

# 广藿香香叶醇合酶基因克隆及表达分析

欧阳蒲月<sup>1</sup>, 曾少华<sup>2</sup>, 莫小路<sup>1\*</sup>

(1 广东食品药品职业学院, 广州 510520; 2 中国科学院华南植物园, 广州 510650)

**摘要:** 香叶醇合酶(geraniol synthase, GES)是香叶醇形成过程中非常重要的酶,是萜类代谢途径的限速酶。根据课题组广藿香转录组数据中的 *GES* 转录本序列设计基因全长扩增引物,采用 RT-PCR 方法克隆了广藿香 *GES* 基因的全长 cDNA 序列。对该基因进行了相关的生物信息学分析,并利用荧光实时定量 PCR 法检测了 *PcGES1* 基因在 4 个广藿香栽培种中不同时期茎、叶中的表达情况。结果显示:广藿香 *GES* 基因包含一个完整的 ORF 框,长 1 734 bp,编码 577 个氨基酸,命名为 *PcGES1*, GenBank 登录号为 KF926075; *PcGES1* 基因编码的氨基酸序列与罗勒 *GES* 基因编码的氨基酸序列最为相近。广藿香 *GES* 蛋白定位在叶绿体中,无跨膜区域。*PcGES1* 主要在叶中表达,老叶中表达量最高;从不同栽培种来看, *PcGES1* 在石牌广藿香和高要广藿香中表达模式相似,在海南广藿香与印尼广藿香中表达相似,在海南广藿香老叶中表达最高。该研究结果为进一步阐明广藿香萜类代谢途径奠定了基础。

**关键词:** 广藿香; 香叶醇合酶; 萜类合成

**中图分类号:** Q785; Q786      **文献标志码:** A

## Clone and Expression Analysis of Geraniol Synthase Gene in *Pogostemon cablin*

OUYANG Puyue<sup>1</sup>, ZENG Shaohua<sup>2</sup>, MO Xiaolu<sup>1\*</sup>

(1 Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China; 2 South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** Geraniol synthase (GES), which is very important to the biosynthesis of geraniol, is one of the key enzymes in terpenoids pathways. Based on the transcriptome analysis of *P. cablin*, one unique sequence encoding *GES* was discovered and the primers for PCR were designed from it, the full-length *GES* cDNA was cloned using RT-PCR strategy and its bioinformatics analysis has been done. Gene expression profile of *PcGES1* in leaves and stems of different development stages of four cultivars was evaluated using quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). The results showed that the gene *GES* in *P. cablin*, named as *PcGES1*, accession number KF926075 in GenBank, contains a 1 734bp open reading frame and encodes a predicted protein of 577 amino acids. Phylogenetic analysis indicated that the amino acids encoded by *GES1* of *P. cablin* were closest to that of *Ocimum basilicum*. *PcGES* protein was located in chloroplast, no transmembrane district. qRT-PCR analysis indicated that *PcGES1* mainly expressed in leaves, and the highest expression was in old leaves. The expression pattern analysis of *PcGES1* among four cultivars indicated that the expression pattern of *P. cablin* (Blanco) Benth. cv. *shipaiensis*

收稿日期: 2016-01-24; 修改稿收到日期: 2016-05-06

基金项目: 广东省科技计划项目(2015A040404029); 广东食品药品职业学院自然科学基金项目(2015YZ007)

作者简介: 欧阳蒲月(1978-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 药用植物分子生物学。E-mail: ouyangpy@gdyzy.edu.cn

\* 通信作者: 莫小路, 教授, 研究方向: 药用植物生物技术。E-mail: moxl@gdyzy.edu.cn

was similar to *P. cablin* (Blanco) Benth. cv. *gaoyaoensis*, while that of *P. cablin* (Blanco) Benth. cv. *hainangensis* was similar to *P. cablin* (Blanco) Benth. This study provided a foundation for exploring the mechanism of terpenoid biosynthesis in *P. cablin* plants.

