

不同品种桂花转录组分析及桂花精油成分差异的初步探讨

张雪松^{1,2}, 裴建军¹, 赵林果^{1*}, 汤 锋³, 房仙颖¹, 解静聪¹¹南京林业大学, 南京 210037; ²江苏农林职业技术学院, 句容 212400; ³国际竹藤中心, 北京 100714

摘要: 为丰富桂花转录组数据信息, 阐明不同品种桂花精油合成的分子差异, 本研究选择三种不同品种桂花, 通过 Illumina Hiseq2000 平台测序, 总计产出 14.4G 数据, 三个品种的桂花样品共获得 70029 个 Unigene 序列, 平均长度 762 nt, N50 达到 1183 nt。通过 Unigene 的表达差异分析与通路富集分析, 发现与桂花精油物质合成途径有关的差异基因主要注释在二萜合成、萜类骨干化合物合成、单萜合成、倍半萜与三萜合成、苯丙烷类合成、苯丙酸类代谢、亚麻酸代谢以及亚油酸代谢 8 个通路中。而三种桂花差异基因均显著富集的通路则注释在苯丙烷类合成、苯丙酸类代谢、二萜合成以及萜类骨干化合物合成通路, 共获得 650 个编码精油物质合成途径中 54 个差异酶的差异基因。本研究建立了以金球桂、白洁和日香桂为代表的桂花转录组数据库。通过转录组分析, 确定了不同品种桂花精油物质合成差异的表达途径, 初步分析了转录组数据库中与精油物质合成途径相关的差异基因。本研究将为桂花精油成分代谢调控及体外表达提供依据。

关键词: 桂花; 精油合成; 转录组分析; RNA-seq

中图分类号: Q759

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.4.011

Transcriptome Analysis of Different *Osmanthus* Reveals Insight into the Difference of *Osmanthus* Oil Components

ZHANG Xue-song^{1,2}, PEI Jian-jun¹, ZHAO Lin-guo^{1*}, TANG Feng³, FANG Xian-ying¹, XIE Jing-cong¹¹College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;²Department of Biomedical Engineering, Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry,Jurong 212400, China; ³International centres for bamboo and rattan, Beijing 100714, China

Abstract: To enrich *Osmanthus fragrans* transcriptome data and clarify the difference of *Osmanthus fragrans* essential oil biosynthesis, three kinds of *Osmanthus* cultivars were selected and sequenced by Illumina Hiseq2000. RNA-Seq generated 14.4 G raw data, which was the de novo assembled into 70,029 Unigenes with a mean length of 762 nt, N50 of 1183 nt. Using pathway mapping and expression profiles, the different expressed genes (DEGS) were mapped to diterpenoid biosynthesis, terpenoid backbone biosynthesis, monoterpene biosynthesis, sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis, phenylpropanoid biosynthesis, phenylalanine metabolism, alpha-linolenic acid metabolism, linoleic acid metabolism pathway. Among them, phenylpropanoid biosynthesis, phenylalanine metabolism, diterpenoid biosynthesis and terpenoid backbone biosynthesis pathway were significant difference in three samples, and total 650 DEGS were found in the four pathways which were encoding 54 enzymes. Mass sequence data of *O. fragrans* was obtained from *Osmanthus* cultivars of 'Jinqiugui', 'Baijie' and 'Rixiangui'. Using transcriptome analysis, the pathways of the different of essential oil components were revealed and the DEGS for changes in components of *Osmanthus fragrans* were examined preliminarily. Data presented in this study will provide reference for the metabolic regulation and expression *in vivo* of *O. fragrans*.

