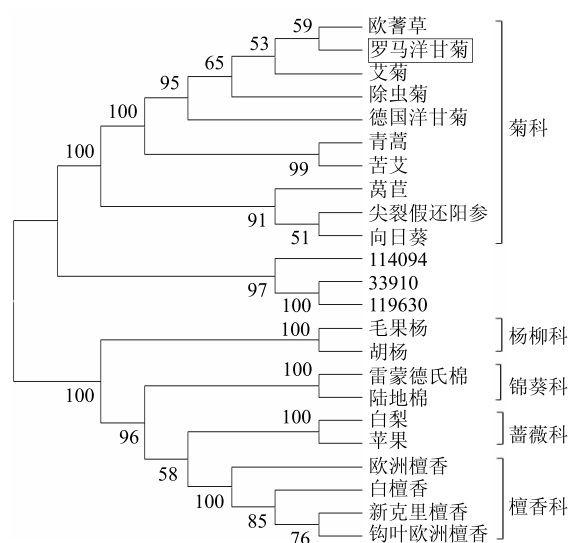


图 3 植物 GAS 家族系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of genes in plant GAS gene family

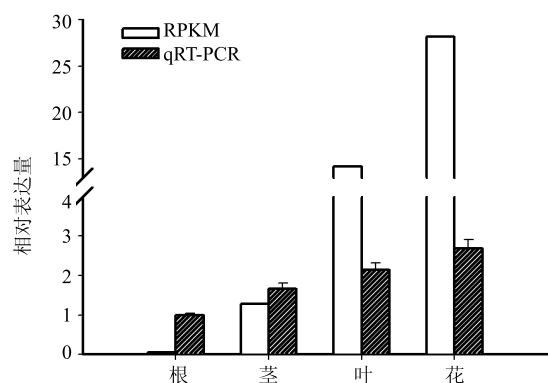


图 4 CnGAS 基因的转录组 RPKM 值和 qRT-PCR 表达量
Fig. 4 RPKM value and qRT-PCR relative expression of CnGAS gene in different tissues

丁酯、脂肪酸以及胆碱等^[4]。其中 STLs 是许多菊科植物中的典型成分，表现出很强的药理学、生理学和生态学特性，具有抗偏头痛、抗真菌、抗细菌等生物活性，并且能够抵御害虫和食草性动物。倍半萜烯包括吉马烯，在菊科植物中量丰富，吉马烯在其倍半萜烯衍生物的合成上起到重要作用，特别是 STLs 的生物合成^[24]。目前，尽管 STLs 在植物中的生物合成途径还未完全阐明，但是其生物合成途径中的基因，特别是 GAS 基因、吉马烯 A 氧化物 (germacrene A oxidase, GAO) 和木香烯内酯合成酶 (costunolide synthase, COS) 已相继从菊科植物中克隆得到^[25-26]。

目前已有 10 余种菊科植物的 GAS 基因被报道，包括除虫菊、艾菊、欧蓍草、青蒿、苦艾、莨菪和朝

鲜蓟。同样，在某些菊科植物中的 GAS 同工酶基因也被鉴别得到，如菊苣 (长 CiGAS 和短 CiGAS)^[11]、生菜 (LTC1 和 LTC2)^[27]、向日葵腺毛 (GAS1、GAS2 和 GAS3)^[15]。因此，在罗马洋甘菊中也有可能存在一种以上形式的 GAS。本研究从罗马洋甘菊中克隆得到了 CnGAS 基因，它与其他菊科植物的 GAS 基因序列表现出高度同源性 (图 2)。系统进化树表明它与欧蓍草的亲缘关系最近，其次是艾菊、除虫菊和德国洋甘菊等。菊科家族的 GAS 基因在进化树上是单独一支，表明它是单起源，这与之前 GAS 基因只出现于菊科植物的研究是一致的^[28]。

