

温郁金萜类合成酶基因 *CwTPS05*、*CwTPS10* 的克隆与表达分析

丁贤华^{1,2}, 张丽萍^{3#}, 费璇¹, 赵琪^{1,2}, 任仙樱⁴, 吴志刚^{1*}, 姜程曦^{1,3*}

1. 温州医科大学药学院, 浙江 温州 325035
2. 安徽江南生物技术研究中心, 安徽 池州 247100
3. 温州大学生命科学研究院, 浙江 温州 325035
4. 温州栽金医药有限公司, 浙江 乐清 325600

摘要: 目的 克隆温郁金 *Curcuma wenyujin* 萜类合成酶基因 (*CwTPS05*、*CwTPS10*) 并进行生物信息学及表达分析, 为今后利用代谢工程生产温郁金萜类成分提供依据。方法 根据前期温郁金转录组测序数据, 利用 PCR 技术从根茎 cDNA 文库中克隆 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 序列; 生物信息学分析其核苷酸和氨基酸序列特征; qRT-PCR 检测基因在不同组织中的表达水平。结果 克隆获得 *CwTPS05* (GenBank 登入号: MT814867) 基因, 开放阅读框全长 1446 bp, 编码 481 个氨基酸, 预测相对分子质量为 55 990; *CwTPS10* (GenBank 登入号: MT814863) 基因, 开放阅读框全长 1494 bp, 编码 497 个氨基酸, 预测相对分子质量为 58 550。 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 均属于酸性、非跨膜、无转运肽的亲水性蛋白。同源进化树分析表明, *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 基因被归类为植物萜类合成酶 TPSa 亚家族。qRT-PCR 分析表明, *CwTPS05* 在根茎中特异性表达, *CwTPS10* 在根茎和块根中特异性表达。结论 成功克隆获得温郁金 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 基因并进行生物信息分析, 为研究温郁金萜类成分的生物合成途径提供参考。

关键词: 温郁金; 萜类合成酶; 克隆; 生物信息学分析; 表达分析

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2022)02 - 0538 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.02.024

Cloning and expression analysis of terpene synthase *CwTPS05* and *CwTPS10* from *Curcuma wenyujin*

DING Xian-hua^{1,2}, ZHANG Li-ping³, FEI Xuan¹, ZHAO Qi^{1,2}, REN Xian-ying⁴, WU Zhi-gang¹, JIANG Cheng-xi^{1,3}

1. School of Pharmacy, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China
2. Anhui Jiangnan Biotechnology Research Center, Chizhou 247100, China
3. Institute of Life Sciences, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China
4. Wenzhou Ejin Pharmaceutical Co., Ltd., Leqing 325600, China

Abstract: Objective To clone genes encoding the terpene synthases (*CwTPS05* and *CwTPS10*) from the total RNA of the rhizome of *Curcuma wenyujin*, investigate their expression patterns, and then provide a basis for the production of *C. wenyujin* terpenoids through metabolic engineering platform. **Methods** According to the transcriptome sequencing data previously sequenced, PCR technology was used to obtain the sequences of two specifically expressed genes *CwTPS05* and *CwTPS10* in rhizome; bioinformatics software was used to analyze their nucleotide and amino acid sequences; qRT-PCR was used to detect their expression levels in different tissues. **Results** The full sequence of *CwTPS05* (accession: MT814867) gene was obtained, with the open reading frame (ORF) length of 1446 bp, encoding 481 amino acids; The predicted molecular weight was 55 990. Similarly, the sequence of *CwTPS10* (accession: MT814863) gene was also obtained with the length of 1494 bp ORF, encoding 497 amino acids, the predicted molecular weight was 58 550. *CwTPS05* and *CwTPS10* were both acidic, non-transmembrane, and non-transit peptide hydrophilic

收稿日期: 2021-08-09

基金项目: 温州应急重大专项 (ZY202002); 合肥未来药物开发有限公司横向课题 (KJHX2008); 温州医科大学人才项目 (89220027); 浙江省重点实验室项目 (2021E10013)

作者简介: 丁贤华 (1983—), 女, 安徽石台人, 硕士, 研究方向为中药生物技术。Tel: (0577)86699891

*通信作者: 姜程曦 (1971—), 男, 安徽青阳人, 教授, 研究方向为中药生物技术研究。Tel: 18969715696 E-mail: jiangchengxi@126.com

