

病毒诱导基因沉默鉴定穿心莲内酯生物合成关键酶 ApCPS 功能

谌琴琴¹,刘 琴¹,李聪聪¹,付羽萍²,王 强^{1*}

(1 四川农业大学 生态农业研究所,成都 611130;2 四川农业大学 动物医学院,成都 611130)

摘要:该研究采用病毒诱导基因沉默技术(VIGS),以生长到第8片真叶期的穿心莲植株为实验材料,沉默参与穿心莲内酯生物合成的 *ent*-柯巴基焦磷酸合酶基因(*ApCPS*),用半定量和荧光定量 PCR 检测病毒诱导沉默后 *ApCPS* 及其上游基因的表达,用 HPLC 法检测 *ApCPS* 沉默后穿心莲内酯的积累变化,同时检测茉莉酸甲酯(MeJA)处理后 *ApCPS* 及上游基因的表达,以全面分析穿心莲内酯代谢以及 *ApCPS* 在穿心莲内酯生物合成中的作用机制,验证其在植物体内的功能。结果显示:(1) *ApCPS* 基因被成功沉默,基因表达显著下调,进而引起上游牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶基因(GGPS)的表达下调,而 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因(HMGR)和 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶基因(DXS)的表达未受影响。(2) *ApCPS* 基因沉默 15 d 后穿心莲内酯积累量显著下降,表明 *ApCPS* 是穿心莲内酯生物合成关键酶基因,且能够负反馈影响上游基因表达。(3) 茉莉酸甲酯(MeJA)显著诱导 *ApCPS* 及上游基因 HMGR、DXS 和 GGPS 的表达,表明穿心莲内酯生物合成基因受到 MeJA 的广泛调控。该研究首次使用 VIGS 证明 *ApCPS* 参与到穿心莲内酯生物合成,为利用该技术鉴定穿心莲内酯生物合成途径中其他基因功能奠定了基础。

关键词:VIGS; *ent*-柯巴基焦磷酸合酶;穿心莲内酯;生物合成;基因表达

中图分类号:Q786;Q789 文献标志码:A

Functional Characterization of ApCPS Involved in Andrographolides Biosynthesis by Virus-induced Gene Silencing

SHEN Qinjin¹, LIU Qin¹, LI Congcong¹, FU Yuping², WANG Qiang^{1*}

(1 Institute of Ecological Agriculture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: The *ent*-copalyl diphosphate synthase gene (*ApCPS*) with putative involvement in andrographolides biosynthesis was silenced successfully in the 8-leaf stage of *Andrographis paniculata* through TRV virus-induced gene silencing (VIGS), which was verified by semiquantitative RT-PCR and quantitative RT-PCR. (1) Gene silencing of *ApCPS* resulted in decreased accumulation of andrographolides significantly with HPLC analysis. (2) In order to comprehensively investigate gene expression of andrographolides biosynthesis, the upstream genes, HMGR, DXS and GGPP were chosen to be analyzed by qRT-PCR. In VIGS plants, GGPP showed decreased transcript accumulation, which might be resulted from negative feedback of GGPP accumulated after *ApCPS* gene silencing. No significant change was observed for HMGR and DXS upon *ApCPS* gene silencing. (3) HMGR, DXS and GGPP exhibited inducible gene expression with MeJA

收稿日期:2015-09-19;修改稿收到日期:2015-11-11

基金项目:四川省杰出青年基金(2014JQ0038)

作者简介:谌琴琴(1990—),女,在读硕士研究生,主要从事穿心莲内酯生物代谢调控研究。E-mail:shenqin2000@sina.cn

* 通信作者:王 强,博士,教授,博士生导师,主要从事作物次生代谢调控与分子育种研究。E-mail:qwang@sicau.edu.cn

treatment, as well as *ApCPS*, indicating pleiotropic regulation of MeJA on andrographolides biosynthesis. It is the first report to characterize *ApCPS* involved in andrographolides biosynthesis *in vivo* through VIGS, which lays the foundation for further investigation of other andrographolides biosynthetic genes.