Key words: *Osmanthus fragrans*; biosynthesis of essential oil; transcriptome analysis; RNA-seq

桂花 (*Osmanthus fragrans*) 是我国特有的木本香料, 有金桂 (*Osmanthus fragrans* var. *thunbergii*)、银桂 (*Osmanthus fragrans* var. *latifolius*)、四季桂 (*Osman-*

thus fragrans var. *semperflorens*) 以及丹桂 (*Osmanthus fragrans* var. *Aurantiaeus*) 四大品系。多年来的研究表明不同产地、不同品种的桂花精油成分组成、含量差异较大, 品质参差不齐^[1,2]。王晨、孙宝军^[3,4]的研究表明丹桂香气较次, 且精油中芳樟醇、 β 紫罗兰酮等主要香气物质含量均低于金桂、银桂以及四季

收稿日期: 2015-11-16 接受日期: 2016-02-19

基金项目: 国家林业局林业公益性行业科研基金专项 (201404601); 江苏省生物质绿色燃料与化学品重点实验室开放基金 (JSBGFC14014)

* 通讯作者 Tel: 86-25-85428300; E-mail: lgzhao@njfu.edu.cn

桂。李祖光等^[5]采用固相微萃取(SPME)-气质联用技术分析了金桂、银桂和丹桂3个不同品种桂花在不同开花期的头香成分,结果表明3种桂花均含有反式罗勒烯、乙酸4-己烯酯、顺式芳樟醇氧化物、反式芳樟醇氧化物、 β -芳樟醇、反式香叶醇和癸酸内酯这7种化合物。康文艺等^[6]采用顶空固相微萃取结

合气质联用技术同时对桂花四大栽培品系代表品种白洁、败育丹桂、佛顶珠和金桂的挥发油成分进行对比研究。从四个代表品种中共分离鉴定了72个化学成分,有50个成分在这四个品系中存在着明显的差异。

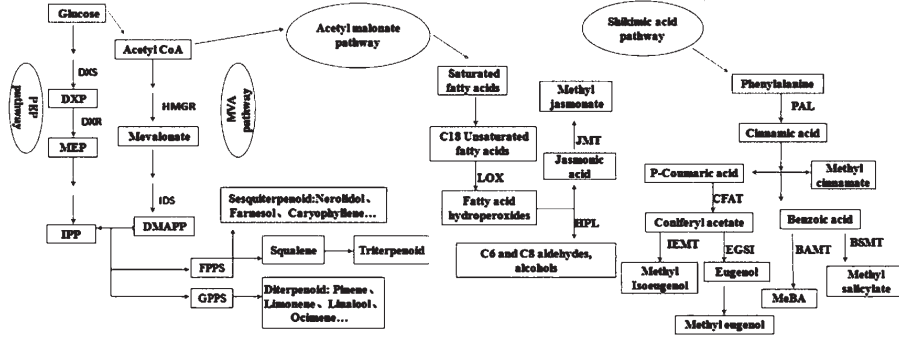


图1 植物精油生物合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of plant essential oil

植物精油是植物花朵释放的次生代谢产物,它由许多低分子量、易挥发的化合物组成,包括烷烃类、烯类、醇类、酮类、醛类、醚类、酯类及芳香族化合物等组成。按照生物合成途径可分为萜烯类、苯丙酸类/苯环型化合物和脂肪族化合物等三大类,其合成途径见图1^[7]。近几年从花香挥发物中提取的精油成分及其生物合成途径逐渐明确,生物合成途径中的一些关键酶基因相继被研究和应用^[8-12]。如何利用基因工程技术调控甚至是改造植物花香挥发物,从而提高植物花精油的质量与产量已成为当前研究的热点。在人类基因组项目后,转录组学、蛋白组学、代谢组学等组学不断涌现,生命科学的研究已经跨入后基因组时代。其中,转录组学作为一个率先发展起来的学科是研究细胞表型和功能的一个重要手段,是研究基因表达、基因结构和功能的一个新型的研究方向。Mu等^[13]曾以早银桂、橙红丹桂为研究对象,通过转录组技术初步分析了与桂花颜色形成有关的代谢途径。但在分子水平解析不同品种桂花精油成分差异尚未有报道。

本文采用转录组测序技术,选择金桂种群中的名优珍贵品种金球桂,银桂品种中花香浓郁、产量与质量均佳的优秀品种——白洁,以及四季桂家族中具有不断开花、香气浓郁特点的珍品——日香桂,通过高通量测序,建立桂花转录组数据库,初步阐明不同品种桂花合成精油成分差异的分子机制,为建立桂花精油关键合成酶基因表达调控技术,筛选优