吴志刚 (1979—), 副研究员, 主要从事药用植物次生代谢产物研究。E-mail: wuzhigang177@126.com

#共同第一作者: 张丽萍 (1996—), 女, 河北唐山人, 硕士研究生, 研究方向为中药学。Tel: (0577)86591685

proteins. The homologous phylogenetic tree analysis showed that the *CwTPS05* and *CwTPS10* genes were classified as *TPSa* subfamily. The qRT-PCR analysis showed that *CwTPS05* was specifically expressed in the rhizome, and *CwTPS10* was specifically expressed in the rhizome and tuber. **Conclusion** The *CwTPS05* and *CwTPS10* genes of *C. wenyujin* are successfully cloned and analyzed by bioinformatics, which provide a solid basis for studying the biosynthetic pathways of terpenoids in *C. wenyujin*.

Key words: *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling; terpene synthase; cloning; bioinformatics analysis; expression analysis

温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 是姜科姜黄属药用植物, 主产于浙江瑞安, 根据其不同部位或不同加工方法, 可制成温郁金、温莪术、片姜片 3 种中药, 含有挥发油、姜黄素、生物碱、多糖、微量元素等多种化学成分^[1-2]。挥发油为温郁金主要活性成分之一, 被广泛应用于医药、日用品、食品、化妆品等领域^[3-4]。挥发油的主要成分为萜类, 包括倍半萜类、单萜类和二萜类, 具有杀菌、抗病毒、抗炎及活血化瘀的功效^[5-6]。但目前温郁金挥发油的获得主要依赖于原料药材水蒸气蒸馏提取, 由于含量低, 提取困难, 且耗时较长, 难以满足医药工业生产需求。因而, 采用代谢工程技术手段异源宿主生产温郁金高价值萜类有效成分今后的发展趋势。

植物萜类代谢产物的生物合成受甲羟戊酸 (mevalonic acid, MVA) 和甲基赤藓醇-4-磷酸 (methylerythritol phosphate, MEP) 途径中多种酶的调控, 其中, 萜类合成酶 (terpene synthase, TPS) 是 MVA 和 MEP 途径中催化形成萜类产物结构多样性最后一步反应的关键酶^[7]。目前, 伴随萜类生物合成途径的逐步解析和分子生物学手段的不断发展, TPS 基因的分离克隆已经成为植物萜类代谢工程的热点。随着不同物种基因组测序相继完成, 拟南芥、水稻、大豆、马铃薯、西瓜、番茄和烟草等多种植物的 TPS 基因已被陆续鉴定^[8-13]。但迄今为止, 有关温郁金的研究多聚焦于植物形态学、化学成分以及药理作用方面, 温郁金萜类成分相关基因的克隆与表达鲜有报道。

课题组在前期转录组测序数据中, 发现 2 条在温郁金根茎中特异表达的 TPS 转录本^[14]。因此, 本研究对这 2 个 TPS 基因进行克隆, 并进行了相关生物信息学分析及其在各组织表达情况分析, 为研究温郁金萜类物质的生物合成代谢途径提供参考。

1 材料与试剂

1.1 材料

温郁金种茎采自浙江省温州市陶山镇 GAP 种植基地, 经温州医科大学吴志刚副研究员鉴定为姜

科植物温郁金 *C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的根茎, 并沙藏留种。种茎于 2019 年 4 月穴盆种植, 基质为无菌土。花、叶片、根茎、块根分别以开花期、叶丛期、根茎膨大期及块茎形成期采收, 洗净, 在液氮下研磨成粉末并贮存于 -80 °C 冰箱保存。

1.2 试剂

Zero Background pTOPO-TA 载体购自北京艾德莱生物有限公司; TransTaq® DNA Polymerase High Fidelity 复合酶购自北京全式金生物技术有限公司; T4 DNA 连接酶及限制性内切酶、PrimeScript™ II Reverse Transcriptase 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (TaKaRa 公司); DNA 回收纯化试剂盒、质粒小提试剂盒购自美国 AXYGEM 公司; Gelred 核酸染料、Hiper SYBR Premix EsTaq plus、RNA 提取试剂盒购自北京聚美美生物科技有限公司; 引物合成及测序由南京钟鼎生物科技有限公司提供。

2 方法

2.1 温郁金总 RNA 提取及 cDNA 合成

使用 RNA 提取试剂盒提取温郁金总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 采用分光光度法检测 RNA 的纯度。按照逆转录试剂说明书, 以提取的温郁金总 RNA 为模板, 逆转录合成得到 cDNA。