Key words: VIGS; *ent*-copalyl diphosphate synthase; andrographolides; biosynthesis pathway; gene expression

中药穿心莲是爵床科穿心莲属植物穿心莲 [*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees]的干燥地上部分,又名一见喜、印度草、榄核莲,味苦,是清热解毒、抗菌消炎之要药^[1]。现代药理研究表明穿心莲具有抗肿瘤^[2-3]、抗病毒^[4]、免疫调节及肝保护作用^[5]等,主要药效成分是穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯。但穿心莲内酯类化合物的生物合成途径还未被解析,限制了其在合成生物学领域的研究。

穿心莲内酯是由1个五元内酯环和1个半日花烷型双环骨架组成的二萜内酯^[6],具有萜类化合物共同前体焦磷酸异戊烯酯(IPP)和焦磷酸γ,γ-二甲基烯丙酯(DMAPP)。IPP和DMAPP是由细胞质中的甲羟戊酸途径(MVA)或质体中的2C-甲基-4-磷酸-4D-赤藓糖醇途径(MEP)生成的^[7]。MVA途径主要为生成倍半萜、三萜等提供前体,MEP途径为单萜、二萜和四萜等提供前体。二萜是以3个IPP和1个DMAPP头尾相连形成的牻牛儿基牻牛儿醇焦磷酸酯(geranylgeranyl pyrophosphate, GG-PP)为直接前体^[8],由二萜合酶催化成环,并经后续的氧化修饰形成^[9]。穿心莲中的一个二萜合酶-*ent*-柯巴基焦磷酸合酶(*ent*-copalyl diphosphate synthase, 简称 *ApCPS*)的基因序列已被报道^[10]。本实验室用原核表达和微生物代谢工程技术鉴定了 *ApCPS* 的生化功能,即催化GGPP生成 *ent*-焦磷酸古巴酯(*ent*-CPP),该反应为穿心莲内酯生物合成重要步骤,可能是穿心莲内酯生物合成的一个关键酶^[11],但该途径在赤霉素生物合成中也存在,因此 *ApCPS* 的体内功能仍需进一步验证。

病毒诱导基因沉默技术(virus-induced gene silencing, VIGS)是一个有效的反向遗传学工具,被广泛应用于植物基因体内功能鉴定,如番茄^[12]、烟草^[13]等植物。在中草药中, Singh^[14]利用 VIGS 成功沉默了南非醉茄中的 SQS 基因,减少了植物体内醉茄内酯的积累; Li^[15]利用 VIGS 在天仙子中鉴定了一个参与莨菪烷生物合成的细胞色素 P450 的功能。作者前期以穿心莲中的八氢番茄红素脱氢酶基因(*ApPDS*)为报告基因,用烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)为载体在穿心莲体内建立了病毒

诱导基因沉默体系^[16]。本研究利用 TRV-VIGS 在穿心莲叶片中沉默 *ApCPS*,并使用 HPLC 法测定沉默后叶片中穿心莲内酯的含量,同时通过 qRT-PCR 技术检测穿心莲内酯生物合成上游基因和 *ApCPS* 的表达水平,研究了 *ApCPS* 在穿心莲内酯生物合成中的作用机制,并验证了其在植物体内的功能。