根据 TPS 合成产物的不同，可以分为单萜合成酶、倍半萜合成酶和双萜合成酶等，它们分别以 GPP、FPP 和 GGPP 为底物合成相应的单萜、倍半萜和双萜化合物^[29]。TPS 在空间结构上具有很高的相似性，均含有 C-末端结构域和 N-末端结构域，C-末端结构域是酶活性中心，N-末端结构域对 C-末端结构域活性区起到正确的折叠作用^[25]。GAS 是一个双结构域的 α - β -TPS， α -结构域 (C-末端结构域) 表现出 TPSa 亚族的活性^[30]。 β -结构域 (N-末端结构域) 丢失了单萜和倍半萜合成酶的催化活性^[31]。因此，GAS 蛋白的 N 末端结构序列上表现出极大的变化可能与 α - β -TPS 的 2 个结构域相关。研究报道几乎所有的 TPS 都含有倍半萜合成酶类基因家族典型的保守序列 DDxxD，该基序被认为起到结合金属离子的作用，并且在引导底物催化时也发挥着至关重要的作用^[32]，本研究发现 CnGAS 蛋白质序列中也存在该保守序列 (图 1、2)，表明其编码的蛋白质具有催化倍半萜合成的功能。

研究表明 GAS 基因在不同植物中的组织表达模式存在较大差异，如在齿缘苦蕒营养生长期，GAS 基因在其叶和根中的转录活性相似，而到了花期，其根中的 GAS 基因转录活性却发生极大的变化与叶形成竞争关系^[13]。CcGAS 基因的成熟叶、老叶、花托中均有表达，而在苞片中却没有表达^[16]。GAS 基因在欧蓍草中所有部位均有表达，其在花和叶中的表达量较高，根、茎次之^[17]。罗马洋甘菊花器官由于富含萜类化合物如母菊萜、 α -蒎烯、金合欢烯、 α -甜没药醇及其氧化物等，因此被用作药用成分的主要提取来源，其主要成分为母菊萜 (占总萜类化合物的 28%~31%)^[3]。本研究结果显示 CnGAS 基因在罗马洋甘菊在花器官中的表达量显著高于其他组织，与前期报道的倍半萜类化合物在

洋甘菊花中的量最高的结果相一致^[3], 表明 CnGAS 基因可能在罗马洋甘菊倍半萜化合物合成中发挥重要作用。

本研究从罗马洋甘菊中克隆得到了倍半萜合成酶基因 CnGAS 的 cDNA 全长, 后期研究将会集中于验证 CnGAS 在植物体内的功能。借助遗传图谱技术, 研究其他与 STLs 的生物合成相关候选基因的识别, 重点关注 GAS 下游酶基因, 如 GAO 基因和 COS 基因, 这将为研究 STLs 的生物合成途径以及提高植物体内 STLs 的量奠定基础。