2.2 基因克隆与测序

根据前期温郁金转录组数据获得的 TPS 基因序列, 使用 Primer Premier 5.0 设计特异引物 (*CwTPS05*-F : 5'-GACAACGCATAACAAC-3' ; *CwTPS05*-R : 5'-TTGCCTCTGATAGTCCT-3' ; *CwTPS10*-F : 5'-ATGGAGAAGCAATCGACCAG-3' ; *CwTPS10*-R : 5'-ATAGGGTGTGACACTCTTAA-3')。以温郁金根茎 cDNA 为模板, 扩增 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 基因全长。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 47 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 复性 7 min; 4 °C 保存。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用 DNA 回收纯化试剂盒将目的条带切胶回收, 将其连接

TOPO-TA 克隆载体后转化至大肠杆菌 TOP10 菌株, 挑取阳性单菌落进行 PCR 验证, 无误后送南京钟鼎生物科技有限公司测序。

2.3 生物信息学分析

依据 *CwTPS05*、*CwTPS10* 基因测序结果, 利用 NCBI 的 ORF Finder 在线软件查找基因开放阅读框 (open reading frame, ORF) 及翻译其所编码的氨基酸序列; 采用 ExPASy 在线网站分析蛋白的理化性质、亲水/疏水性等情况; TMHMM Server v. 2.0 和 Signal P 4.1 Server 预测蛋白跨膜区结构域和信号肽; WOLF PSORT 在线工具预测蛋白亚细胞定位; SOPMA 分析蛋白二级结构, 使用 SWISS-MODEL 线上网站进行蛋白三维同源建模; 利用 NCBI 在线 BLASTP 程序获得相似度较高的序列, 由 GENEDOC 软件进行氨基酸多序列比对, 利用 MEME 在线软件进行氨基酸保守基序分析, 并利用 MEGA 7.0 软件中的邻接法 (neighbor joining, NJ) 进行系统进化树分析。

2.4 表达模式分析

使用荧光定量 PCR 仪分析 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 基因在温郁金不同组织中的表达模式。依据序列设计 qRT-PCR 特异引物 (*CwTPS05*-F: 5'-TTTGTAGGTATGGGAGAAG-3'; *CwTPS05*-R: 5'-CTGTAGAGGCGAAATGAT-3'; *CwTPS10*-F: 5'-TCAGTTTCGTTTACTTAGGC-3'; *CwTPS10*-R: 5'-CTTCTTTCAAGGTGGCAT-3'), 以 18 S (F: 5'-CCGTCCTAGTCTCAACCATAAACG-3'; R: 5'-CTCCCCCGGAACCCAAAGAC-3') 为内参基因。配制反应体系如下: 2×M5 Hiper SYBR Premix EsTaq plus (with Tli RNaseH) 10 μL, 正反引物各 0.4 μL (10 μmol/L), cDNA 模板 0.5 μL, ddH₂O 8.7 μL, 并以 0.5 μL ddH₂O 代替模板作为阴性对照。反应程序为 95 °C、30 s, 1 个循环; 95 °C、10 s, 60 °C、15 s, 72 °C、30 s, 40 个循环。每个样品分别进行 3 次技术性和 3 次生物学重复, 采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算基因相对表达水平。

3 结果与分析

3.1 温郁金总 RNA 的提取

经琼脂糖凝胶电泳, 显示所提温郁金总 RNA 的 28 S 和 18 S 条带清晰, 28 S 亮度约为 18 S 亮度的 2 倍, 且 2 条带均无明显弥散拖尾现象 (图 1)。由此可见, 所提取的温郁金总 RNA 质量较好, 可用于后续实验。

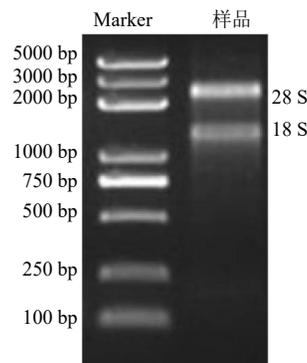
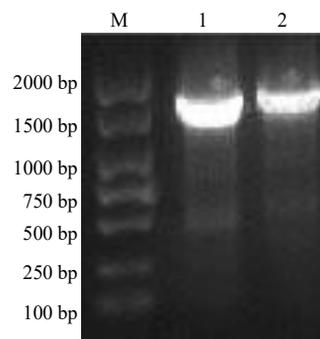