**Key words:** *Pogostemon cablin*; geraniol synthase; terpenoids synthesis

香叶醇合酶(geraniol synthase, GES)是香叶醇形成过程中非常重要的酶,是环烯醚萜类成分合成途径的限速酶。2007年,以色列科学家向西红柿中成功地导入了一种柠檬罗勒基因,该基因能够制造一种香叶醇合酶,从而使西红柿产生类似柠檬的芳香气味,花果香味的新型转基因西红柿诞生了。目前,香叶醇合酶基因的研究已经被越来越多的科学家们所关注<sup>[1]</sup>。香叶醇是大多数药用植物、香料植物产生香味的主要化学成分。前体物质 geranyl diphosphate (GDP)在香叶醇合酶的作用下生成香叶醇的中间体,进而生成了香叶醇<sup>[1-2]</sup>(图1)。目前,在唇形科罗勒属植物<sup>[3-4]</sup>、紫苏属植物<sup>[5]</sup>、樟科细毛樟<sup>[6]</sup>、夹竹桃科长春花<sup>[7]</sup>、败酱科缬草与马鞭草科甜舌草<sup>[8]</sup>中展开了香叶醇合酶的研究。

广藿香[*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.]为唇形科刺蕊草属植物,以全草入药<sup>[9]</sup>,是“藿香正气软胶囊”、“藿香正气丸(水)”、“保济丸”等中成药以及香料/化妆品等商品的主要原料。

广藿香的主要化学成分为挥发油,属萜类化合物<sup>[10-11]</sup>。广藿香作为一个自然分类群属于亚洲热带种,原产东南亚菲律宾、马来西亚等国。然自宋代从南洋传入中国岭南地区(今广东)后,经过长期人工栽培,在中国各地引种的广藿香形态上虽有一些变异,但干燥药材差别不明显,采用传统的形态组织学方法难以区分种内的分化类型,且各地广藿香含油量有所差异。广藿香目前存在4个栽培种:石牌广藿香、高要广藿香、海南广藿香和原产地的印尼广藿香。文献报道广藿香挥发油化学组成与产地分布、种植和采收季节有关;广藿香按其挥发油的成分

可分为两种类型:即酮型广藿香(石牌广藿香与高要广藿香)和醇型广藿香(海南广藿香与原产地的印尼广藿香),并认为广藿香存在产地及挥发油成分不同的分化类型,是适应特定环境的结果,其本质上由遗传变异所决定<sup>[12]</sup>。

为探索广藿香各栽培品种间的遗传差异与其挥发油成分之间的关系,本实验基于广藿香的转录组数据分析,对广藿香萜类代谢途径中的香叶醇合酶进行基因克隆和表达分析研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

4个广藿香栽培种石牌广藿香、高要广藿香、海南广藿香和印尼广藿香种植于广东省中药研究所岭南中药园。选取海南广藿香[*P. cablin* (Blanco) Benth. cv. *hainangensis*]叶,迅速放入装有液氮的保温瓶中,后置于一75℃冰箱保存备用。本材料经广东省中药研究所蔡岳文老师鉴定。DH-5 $\alpha$ 感受态细胞由本实验室保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 RNA提取** 取-75℃保存的叶,在180~200℃烘烤过的研钵中用液氮将其充分研磨,迅速倒入DEPC处理过的离心管中,待液氮挥发后,按100 mg材料1 mL试剂的比例加入适量Trizol,下面的步骤按说明书(Tiangen DP421)进行。1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA质量,并用紫外分光光度计(Nanodrop 2000c)测定总RNA浓度和纯度。

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

**1.2.3 基因克隆** 根据广藿香转录组中长为1 591 bp Unigene10850序列,利用ORF阅读框预

1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸香叶基焦磷酸 番茄红素  
1-Deoxy-D-xylulose-5-P  $\gg$  GDP  $\gg$  Lycopene