1 材料和方法

1.1 材料

穿心莲种子收集于广西贵港,种植在人工气候室,生长条件为14 h 光照(28 °C)和10 h 黑暗(25 °C)。经四川农业大学王强教授完成鉴定。

1.2 方法

1.2.1 VIGS 载体构建 根据 NCBI 上已报道 *ApCPS* 基因序列(GenBank 登录号 KP982892)及 pTRV2(ABRC)的多克隆位点,使用软件 Oligo 7 和 Primer 3 设计 1 对克隆引物 *ApCPS*-TRV-F (*Bam*H I) 和 pCPS-TRV-R(*Xho* I)(表 1),以含有全长 *ApCPS* 的 pGEM-T 载体为模板,进行 PCR 扩增,胶回收纯化得到一段 473 bp 的核心保守片段 rCPS。使用 *Bam*H I 和 *Xho* I 对回收产物及 pTRV2 进行双酶切,回收的酶切产物用 T₄-DNA (TaKaRa)连接酶连接,连接产物转化 TOP₁₀ 感受态细胞(TIANGEN),通过菌落 PCR 及质粒酶切鉴定获得重组表达载体 pTRV2-rCPS。

1.2.2 农杆菌浸染 分别将 pTRV1(ABRC) 和 pTRV2-rCPS 用冻融法转化农杆菌菌株 GV3101 (本实验室保存),48 h 后挑取单菌落接入 5 mL LB 培养基(含 50 mg/L 卡那霉素, 50 mg/L 利福平, 50 mg/L 庆大霉素)28 °C 过夜培养活化,次日将活化过的菌液加入到 50 mL 含有 10 mmol/L 2-吗啉乙磺酸(MES)和 20 μmol/L 乙酰丁香酮(AS)的带抗生素的 LB 液体培养基中,28 °C 过夜培养,离心收集农杆菌菌体。用侵染缓冲液(10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L MES, 200 μmol/L AS)悬浮菌体,调整 OD₆₀₀ 为 1.0,室温下放置 3 h 后侵染。穿心莲内酯在生长阶段的叶片中积累最快^[17],所以选择 8 叶期

植株进行侵染。侵染时将含有 pTRV1 和 pTRV2-rCPS 的农杆菌 1:1 混合,用无针头的注射器在叶片背面注射,使菌液充满整个叶片,每颗苗注射 2~4 片叶子。将注射后的植株放在 22 °C 的恒温培养箱中连续光照 12 h,后正常培养。

1.2.3 基因表达检测 取浸染农杆菌 15 d 后的叶片提取总 RNA,以 Oligo(dT)为引物,用 M-MLV 反转录酶(TaKaRa)合成 cDNA。使用半定量和荧光定量 PCR 检测 *ApCPS* 基因沉默效果。*ApCPS* 基因及内参 *Actin* 基因(GenBank 登录号 JX444056)的半定量及荧光定量检测引物见表 1。半定量 PCR 反应条件为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s;55 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 1 min;30 个循环;72 °C 延伸 7 min;4 °C 保存。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。荧光定量 PCR 使用 SsoFast Eva Green Supermix 试剂在 CFX96 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad)上进行检测。反应条件为:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 15 s;55 °C 退火 15 s;72 °C 延伸 20 s;40 个循环。每个样品均设 3 个重复,采用仪器自带软件 Bio-Rad CFX manager 按 $2^{-\Delta C_t}$ 法处理数据,使用 Excel 2010 作图。

用 100 μ mol/L MeJA 处理 8 叶期穿心莲植株,在 0、6、12、24 和 48 h 取样,提取 RNA 并合成 cDNA 用于检测穿心莲内酯生物合成上游基因 *GGPS* (GenBank 登录号 AJ973133)、*HMGR*(GenBank 登

录号 AY254389) 和 *DXS* (GenBank 登录号 AY254390) 的表达,引物见表 1。

1.2.4 HPLC 法测定含量 (1)对照品 穿心莲内酯,脱水穿心莲内酯(批号分别为 110797-200307 和 110854-201007),购自中国食品药品检定研究院。精密称取穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯对照品,加甲醇制成 5 g/L 贮备液。