图 1 温郁金总 RNA 电泳图

Fig. 1 Total RNA electrophoresis of *C. wenyujin*

3.2 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 基因克隆与序列分析

利用 PCR 扩增, 获得全长约 1600 bp 目的片段, 与预期结果基本一致 (图 2)。将 PCR 产物回收纯化并克隆, 挑选阳性菌落进行菌液 PCR 检测并测序, 结果获得大小为 1654 bp 和 1578 bp 2 个基因片段。ORF Finder 预测 2 个基因均含有 1 个完整的开放阅读框, 长度分别为 1446、1494 bp, 分别编码 481、497 个氨基酸。在 NCBI 上通过 BLASTP 比对发现这 2 个基因序列与其他物种的萜类合成酶高度同源, 表明基因克隆正确, 并提交 NCBI, 分别命名为 *CwTPS05* (accession: MT814867)、*CwTPS10* (accession: MT814863)。



M-Marker 1-*CwTPS10* 2-*CwTPS05*

图 2 温郁金基因扩增结果

Fig. 2 Amplification results of *C. wenyujin* gene

3.3 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 蛋白理化性质分析

利用在线软件 ProtParam 对 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 基因编码的氨基酸序列进行分析, 发现 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 蛋白相对分子质量分别为 55 990 和 58 550, 分子式分别为 C₂₅₁₇H₃₉₄₃N₆₅₅O₇₅₂S₁₈ 和 C₂₆₅₅H₄₁₃₈N₆₇₆O₇₇₄S₂₀, 等电点分别为 5.18、5.34, 均为酸性蛋白, 不稳定系数分别为 43.12、45.64, 均

为不稳定蛋白。利用 ProtScale 分析 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 基因编码蛋白的亲疏水性, 发现 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 蛋白分别第 250 位和第 150 位疏水性是最强的, 最高值分别为 2.056、3.344, 分别第 408 位和第 178 位亲水性是最强的, 最低值分别为-3.389 和-3.478。*CwTPS05* 和 *CwTPS10* 蛋白疏水氨基酸的数目均比亲水氨基酸的数目少, 预测这 2 个蛋白均为亲水性蛋白。

3.4 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 蛋白信号肽、亚细胞定位及跨膜区预测

利用 TMHMM Server V. 2.0 服务器对 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 编码的蛋白进行跨膜结构预测, 结果显示这两个蛋白均无跨膜区域。利用在线网站 SignalP 预测 *CwTPS05*、*CwTPS10* 蛋白氨基酸序列中潜在的信号肽剪切位点, 结果显示这 2 个蛋白均无信号肽序列, 可能为非分泌蛋白。利用 WOLF PSORT 在线软件进行分析, 初步判断 *CwTPS05*、*CwTPS10* 蛋白均位于细胞质中。

3.5 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 蛋白二级结构及三维同源建模

使用 SOPMA 来推测 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 蛋白的二级结构, 结果显示 *CwTPS05* 蛋白的二级结构中含有有 α -螺旋、 β -转角、伸展链和无规卷曲, 分别占总氨基酸的 76.72%、2.91%、2.70%、17.67%; *CwTPS10* 蛋白的二级结构中也含有 α -螺旋、 β -转角、伸展链和无规卷曲, 分别占总氨基酸的 74.5%、3.41%、4.22%、17.87%。利用 SWISS-MODEL 同源建模系统对 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 蛋白三级结构进行预测 (图 3), 显示 2 个基因与(-)-三甲酚合酶[(-)-drimenol synthase, PDB 注册号 7cyj.1.A]具有相似性, 与 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 氨基酸序列相似性分别为 39.45%和 43.03%, 模型质量得分 (GMQE) 分别为 0.78 和 0.8, 覆盖度均为 0.99。

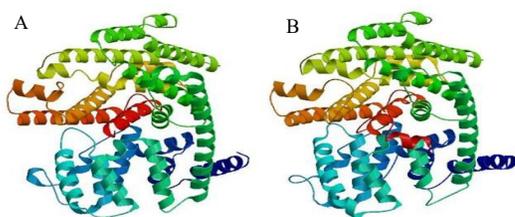


图 3 *CwTPS05* (A) 和 *CwTPS10* (B) 蛋白三级结构同源建模

Fig. 3 Homologous modeling of tertiary structure of *CwTPS05* (A) and *CwTPS10* (B) proteins