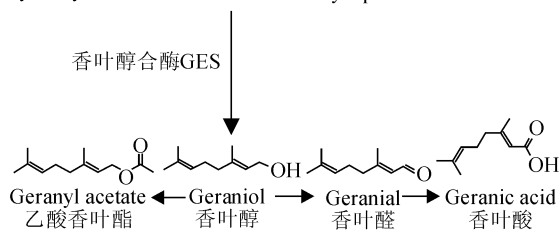


图1 香叶醇的形成过程<sup>[1-2]</sup>

Fig. 1 Synthesis process of geraniol<sup>[1-2]</sup>

测其含有一个完整的开放阅读框,并利用 Primer3 在线设计正向引物 GES1-F (5'-AATTAAAC-TACCAAACAACATTA-3')和反向引物 GES1-R (5'-AGTTTTTATGTACAAATCCACGCAT-3')。PCR 反应体系:3  $\mu$ L 第一链 cDNA(反转录产物稀释 10 倍)为模板;2.5  $\mu$ L LA PCR buffer;2  $\mu$ L 正向及反向特异引物(10 mmol/L,上海生工生物工程技术有限公司合成);0.25  $\mu$ L LA Taq DNA 聚合酶(日本宝生物有限公司);用无菌去离子水将体系补至 25  $\mu$ L。PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,57  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s,30 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。结果检测:取 PCR 产物 5  $\mu$ L,用 1% 琼脂糖电泳检测。将上述 PCR 产物割胶,使用凝胶回收试剂盒(日本宝生物有限公司)过柱回收。回收程序依据试剂盒说明书进行。各取 4.5  $\mu$ L 回收产物,克隆到 pMD19-T 载体(日本宝生物有限公司)过夜连接。将连接产物转入 DH-5 $\alpha$  感受态细胞,经涂布培养,在氯霉素抗性平板上进行阳性克隆筛选,各取 4~8 个进行菌液 PCR 验证,后各取 2 个阳性克隆进行双向测序(广州中美泰和生物技术有限公司)。

**1.2.4 序列的生物信息学分析** 先将所测得的序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 搜索,初步确定这些基因的分类。使用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)进行开放阅读框预测,再进行 *PcGES* 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>);*PcGES* 蛋白质结构搜索分别采用在线工具 ExPASy PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>)和美国国立生物技术信息中心(NCBI)在线工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)。在线 HMMTOP ([http://www.enzim.hu/hmmtop/html/adv\\_submit.html](http://www.enzim.hu/hmmtop/html/adv_submit.html))进行跨膜区预测;在线分析氨基酸序列/疏水性分析(<http://web.expasy.org/protscale>);用 HMMTOP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)检测跨膜结构;使用 SignalP4.0 Server 进行分泌蛋白预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);利用 WOLFP-SORT (<http://wolfsort.org/>)进行蛋白定位信号预测,使用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>)进行蛋白保守结构域搜索。采用 MEGA6.06 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。

**1.2.5 *PcGES1* 基因表达分析** 取广藿香 4 个栽培种的嫩叶、成熟叶、老叶、嫩茎、成熟茎和老茎等组织,同上方法提取各组织总 RNA 1  $\mu$ g,使用 Prime-Script RT reagent Kit With gDNA Eraser (Takara)进行 DNA 消化和反转录得到 cDNA 第一链,并且将 cDNA 原液稀释 10 倍作为 qPCR 的模板。以 actin(ACT)基因作为内参,参考 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (Takara)说明书(日本宝生物有限公司)设计引物:*PcACT* 基因上游引物 5-GCTCCTAG-CAGCATGAAGATCA-3,下游引物 5-AGCAT-CAGCAGACAGCAATCAT-3;*PcGES1* 基因上游引物 5-GGAAGGATTTGAATGGGGAG-3,下游引物 5-TGCTTGTTACACCACTTGGGA-3。qPCR 反应在罗氏 lightcycle480 定量 PCR 仪上完成。反应体系 20  $\mu$ L:SYBR premix Ex Taq II (2x)10  $\mu$ L,正反引物各 0.8  $\mu$ L,cDNA 模板 2  $\mu$ L,H<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L。qPCR 反应程序采用两步法:95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95  $^{\circ}$ C 变性 5 s,60  $^{\circ}$ C 退火延伸 34 s,循环数 40;反应结束后继续运行溶解曲线程序,以确保目的产物的特异扩增。以 Actin 作为内参,使用 2 <sup>$\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法来确定基因相对表达量,其中参照物表达量定为“1”<sup>[13]</sup>,表达数据运用 SigmaPlot10.0 进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 广藿香 *PcGES1* 基因的克隆