(2)色谱条件 高效液相色谱仪(Agilent-1100),色谱柱 Agilent C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m);流动相甲醇(A)-水(B),梯度洗脱(0~12 min, 30~60% A; 12~20 min, 60% A; 20~23 min, 60%~30% A; 23~25 min, 30% A);柱温 25 °C;穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯检测波长分别为 225 和 254 nm;流速 0.8 mL/min^[18];进样量 10 μ L。穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的保留时间分别是 9.4 和 16.5 min,与其他组分分离良好。

(3)标准曲线的制作 取对照品贮备液稀释成 5 个不同浓度的对照品溶液,分别进样 10 μ L,记录峰面积,以峰面积对标品含量进行回归分析,即得对照品的标准曲线。回归方程为:穿心莲内酯, $Y = 1983X + 1500.1 (R^2 = 0.9991)$;脱水穿心莲内酯, $Y = 1623.4X + 68.967 (R^2 = 0.9997)$ 。

(4)供试品溶液的制备 称取穿心莲叶片鲜重 0.5 g,研匀,加入 10 mL 甲醇,浸渍 1 h,超声处理(功率 220 W,频率 33 kHz)30 min,4 000 r/min 离

表 1 片段扩增及检测引物

Table 1 The primers for PCR amplification and analysis

用途 Usage	名称 Name	序列 Sequence	长度 Length/bp	登录号 GenBank	代谢途径 Metabolic pathway
载体构建 Vector construction	ApCPS-TRV-F(BamH I) ApCPS-TRV-R(Xho I)	GCGGATCCAGTGTCCCTGACGGCTCATTT G <u>CTCGAG</u> TCCCCCTGGAAACATCACCTG	473	KP982892	穿心莲内酯生物合成 Andrographolide biosynthesis
RT-PCR	bdlCPS-F bdlCPS-R bdlActin-F bdlActin-R	CTCCGTATCAGCCCCCTTGT TCAGAAGTAACGGCGGGTAT ACATGCGATCCTCCGTCTG GCAGCTTCCATCCCGATCAT	340	KP982892	穿心莲内酯生物合成 Andrographolide biosynthesis
	qCPS-F qCPS-R qActin-F qActin-R	CACCATCTCCGCCTGTCT ACCACCACTCACGCCACT TTCACCACTACAGCAGAGCG AAGGACCTCAGGGCATCG	81	KP982892	穿心莲内酯生物合成 Andrographolide biosynthesis
qRT-PCR	qGGPPS-F qGGPPS-R qHMGR-F qHMGR-R qDXS-F qDXS-R	GTTGTCAAGGTGCATTGGTG GCTCCACTTCCGACTCTGTC TTCGTGTGATGGAATGACCAAGA TTGCAAATCTGCTTGACCTG GGCAGACGGACCTACACATT GTGGCAACCATGTGAAACAG	186 188 138 114	JX444056 AJ973133 AY254389 AY254390	肌动蛋白 Actin 异戊二烯 Isoprenoids 甲羟戊酸途径 MVA 2C-甲基-4-磷酸-4D-赤藓糖醇 MEP

注:下划线为酶切位点序列。

Note: The underline for enzyme locus sequence.

心 10 min, 取上清; 沉淀用 10 mL 甲醇再提取 1 次, 合并后用旋转蒸发仪浓缩后用甲醇溶解定容至 1 mL, HPLC 测定含量前用 0.45 μm 的滤膜过滤, 各处理 4 个生物学重复, 每个样品取自 4 棵植株, 3 个重复。相对积累量的计算方法:

穿心莲内酯相对积累量 = (浸染 15 d 后内酯含量 - 8 叶期内酯含量) / 8 叶期内酯含量 $\times 100\%$

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 及 qRT-PCR 检测 *ApCPS* 基因表达

采用叶片注射法浸染穿心莲 8 叶期植株(图 1, A)。15 d 后观察, 侵染 pTRV2-*rCPS* 与空载体 pTRV2 的植株没有明显的表型差异(图 1, B)。取浸染后生长 15 d 的叶片进行基因表达的检测, RT-PCR 检测发现 *ApCPS* 基因表达有明显的下调(图 1, C)。进一步使用 qRT-PCR 定量检测发现 *ApCPS* 基因表达下调了 49.8% (图 1, D), 证明 *ApCPS* 基因被 pTRV2-*rCPS* 病毒载体成功沉默, 效果明显。