3.6 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 氨基酸序列的同源性及系统进化树分析

将 *CwTPS05* 编码的氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blast P 分析, 结果表明它和多个倍半萜合成酶基因有较高的相似性, 其中与莪术大根香叶烯-B 合成酶 (germacrene B synthase, BBE32340.1) 相似性最高, 达 97.46%, 与红球姜 β -叶安醇合成酶 (β -eudesmol synthase, B1B1U4.1), 姜(+)-大根香叶烯-D 合成酶 [(+)-germacrene D synthase, Q0VHD6.1], 红球姜倍半萜合成酶 4 (sesquiterpene synthase 4, BAG50434.1), 红球姜倍半萜合成酶 6 (sesquiterpene synthase 6, BAG50438.1) 也有较高同源性, 序列一致性 (identity) 分别为 85.05%、83.30%、74.15%、74.36%。此外, *CwTPS10* 与莪术 β -叶安醇合成酶 (β -eudesmol synthase, BBE32333.1) 的相似性最高, 达 98.39%, 与红球姜倍半萜合成酶 3 (sesquiterpene synthase 3, BAG50433.1), 红球姜 α -蛇麻烯合成酶 (α -humulene synthase, B1B1U3.1), 红球姜倍半萜合成酶 5 (sesquiterpene synthase 5, BAG50432.1), 红球姜倍半萜合成酶 7 (sesquiterpene synthase 7, BAG50439.1) 也具有较高同源性, 序列一致性分别为 68.50%、69.25%、66.19%、66.19%。多序列分析表明 *CwTPS05*、*CwTPS10* 具有萜合成酶亚家族典型的保守序列 DDXXD, 进一步表明 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 是编码植物萜类合成酶的编码基因。

植物 TPS 基因根据其氨基酸序列的相关性以及功能的评价, 可以分为 7 个基因亚家族, 即 *TPS-a*、*TPS-b*、*TPS-c*、*TPS-d*、*TPS-ef*、*TPS-g* 和 *TPS-h*, 而 *TPS-h* 亚家族的萜类合成酶基因仅在江南卷柏中发现^[15-16]。运用 MEGA 7.0 软件, 采用 NJ 建立系统进化树 (图 4)。结果表明, 本实验研究的目的基因 *CwTPS05*、*CwTPS10* 被分到由被子植物倍半萜合成酶基因组成的 *TPSa* 亚家族中, 推断 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 基因编码植物倍半萜合成酶。

3.7 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 基因组织特异性表达分析

利用 qRT-PCR 检测了 *CwTPS05*、*CwTPS10* 在温郁金不同组织的表达情况, 结果显示, *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 基因在温郁金叶片、根茎和块根中均有表达 (图 5)。其中, *CwTPS05* 基因在根茎中表达量最高, 根茎相对表达量是叶片的 228.6 倍, 呈现出明显的组织表达特异性; *CwTPS10* 基因在根茎和块根中具有较高表达, 其相对表达量是叶片的 5.62、6.39 倍。