以海南广藿香总 RNA 为模板进行逆转录获得 cDNA 序列,利用 RT-PCR 扩增得到 1 条 1 800 bp 左右的条带,对于扩增所得条带进行回收、连接、转化、阳性克隆检测和测序后获得 1 条 1 828 bp 的正确序列,利用 NCBI 的 ORF Finder 预测该序列含有一个完整的开放总计框,长 1 734 bp,编码 577 个氨基酸(图 2)。将该基因命名为 *PcGES1*,GenBank 登录号为 KF926075。

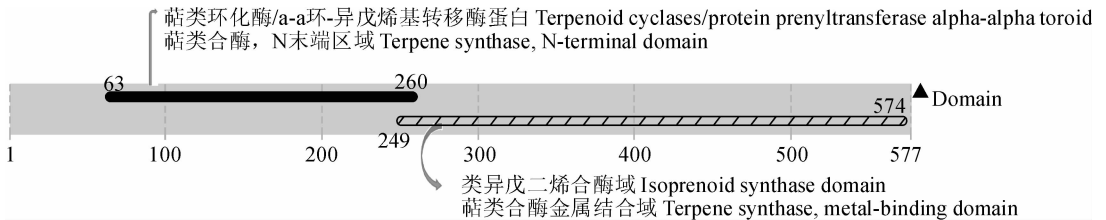
### 2.2 *PcGES1* 基因编码蛋白特性分析

*PcGES1* 基因预测编码 577 个氨基酸,利用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具 ProtParam 对其编码蛋白的理化性质进行预测分析。推测 *PcGES1* 的分子式为 C<sub>3006</sub>H<sub>4727</sub>N<sub>791</sub>O<sub>868</sub>S<sub>24</sub>,分子量为 66.61 kD,等电点为 5.88;带负电残基(Asp+Glu)为 79,正电残基(Arg+Lys)为 73。该蛋白的不稳定系数为 54.35,脂肪系数为 95.01,亲水性系数为-0.257。在线 SignalP4.0 Server 软件分析结果表明 *PcGES1* 为非分泌蛋白。WOLFP-SORT 预

```

49 atgtcttgtgctagaagctaccacctcttcttgccttcccaaaacctctaattcaccattgcaactaaagaatctcctccctttcccc
M S C A R S Y T I P L S F P K T S N S P L Q L K N L L P F P
139 gccgcccggctcgcgtttttccgctgcgcattgtccacctcgtcccttcccggtggcaacgaagcctactaaaatacattcgacaaccggtg
A A R S R F S V R M S T S S L P V G N E A L L K Y I R Q P V
229 gtgttgcctacggaagaagatgagagcatcaagaggagagattatgtctgaaaaaactgcgaggagggttaaggacgagtacgggtagt
V L P T E E D E S I K R R D Y L L E K T A R R L R T S T G S
319 gtggagaagcttaagcttatcgatagatccaacgacttaggaatcgattattatttggaggacgatataaacgtagtacttagaaatgag
V E K L K L I D T I Q R L G I D Y Y L E D D I N V V L R N E
409 tactaatgttagttagtgaagaagaccttctactacagctctaagatttctgttctcgtcacaacggcttccaaattagttctt
Y Y N G R S S E E D L F T T A L R F R L L R H N G F Q I S S
499 gatgtattcatgaaatccaagacaaaaatggaaaatccaanaatggatagctgaggatataatagggttactgagcttatatgaggcg
D V F M K F K D K N G K F K W I A E D T I G L L S L Y E A
589 ctgtatatgggagctcatggtgaaaaaatttggagaagcgtgaaatttctcgaggctcactcctcaagagatcgttctcctcagttcct
S Y M G A H G E K I L E E A M E F S R S L L K R S L P Q L P
679 ccgaagctccacggcagggtggctcaagccttggagcttccgagacacctgaggatggctagatagaagctcgacgggttvtccagcaa