参考文献

- [1] Ma C M, Winsor L, Daneshtalab M. Quantification of spiroether isomers and Herniarin of different parts of *Matricaria matricarioides* and flowers of *Chamaemelum nobile* [J]. *Phytochem Anal*, 2007, 18(1): 42-49.
- [2] Srivastava J K, Shankar E, Gupta S. Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future [J]. *Mol Med Rep*, 2010, 3(6): 895-901.
- [3] Farhoudi R. Chemical constituents and antioxidant properties of *Matricaria recutita* and *Chamaemelum nobile* essential oil growing wild in the south west of Iran [J]. *J Essent Oil Bear Pl*, 2013, 16(4): 531-537.
- [4] Newall C A, Anderson L A, Phillipson J D. *Herbal Medicines. A Guide for Health-care Professionals* [M]. London: The Pharmaceutical Press, 1996.
- [5] 岳跃冲, 范燕萍. 植物萜类合成酶及其代谢调控的研究进展 [J]. *园艺学报*, 2011, 38(2): 379-388.
- [6] Bohlmann J, Keeling C I. Terpenoid biomaterials [J]. *Plant J*, 2008, 54(4): 656-669.
- [7] 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.
- [8] 马转转, 庞潇卿, 湛容, 等. 萜类化合物生物合成途径中关键酶的研究进展 [J]. *杭州师范大学学报: 自然科学版*, 2015, 14(6): 608-615.
- [9] Enfissi E, Fraser P D, Lois L M, et al. Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato [J]. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3(1): 17-27.
- [10] Prosser I, Phillips A L, Gittings S, et al. (+)-(10R)-Germacrene A synthase from goldenrod, *Solidago canadensis*; cDNA isolation, bacterial expression and functional analysis [J]. *Phytochemistry*, 2002, 60(7): 691-702.
- [11] Bouwmeester H J, Kodde J, Verstappen F W A, et al. Isolation and characterization of two germacrene A synthase cDNA clones from chicory [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129(1): 134-144.
- [12] de Kraker J W, Franssen M C R, Joerink M, et al. Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129(1): 257-268.
- [13] Kim M Y, Chang Y J, Bang M H, et al. cDNA isolation and characterization of (+)-germacrene A synthase from *Ixeris dentata* form. *albiflora* Hara [J]. *J Plant Biol*, 2005, 48(2): 178-186.
- [14] Berteau C M, Voster A, Verstappen F W A, et al. Isoprenoid biosynthesis in *Artemisia annua*: Cloning and heterologous expression of a germacrene A synthase from a glandular trichome cDNA library [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 448(1): 3-12.
- [15] Göpfert J C, MacNevin G, Ro D K, et al. Identification, functional characterization and developmental regulation of sesquiterpene synthases from sunflower capitule glandular trichomes [J]. *BMC Plant Biol*, 2009, 9(1): 86-92.
- [16] Menin B, Comino C, Portis E, et al. Genetic mapping and characterization of the globe artichoke (+)-germacrene A synthase gene, encoding the first dedicated enzyme for biosynthesis of the bitter sesquiterpene lactone cynaropicrin [J]. *Plant Sci*, 2012, 190(190): 1-8.
- [17] Pazouki L, Memari H R, Astrid K, et al. Germacrene A synthase in yarrow (*Achillea millefolium*) is an enzyme with mixed substrate specificity: gene cloning, functional characterization and expression analysis [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 111(6): 1-15.
- [18] Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays [J]. *J Mol Endocrinol*, 2000, 25(2): 169-193.
- [19] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [20] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. *Nat Methods*, 2008, 5(7): 621-628.
- [21] Audic S, Claverie J M. The significance of digital gene expression profiles [J]. *Genome Res*, 1997, 7(10): 986-995.
- [22] Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency [J].

- Ann Stat*, 2001, 25(9): 1165-1188.
- [23] Hădărugăa N G, Hădărugăb D I, Tatuc C, *et al.* Multivariate analysis (PCA) in compositae biocompounds class [J]. *J Agroaliment Proc Technol*, 2009, 15(2): 201-210.
- [24] Adio A M. Germacrenes A-E and related compounds: thermal, photochemical and acid induced transannular cyclizations [J]. *Tetrahedron*, 2009, 65(8): 1533-1552.
- [25] Degenhardt J, Köllner T G, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(15): 1621-1637.
- [26] Nguyen D T, Göpfert J C, Ikezawa N, *et al.* Biochemical conservation and evolution of germacrene A oxidase in Asteraceae [J]. *J Biological Chem*, 2010, 285(22): 16588-16598.
- [27] Bennett M H, Mansfield J W, Lewis M J, *et al.* Cloning and expression of sesquiterpene synthase genes from lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. *Phytochemistry*, 2002, 60(3): 255-261.
- [28] Majdi M, Liu Q, Karimzadeh G, *et al.* Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.) [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(14): 1739-1750.
- [29] Schillmiller A L, Schauvinhold I, Larson M, *et al.* Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(26): 10865-10870.
- [30] Memari H R, Pazouki L, Niinemets Ü. The biochemistry and molecular biology of volatile messengers in trees [A] // *Biology, Controls and Models of Tree Volatile Organic Compound Emissions* [M]. Tree Physiology: Springer Netherlands, 2013.
- [31] Aaron J A, Christianson D W. Trinuclear metal clusters in catalysis by terpenoid synthases [J]. *Pure Appl Chem*, 2010, 82(8): 1585-1597.
- [32] Christianson D W. Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases [J]. *Cheminform*, 2006, 37(44): 3412-3442.