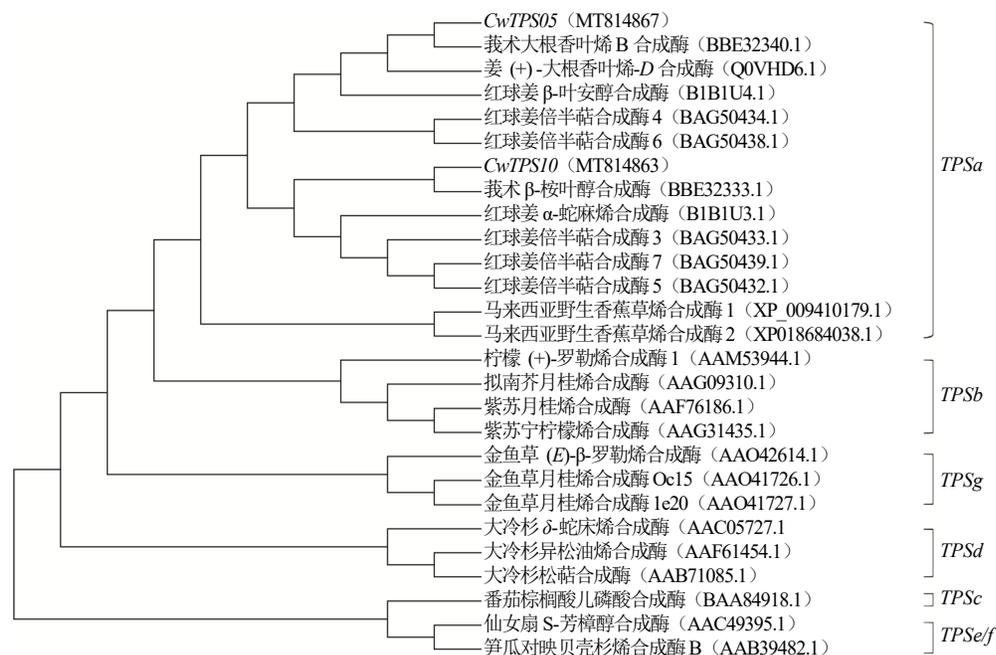


图4 植物萜类合成酶基因家族系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of plant terpene synthase gene family

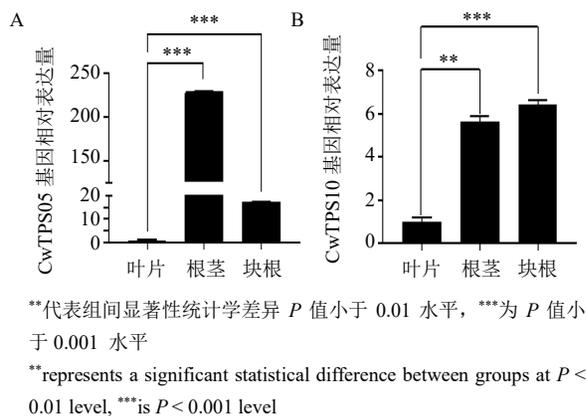


图5 *CwTPS05* (A) 和 *CwTPS10* (B) 基因组织特异性表达
Fig. 5 Expression profile of *CwTPS05* (A) and *CTPS10* (B) in different tissues

4 讨论

本研究基于温郁金转录组测序结果，利用 PCR 技术成功获得温郁金萜类合成酶基因 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 的全长序列。理化性质分析表明，*CwTPS05* 和 *CwTPS10* 蛋白均为酸性、非跨膜、无转运肽的亲水性蛋白，亚细胞均定位于细胞质。二级结构预测结果显示，温郁金 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 蛋白二级结构序列均由 α -螺旋、 β -转角、伸展链和无规卷曲组成， α -螺旋和无规卷曲是其主要组成元件。本研究获得的 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 基因具有倍半萜合成酶的保守结构域 DDXXD，聚类到由被子植物倍半萜合成酶基因组成的 *TPSa* 家族

中，可以推测这 2 个基因编码植物倍半萜合成酶。有研究发现，倍半萜合成酶没有信号肽，定位于细胞质中^[17-18]，对 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 编码的蛋白的生物信息学分析与先前的研究一致，进一步确定 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 是倍半萜合成酶。研究表明莪术萜类合成酶 (BBE32340.1、BBE32333.) 体外分别催化形成根香叶烯、术 β -叶安醇，系统进化树分析表明 *CwTPS05* 和 *CwTPS10* 与上述 2 个基因一致性达到了 95%以上，暗示这个 2 个基因在姜黄属植物中较为保守，在温郁金或具有相似的功能，这有待于下一步实验验证。

TPS 基因家族在高等植物中具有不同功能，可通过多种信号传导途径参与植物的生长代谢过程，在植物不同组织中表达量差异较大，呈现组织特异性表达的特点。研究发现，大豆 *TPS* 家族基因在花、根、根瘤等组织中表达量较高，而在种子中的表达量较低；大白菜 *BrTPS1* 基因在叶中的表达量比根和茎中高 3 倍左右，而 *BrTPS5* 在根和茎中基本不表达；毛竹中 *PeTPS8* 基因只在叶中表达，*PeTPS9* 基因只在早花期花序中表达^[19-21]。qRT-PCR 检测发现，*CwTPS05* 基因在根茎中表达量最高，根茎相对表达量是叶片的 228.6 倍；*CwTPS10* 基因在根茎和块根中也具有较高表达，其相对表达量是叶片的 5.62 和 6.39 倍，这些结果与本课题组先前的转录组测序结果基本一致^[14]。*CwTPS05*、*CwTPS10* 基因组