P K L H Q V S T A G A L E L P R H L R M A R L E A R R F V L W T
769 tacgtaaacaaagtgactgcgatcgtgactcttgaacctagcaacattggattataacraaggttcaattgcagcaccatttgaactt
Y A K Q S D C D R D L L N L A T L D Y N K V Q L Q H Q F E L
859 gccgaaattacaaggtgggcaacagcttggcttagtagaaaagttaacatttgcacgagatagaccgttggagtggttttgtggacc
A E I T R W W Q Q L G L V E K L T F A R D R P L E C F L W T
949 gttggattactccagaaccagatattccacgtgtcgaattgagatggccaagaccattgctattttatagtcattgacgatattttc
V G L L P E P R Y S T C R I E M A K T I A I L L V I D D I F
1 039 gacacgtatggcaaaatggatgaactcctcttccaccaagctattagaagatgggatctgaagcaatggatattccttccggaatad
D T Y G K M D E L L L F T Q A I R R W D L E A M D I L P E Y
1 129 atgaaaatattgttacatggcatatacaacacaactaatgaaatattgtacaaaagtgctcaaacctaatggatggagtgctcttcttac
M K I C Y M A L Y N T T N E I C Y K V L K L N G G W S V L S Y
1 219 cttaaatctacgtggatagatgatgaaggttttatgggtggggcaaaatggttgaatgggtgggtggccaccaaaccttggaaagatc
L K S T W I D M I E G F M V E A K W L N G G G A P N L E E Y
1 309 cttgagaatggagtgctacggcgggtgcatacatggctctgggtgcacctcttttctcaatgtgagaagcggttaatgacaaaaatgcc
L E N G V S T A G A Y M A L V H L F F L I G E G V N D Q N A
1 399 ccactcttgacaaaaaaccaaccaccccaagctcttccgcccgtgcccggattcttctcctctgggacgacctcggaactgccaaggag
P L L T K K P Y P K L F S A A G A G R I L R L W D D L G T A K E
1 489 gagcaagagcggagagacgtagcatcgagcatcgagttgtgtagagagagaagaggttggaaagtgaagaagaggggaagaagatacata
E Q E R G D V A S S I E F V M R E K E V E S E E G R R Y I
1 579 ttgggagagatatatgattatggaaggatttgaatggggagttgatgtccaagaatggatgccattagcgattattaaagtcgacctt
L G E I Y E L W K D L N G E L M S K N G M P L A I I K V A L
1 669 aacatggcagcagcttcccaagttggtgtacaagcatgaagaggacattatttctccagcgtggataaattacgtggaagccctcttcttc
N M A R A R A C S Q V V Y K H E E D T Y F S S V D N Y V E A L F F
1 759 actcctcttcttcatccatctaa 1 782
T P L P S S I *