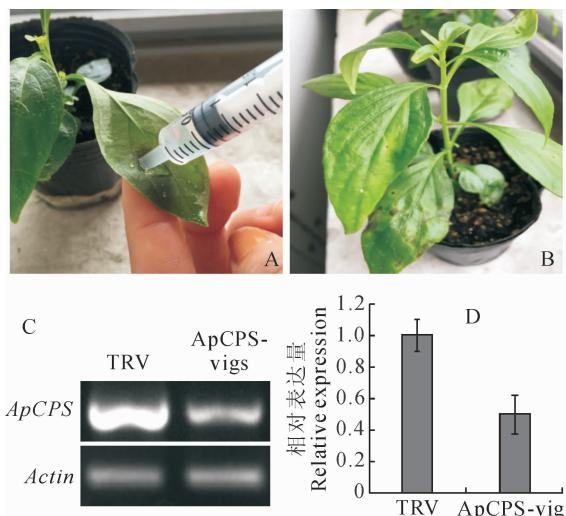
2.2 沉默 *ApCPS* 后穿心莲内酯的积累变化

收集穿心莲 8 叶期及农杆菌浸染 15 d 后的叶片, HPLC 法测定体内穿心莲内酯及脱水穿心莲内酯含量。结果显示相对于 8 叶期, 生长 15 d 后的 TRV 空白对照和 *ApCPS* 沉默植株中穿心莲内酯含量均显著增加(图 2, A), 相对于 8 叶期的积累量分别增加了 106.43% 和 52.91%, 但 *ApCPS* 沉默植株中穿心莲内酯积累量显著低于空白对照(图 2, B)。沉默 *ApCPS* 基因导致穿心莲内酯的积累量显著下降, 符合其生化功能分析^[11], 证明 *ApCPS* 催化

穿心莲内酯生物合成关键步骤。脱水穿心莲内酯在整个生长期含量较低, 差异变化不明显。

2.3 穿心莲内酯生物合成上游基因的表达检测

穿心莲内酯含量可以被茉莉酸甲酯(MeJA)诱

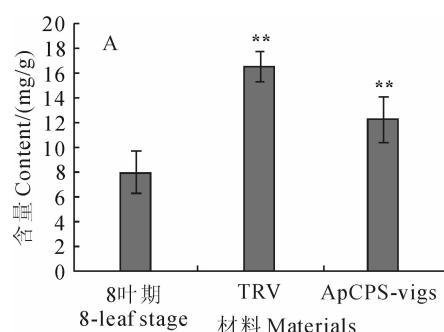


A. 叶片注射法浸染 8 叶期的穿心莲; B. 沉默 *ApCPS* 基因 15 d 后的植株; C. 叶片中 *ApCPS* 基因表达的 RT-PCR 分析; D. 叶片中 *ApCPS* 基因表达的 qRT-PCR 分析。图中的 TRV 表示浸染 pTRV2 的空白对照植株, ApCPS-vigs 表示浸染 pTRV2-*rCPS* 的植株

图 1 VIGS 法沉默穿心莲 *ApCPS* 基因

A. Agroinfiltration of *A. paniculata* at 8-leaf stage with leaf injection; B. Plant with *ApCPS* gene silencing for 15 days; C. RT-PCR analysis of *ApCPS* expression in the leaves infiltrated; D. qRT-PCR analysis of *ApCPS* expression in the leaves infiltrated. The labels are designated: TRV, plants infiltrated with pTRV2 as a control; ApCPS-vigs, plants infiltrated with pTRV2-*rCPS*