织特异表达性很可能与温郁金在根茎和块根中积累更多萜类成分有关,暗示两者在根茎和块根中发挥重要的生物学功能。

综合评价,温郁金萜类合成酶基因的克隆和分析对萜类化合物生物合成的分子调控具有重要意义,有利于阐明温郁金萜类合成酶基因之间的共性与特征差异,为进一步探究温郁金萜类化合物生物合成的分子机制及定向优化温郁金药材品质奠定基础。因此,下一步课题组将利用分子生物学和基因编辑手段提高温郁金体内萜类物质含量,从而减少温郁金资源的消耗,为温郁金资源的可持续发展提供保障。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘梅,郭小红,孙全,等. 温郁金的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(1): 204-208.
- [2] 刘睿,高丹丹,崔涛,等. 郁金及其近缘药材的研究进展及质量标志物(Q-marker)的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 273-280.
- [3] Qin N Y, Yang F Q, Wang Y T, *et al.* Quantitative determination of eight components in rhizome (Jianghuang) and tuberous root (Yujin) of *Curcuma longa* using pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(2): 486-492.
- [4] 郑福勃,孙秀芹,金秀媚. 浙南地区温郁金不同产区的物候期与品质比较 [J]. 浙江农业科学, 2019, 60(5): 823-824.
- [5] 曾欣,练美林,毛碧增. 温郁金化学成分、药理作用及病害研究进展 [J]. 药物生物技术, 2017, 24(6): 554-560.
- [6] 曹利娟,刘华钢,刘丽敏,等. 莪术油近五年的研究进展 [J]. 医学综述, 2010, 16(3): 447-450.
- [7] 梁宗锁,方誉民,杨东风. 植物萜类化合物生物合成与调控及其代谢工程研究进展 [J]. 浙江理工大学学报: 自然科学版, 2017, 37(2): 255-264.
- [8] Yang H L, Liu Y J, Wang C L, *et al.* Molecular evolution of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and rice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42438.
- [9] 谢翎,汪章勋,黄勃. 大豆 TPS 基因家族全基因组鉴定、分类与表达分析 [J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(2): 160-167.
- [10] Xu Y C, Wang Y J, Mattson N, *et al.* Genome-wide analysis of the *Solanum tuberosum* (potato) trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family: Evolution and differential expression during development and stress [J]. *BMC Genom*, 2017, 18(1): 926.
- [11] 孙梦利,徐子健,王世豪,等. 西瓜 TPS 家族基因的鉴定、分类与分析 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(9): 2778-2785.
- [12] Falara V, Akhtar T A, Nguyen T T, *et al.* The tomato terpene synthase gene family [J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(2): 770-789.
- [13] 吕婧,陈浣,孙亭亭,等. 普通烟草 TPS 家族全基因组序列鉴定与表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(6): 2518-2530.
- [14] Jiang C, Fei X, Pan X, *et al.* Tissue-specific transcriptome and metabolome analyses reveal a gene module regulating the terpenoid biosynthesis in *Curcuma wenyujin* [J]. *Industrial Crops Prod*. 2021, 170: 113758.
- [15] 朱沛煌,陈好,季孔庶. 松科植物萜类合成酶及其基因家族研究进展 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2021, 45(3): 233-244.
- [16] Xiong W D, Wu P Z, Jia Y X, *et al.* Genome-wide analysis of the terpene synthase gene family in physic nut (*Jatropha curcas* L.) and functional identification of six terpene synthases [J]. *Tree Genet Genomes*, 2016, 12(5): 1-11.
- [17] 沈王琴,陈龙龙,张传明,等. 铁皮石斛倍半萜合成酶基因的克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2017, 48(23): 4963-4969.
- [18] Hattan J, Shindo K, Sasaki T, *et al.* Isolation and functional characterization of new terpene synthase genes from traditional edible plants [J]. *J Oleo Sci*, 2018; 67(10): 1235-1246.
- [19] 谢翎,汪章勋,黄勃. 大豆 TPS 基因家族全基因组鉴定、分类与表达分析 [J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(2): 160-167.
- [20] 庞强强,蔡兴来,孙晓东,等. 大白菜 TPS 基因家族鉴定及其在高温胁迫下的表达分析 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(8): 2452-2459.
- [21] 秦政,郑永杰,张文根,等. 毛竹萜类合成酶基因家族序列鉴定与表达分析 [J]. 植物科学学报, 2018, 36(4): 575-585.

[责任编辑 时圣明]