```

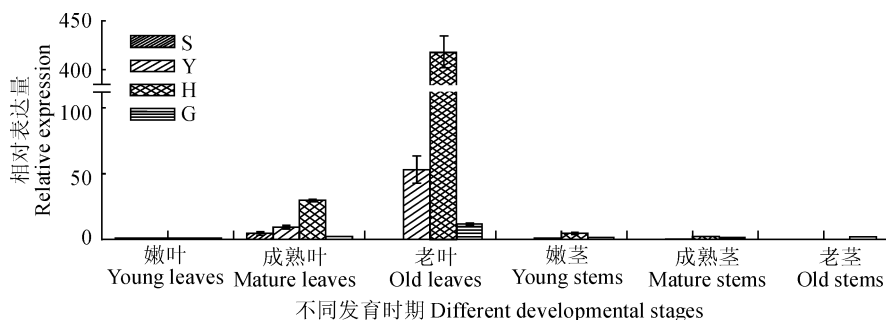
图 2 *PcGES1* 基因的全长 cDNA 及推行的氨基酸序列Fig. 2 The full-length cDNA and deduced amino acid sequence of *PcGES1*图 3 利用 InterProScan 分析 *PcGES1* 蛋白的保守结构域Fig. 3 Analysis of *PcGES1* conserved domains using InterProScan

测表明 *PcGES1* 定位在叶绿体中(chlo: 12.0, cyto: 1.0)。用 HMMTOP 预测 *PcGES1* 无跨膜区域。应用 protscale 对 *PcGES1* 蛋白的氨基酸序列/疏水性预测分析结果表明, *PcGES1* 多肽链第 437 位的亮氨酸具有最高的分值 2.700, 疏水性最强; 第 505 位的谷氨酸具有最低的分值 -2.833, 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。使用 InterProScan 进行蛋白保守结构域搜索, 发现其主要有 2 个保守结构域, 第 63~260 为一个结构域, 这个区域为萜类环化酶/ $\alpha$ - $\alpha$  环-异戊烯基转移酶蛋白域, 也是萜类合酶, N 末端区域; 第 249~574 为另一个结构域, 主要为类异戊二

烯合酶域与萜类合酶金属结合域(图 3)。

### 2.3 *PcGES1* 编码蛋白的系统进化树分析

从 GenBank 蛋白质数据库搜索发现, 目前, 已公布的植物 *GES* 基因并不多。从 NCBI 非冗余蛋白数据库(Nr)中选取与 *PcGES1* 基因编码蛋白相似性较高的 6 条蛋白序列, 采用 MEGA6.06 软件, 用其内置 NJ 法构建进化树。结果(图 4)表明, 广藿香 *PcGES1* 基因编码的氨基酸序列与罗勒(*Ocimum basilicum*, Q6USK1.1) *GES* 编码的氨基酸序列聚在一起, 再与油橄榄(*Olea europaea*, AFS59975.1, AFI47926.1)、长春花(*Catharanthus roseus*, AFD64744.1) *GES* 编码的氨基酸序列聚在一起。



S. 石牌广藿香; G. 高要广藿香; H. 海南广藿香; Y. 印尼广藿香

图 5 *PcGES1* 基因在广藿香 4 个栽培种中的时空表达量

*P. cablin* (Blanco) Benth. cv. *shipaiensis*; G. *P. cablin* (Blanco) Benth. cv. *gaoyaoensis*; H. *P. cablin* (Blanco) Benth. cv. *hainangensis*; Y. *P. cablin* (Blanco) Benth

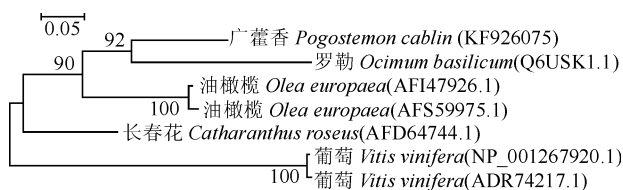
Fig. 5 Spatiotemporal expression profile of *PcGES1* in four *P. cablin*(Blanco) Benth cultivars

## 2.4 *PcGES1* 的表达分析

利用实时定量 PCR 方法对 *PcGES1* 进行基因分析。结果表明:*PcGES1* 在广藿香的不同栽培种、同一栽培种不同部位或不同时期均存在差异表达(图 5)。从不同栽培种来看,*PcGES1* 在海南广藿香中表达量最高,在印尼广藿香中表达较高,在高要广藿香的表达较低,在石牌广藿香中的表达最低;从不同组织来看,*PcGES1* 在叶中的表达量远远高于茎,茎的表达量非常低,基本不表达;从不同发育时期来看,*PcGES1* 在老叶中的表达量最高,比成熟叶与嫩叶高很多。