Fig. 1 *ApCPS* gene silencing in *A. paniculata* with VIGS



A. 8 叶期及浸染生长 15 d 后穿心莲内酯含量; B. 穿心莲内酯的相对积累量。图中的 TRV 表示浸染 pTRV2 的空白对照植株, ApCPS-vigs 表示浸染 pTRV2-*rCPS*。** 表示和对照有显著性差异($P < 0.01$)的植株

图 2 VIGS 处理穿心莲后穿心莲内酯的积累

A. *Andrographolides* content in 8-leaf stage, TRV and *ApCPS*-vigs leaves; B. Relative accumulation of *andrographolides* in TRV and *ApCPS*-vigs leaves. The labels are designated: TRV, plants infiltrated with pTRV2 as a control; *ApCPS*-vigs, plants infiltrated with pTRV2-*rCPS*. ** indicates the significant difference from the control ($P < 0.01$)

Fig. 2 Andrographolides accumulation in *A. paniculata* with VIGS treatment

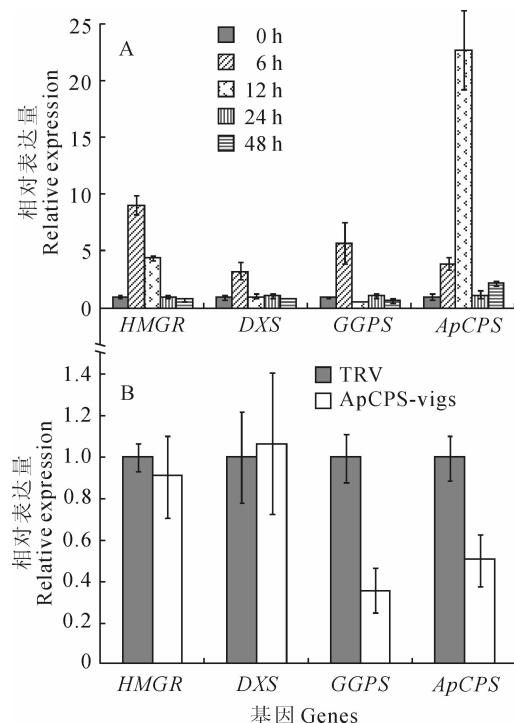


图 3 *ApCPS* 上游基因在 MeJA 诱导(A)和 VIGS 处理后(B)的定量 PCR 分析

Fig. 3 qRT-PCR analysis of upstream genes of *ApCPS* in the leaves induced by MeJA (A) and treated through VIGS (B)

导增加^[19], *ApCPS* 基因表达也能够被 MeJA 诱导^[11]。为了分析穿心莲内酯生物合成上游基因是否与 *ApCPS* 具有相同表达模式, 对穿心莲 MVA 途径中的 *HMGR*、MEP 途径中的 *DXS* 以及生成 *ApCPS* 催化底物 *GGPP* 的 *GGPS* 基因进行了 qRT-PCR 分析。结果(图 3, A)显示, MeJA 处理穿心莲后, *ApCPS* 在 12 h 被诱导表达量达到最大, *HMGR*、*DXS*、*GGPS* 在 6 h 分别被诱导上调了 9.08、3.31 和 5.80 倍, 除了 *HMGR* 在 12 h 持续被诱导表达外, *DXS* 和 *GGPS* 在 12 h 已恢复到正常表达水平。病毒诱导 *ApCPS* 基因沉默后, *HMGR* 和 *DXS* 的表达没有受到影响, 但 *GGPS* 的表达下调了 64.36 % (图 3, B), 暗示穿心莲内酯生物合成中有负反馈调节机制的存在。

3 讨 论

本研究使用 VIGS 法成功沉默了穿心莲叶片中 *ApCPS* 的基因表达, 通过 HPLC 法检测到穿心莲内酯积累量明显下降, 证明 *ApCPS* 在植物体内参与穿心莲内酯生物合成, 符合以往的生化研究^[11]。同时 *ApCPS* 基因沉默后, 穿心莲植株并未有表型变化, 显示赤霉素代谢未受到影响。