## 3 讨论

*GES* 基因是萜类代谢中环烯醚萜苷类成分合成途径的限速酶,前体物质 GDP 在香叶醇合酶(*GES* 基因)的作用下形成了香叶醇。香叶醇是大多数香料植物产生香味的主要化学成分。目前,*GES* 基因表达研究涉及的植物很少,仅在细毛樟<sup>[6]</sup>中进行了较详细的研究,其结果表明,细毛樟具有 3 种不同化学型。通过对 3 种不同化学型细毛樟 *GES* 基因表达模式研究发现,不同化学型的基因表达也不同,导致香叶醇主成分 *CtGerS* 在香叶醇化学型叶片中有明显表达,而在其余 2 个化学型只有较低表达量,此结果将化学型主成分的不同与形成主成分的基因直接联系起来。本研究立足于实验室所建立的广藿香高通量转录组测序数据,从中克隆到的 1 条 *GES* 基因,其与罗勒的 *GES* 基因一致性最高。从实时定量 PCR 分析结果来看,*PcGES1* 基因主要在叶中表达,且在高要广藿香、海南广藿香、印尼广藿香老叶中表达量最高,而在茎中的表达较



图中分支上的数字表示 bootstrap 验证中基于 1 000 次重复该节点可信度的百分比;标尺代表遗传距离;括号内编号为氨基酸登录号

图 4 *PcGES1* 与其它植物 *GES* 编码氨基酸序列系统发育树  
The numbers on the branches represent the reliability percent of bootstrap values based on 1 000 replications; The scale bar represents genetic distance; The accession No. is given in bracket  
Fig. 4 Phylogenetic tree of amino acid sequences of *GES1* between *P. cablin*(Blanco) Benth. and other plants

低。对广藿香植株不同部位化学成分含量的分析结果表明,叶的挥发油含量最高<sup>[14-16]</sup>,因此,*PcGES1* 表达可能与挥发油的合成有关。已有研究<sup>[17]</sup>表明,成熟广藿香植株的叶中 *PTS* 基因表达量明显高于茎和根,茎略高于根,但差异不显著,即在成熟广藿香植株中,广藿香醇合成酶在叶中活性最高,叶是萜类成分基因表达的主要部位。本研究中,*PcGES1* 在海南广藿香、印尼广藿香中表达量均比较高,而在高要广藿香、石牌广藿香中的表达量均较低,显示了 *PcGES1* 的表达与广藿香的物种属性有关<sup>[18-19]</sup>。*PcGES1* 在高要广藿香、石牌广藿香中表达量都不高,但有意思的是,*PcGES1* 在石牌广藿香中表达量最高的部位是较成熟的叶片,与其它 3 个栽培种存在明显差异,*PcGES1* 的这种表达差异可能是导致石牌广藿香与其它 3 个栽培种挥发油成分差异的原因之一。本研究结果为萜类化合物生物合成的分子机制探究提供了新思路。