在 *ApCPS* 被 MeJA 诱导上调后, 上游的 *HMGR*、*DXS* 和 *GGPS* 也被诱导上调, 并且诱导时间早于 *ApCPS*, 表明 MeJA 能够广泛调控穿心莲内酯类代谢相关基因表达, 和以往研究中 MeJA 诱导穿心莲悬浮细胞穿心莲内酯积累的结果一致^[19]。MeJA 处理能引起植物的抗病反应^[20], 本研究中 MeJA 诱导穿心莲 MVA 途径的 *HMGR* 上调水平明显大于 MEP 途径的 *DXS*, 推测 MVA 途径增加的法尼基焦磷酸用来参与甾醇生物合成, 改变细胞膜结构去抵抗 MeJA 模拟的病原菌浸染。*ApCPS* 被沉默后, *GGPS* 的基因表达显著降低, 可能是 *ApCPS* 催化底物 *GGPP* 的积累负反馈调节上游基因 *GGPS* 的表达, 但早期的 *HMGR*、*DXS* 并没有受到影响, 暗示穿心莲内酯生物合成调控主要集中在 *GGPS* 和 *ApCPS* 这两个基因。然而 *ApCPS* 沉默后其下游基因的表达情况, 以及与其它内酯类代谢流之间的相互作用仍不清楚, 需要进一步的研究。

大多数的药用植物的遗传转化技术发展都比较滞后, 使用 VIGS 技术鉴定重要药用成分的生物合成基因功能是一个可靠便捷的方法。然而 VIGS 技术由于病毒载体的局限性, 能用于此方法的植物仍有限, 即使对于现在常用的表达稳定、沉默效果好、对植物毒副作用小的 TRV 病毒载体适用范围也是较低的, 所以获得适用范围广的病毒载体是急需解决的问题^[21]。另外作者在实验中尝试过不同的农杆菌侵染方法, 最后用针尖刺伤叶片后再用无针头注射器注射农杆菌的沉默效果最好, 并且注射 8 叶期之前的幼苗存活率较低, 表明针对不同植物应当筛选最佳的侵染时期和方法。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 268.
- [2] 韩光, 杜钢军, 许启泰. 穿心莲二萜内酯类化合物的合成及抗肿瘤构效关系研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(10): 790-794.
- HAN G, DU G J, XU Q T. Studies on synthesis and antitumor structure-activity relationship of diterpene lactones of *Andrographis panniculata* Nees[J]. Chinese Pharmaceuticals Journal, 2008, 43(10): 790-794.
- 张丹丹, 陈娟娟, 方建国, 等. 穿心莲抗人巨细胞病毒的体外实

验研究[J].医药导报,2010,29(6):703-707.

ZHANG D D, CHEN J J, FANG J G, et al. Anti-cytomegalovirus effect of andrographis paniculata *in vitro* [J]. *Herald of Medicine*, 2010, 29(6): 703-707.

[4] 平 静,王思源,谢 宁,等.穿心莲内酯磺化物体外抗腺病毒药效学研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(21):175-178.

PING J, WANG S Y, XIE N, et al. A study of antiadenovirus effect of andrographolide sulfonated *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Fomulae*, 2012, 18(21): 175-178.

[5] 江冬青,罗晓红,谢智颖,等.穿心莲临床药理研究概况[J].国际中医中药杂志,2013,35(11):1 030-1 032.

JIANG D Q, LUO X H, XIE ZH Y, et al. Overview of clinical pharmacology of *Andrographis paniculata* [J]. *International Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2013, 35(11): 1 030-1 032.

[6] 郁彬,巢志茂,魏少荫,等.穿心莲中半日花烷型二萜内酯化学成分和药理活性研究进展[J].国际中医中药杂志,2007,29(2):100-103.

XI Y B, CHAO Z M, WEI S Y, et al. Research progress labdane diterpene lactone and pharmacological activity in *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees[J]. *International Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2007, 29(2): 100-103.

[7] VRANOVA E, COMAN D, GRUISEM W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for iso-prenoid synthesis[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64: 665-700.

[8] CHEN F, THOLL D, BOHLMANN J, et al. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom[J]. *The Plant Journal*, 2011, 66(1): 212-229.

[9] THOLL D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(3): 297-304.

[10] 姚 攀,陈慧芝,李竹君,等.穿心莲ent-柯巴基焦磷酸合酶基因的克隆与生物信息学分析[J].生物技术通报,2012,10:156-162.

YAO P, CHEN H Z, LI Z J, et al. Cloning and bioinformatic analysis of a cDNA encoding a putative ent-copalyl diphosphate synthase from *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012, 10: 156-162.

[11] SHEN Q Q, LI L X, JIANG Y, et al. Functional characterization of ent-copalyl diphosphate synthase from *Andrographis paniculata* with putative involvement in andrographolides biosynthesis[J]. *Biotechnology Letters*, 2015, DOI: 10.1007/s10529-015-1961-7 (online).

[12] FANTINI E, FALCONE G, FRUSCIANTE S, et al. Dissection of tomato lycopene biosynthesis through virus-induced gene silencing [J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 986-998.

[13] 朱 峰,张 萍,林宏辉,等.本生烟 NbsSABP2 和 NbsSAMT 基因的克隆及 VIGS 表达载体构建[J].四川大学学报,2012,49(2):453-458.

ZHU F, ZHANG P, LIN H H, et al. Construction of VIGS expression vector carrying NbsSABP2 and NbsSAMT genes cloned from *Nicotiana benthamiana* [J]. *Journal of Sichuan University*, 2012, 49(2): 453-458.

[14] SINGH A K, DWIVEDI V, RAI A, et al. Virus-induced gene silencing of *Withania somnifera* squalene synthase negatively regulates sterol and defence-related genes resulting in reduced withanolides and biotic stress tolerance[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(3): 1-13.

[15] LI R, REED D W, LIU E, et al. Functional genomic analysis of alkaloid biosynthesis in *Hyoscyamus niger* reveals a cytochrome P₄₅₀ involved in litorine rearrangement[J]. *Chemistry Biology*, 2006, 13(5): 513-520.

[16] 谌琴琴,李丽霞,战鹏林,等.穿心莲八氢番茄红素脱氢酶AP-PDS的基因克隆及功能鉴定[J].中国中药杂志,2015,40(19):3 760-3 765.

SHEN Q Q, LI L X, ZHAN P L, et al. Cloning and functional characterization of phytoene desaturase in *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015, 40(19): 3 760-3 765.

[17] PHOLPHANA N, RANGKADILOK N, SAEHUN J, et al. Changes in the contents of four active diterpenoids at different growth stages in *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees (Chuanxinlian) [J]. *Chinese Medicine*, 2013, 8(1): 2-12.

[18] 郭山山,卫莹芳,闫 婕,等.全国不同产地及不同部位穿心莲中总内酯的含量测定[J].时珍国医国药,2010,21(11): 2 797-2 799.

GUO S S, WEI Y F, YAN J, et al. Determination of total lactones in different areas and parts of *andrographis* [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2010, 21(11): 2 797-2 799.

[19] SHARMA S N, JHA Z, SINHA R K, et al. Jasmonate-induced biosynthesis of andrographolide in *Andrographis paniculata* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2015, 153(2): 221-229.

[20] MARTINEZ I M, CHRISPEELS M J. Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(2): 561-576.

[21] KUMAR J, GUNAPATI S, KUMAR J, et al. Virus-induced gene silencing using a modified betasatellite: a potential candidate for functional genomics of crops[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(8): 2 109-2 113.

(编辑:宋亚珍)