## 参考文献:

- [1] RACHEL D R, YARON S, YAAKOV T, *et al.* Enrichment of tomato flavor by diversion of the early plastidial terpenoid pathway[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, **25**(8):899-901.
- [2] YOKO I, DAVID R G, EYAL F, *et al.* Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of *Sweet basil* [J]. *Plant Physiology*, 2004, **134**(1):370-379.
- [3] MARC J C F, SOPHIE M. Specificity of *Ocimum basilicum* geraniol synthase modified by its expression in different heterologous systems[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, **163**(1):24-29.
- [4] MARC J C F, SOPHIE M, PATRICIA C, *et al.* Determination of amino-acidic positions important for *Ocimum basilicum* geraniol synthase activity[J]. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2013, **4**(2):242-249.
- [5] MICHIHO I, GISHO H. Geraniol synthases from *Perilla* and their taxonomical significance [J]. *Phytochemistry*, 2007, **68**(4):446-453.
- [6] YANG T, LI J, WANG H X, *et al.* A geraniol-synthase gene from *Cinnamomum tenuipilum* [J]. *Phytochemistry*, 2005, **66**(3):285-293.
- [7] ANDREW J S, KAREL M, PATRICIA C, *et al.* Characterization of the plastidial geraniol synthase from Madagascar periwinkle which initiates the monoterpenoid branch of the alkaloid pathway in internal phloem associated parenchyma [J]. *Phytochemistry*, 2013, **85**(1):36-43.
- [8] LEMENG D, KAREL M, MIRIAM G, *et al.* Characterization of two geraniol synthases from *Valeriana officinalis* and *Lippia dulcis*; similar activity but difference in subcellular localization [J]. *Metabolic Engineering*, 2013, **20**(10):198-201.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M](一部). 北京:中国医药科技出版社, 2015:45.
- [10] HU L F, LI S P, CAO H, *et al.* GC-MS fingerprint of *Pogostemon cablin* in China [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, **42**(2):200-206.
- [11] DING W B, LIN L D, LIU M F, *et al.* Two new sesquiterpene glycosides from *Pogostemon cablin* [J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2011, **13**(7):599-603.
- [12] 罗集鹏, 刘玉萍, 冯毅凡, 等. 广藿香的 2 个化学型及产地与采收期对其挥发油成分的影响 [J]. *药学学报*, 2003, **38**(4):307-310.
- LUO J P, LIU Y P, FENG Y F *et al.* Two chemotypes of *Pogostemon cablin* and influence of region of cultivation and harvesting time on volatile oil composition [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2003, **38**(4):307-310.
- [13] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta CT]$  method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4):402-408.
- [14] 陈秀华, 刘 强, 陈兴兴, 等. 广藿香不同部位挥发油成分的比较研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, **10**(4):127-128.
- CHEN X H, LIU Q, CHEN X X, *et al.* Analysis and comparison of the volatile oil from different parts of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. by GC-MS [J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2008, **10**(4):127-128.
- [15] 黄月纯, 魏 刚, 尹 雪. 广藿香不同部位 HPLC 指纹图谱的比较研究 [J]. *中成药*, 2008, **30**(8):1 096-1 099.
- HUANG Y C, WEI G, YIN X. HPLC finger print analysis of the different parts of *Herba pogostemonis* [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2008, **30**(8):1 096-1 099.
- [16] 冯承浩, 姚 辉, 吴 鸿, 等. 广藿香药用部位成熟结构及有效成分分布研究 [J]. *中草药*, 2003, **34**(2):174-176.
- FENG C H, YAO H, WU H, *et al.* Studies on mature structures and distribution of active constituent of *Pogostemon cablin* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2003, **34**(2):174-176.
- [17] 陈 英. 广藿香中百秋李醇的动态积累及 PTS 基因的克隆与表达研究 [D]. 海口:海南大学, 2015.
- [18] 徐颂军, 王晓峰, 徐祥浩, 等. 药用植物广藿香的品种分类探讨 [J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2003, (1):82-86.
- XU S J, WANG X F, XU X H, *et al.* The classification of cultivars of *Pogostemon cablin* cultivated in Guangdong Province of China [J]. *Journal of South China Normal University (Natural Science Edition)*, 2003, (1):82-86.
- [19] 刘玉萍, 罗集鹏, 冯毅凡, 等. 藿香的基因序列与挥发油化学型的相关性分析 [J]. *药学学报*, 2002, **37**(4):304-308.
- LIU Y P, LUO J P, FENG Y F, *et al.* DNA profiling of *Pogostemon cablin* chemotypes differing in essential oil composition [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2002, **37**(4):304-308.

(编辑:宋亚珍)