良种、培育调控、生物化学合成等提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

于桂花开放初期,在浙江杭州桂花基地采集金球桂、白洁与日香桂三个分属金桂、银桂以及四季桂品种的桂花花朵,-80℃冷冻保存。

1.2 试验方法

1.2.1 总RNA的提取

参照Wei等^[14]的方法,使用pBIOZOL植物总RNA提取试剂(上海基峰生物科技有限公司,BSC55M1)提取总RNA。利用Nanodrop检测RNA纯度,Agilent 2100 Bioanalyzer进行总RNA质量检测。

1.2.2 建立文库,进行高通量测序

样品提取总RNA后,总RNA加热打开二级结构后用带有Dynabeads® Oligo(dT)25的磁珠富集mRNA。向得到的mRNA中加入0.1 mol/L Mg²⁺缓冲液,高温条件下使其片断化,再以片断后的mRNA为模板,合成cDNA,经过磁珠纯化、末端修复、3'末端加碱基A、加测序接头后,进行PCR扩增,从而完成整个文库制备工作。构建好的文库利用Illumina HiSeq™ 2000测序。测序由北京华大公司完成。测序获得的Reads使用短reads组装软件Trinity进行组装。

1.2.3 Unigene 功能注释及表达差异分析

功能注释信息给出 Unigene 的蛋白功能注释、COG 功能注释。首先,通过 blastx 将 Unigene 序列比对到蛋白数据库 NR (NCBI non-redundant database)、Swiss-Prot、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database) 和 COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins) ($e < 0.00001$)。通过 blastn 将 Unigene 比对到核酸数据库 Nt (Nucleic Acid Database) ($e < 0.00001$),得到与给定 Unigene 具有最高序列相似性的蛋白,从而得到该 Unigene 的蛋白功能注释信息。根据 NR 注释信息,使用 Blast2GO 软件得到 Unigene 的 GO (Gene ontology) 注释信息,并对所有 Unigene 做 GO 功能分类统计。

差异表达基因的筛选参考 Audic^[15]。Unigene 表达量的计算使用 FPKM (Fragments Per kb per Million fragments) 法。根据基因的表达量 (FPKM 值) 计算该基因在不同样本间的差异表达倍数并通过多重假设检验筛选差异表达基因。在本试验中差异表达基因定义为 FDR (False Discovery Rate) ≤ 0.001

且倍数差异在 2 倍以上的基因。通路显著性富集分析则以 KEGG 通路为单位,应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在差异表达基因中显著性富集的通路,经过多重检验校正后,选择 $P < 0.05$ 的通路定义为在差异表达基因中显著富集的通路。

2 结果与讨论

通过 Illumina Hiseq2000 平台测序,共产出 14,412,313,800 数据。其中质量不低于 20 的碱基的比例 (Q20) 均超过了 98%,不确定的碱基的比例为 0%。在金球桂、白洁和日香桂的转录组数据中,碱基 G 和 C 数占总碱基数的比例分别为 43.62%、43.70% 和 44.01%。

2.1 总 RNA 质量检测

金球桂、白洁、日香桂三个样品总 RNA 质量检测结果见表 1。经检测,三个样品的总 RNA OD 值均大于 1.8,28S/18S 在 1.5 ~ 2.3 之间,反应 RNA 完整性的 RIN 值在 8.5 ~ 9.5 之间,基本符合测序对样品的要求。

表 1 金球桂、白洁、日香桂三个样品总 RNA 质量检测结果
Table 1 The quality of total RNA of Jinqugui, Baijie and Rixianggui

样品 Sample	浓度 Concentration (ng/ μ L)	OD260/OD280	OD260/OD230	RIN	28S/18S
金球桂 Jinqiugui	1344	2.08	2.17	9.1	2.3
白洁 Baijie	1295	2.13	2.20	9.5	2.1
日香桂 Rixianggui	4445	2.07	2.19	8.5	1.5

2.2 组装结果分析

通过组装,三个品种的桂花样品共获得 70029 个 Unigene 序列。All-Unigene 总长为 53341180 nt,平均长度为 762 nt,反应组装效果的 N50 值为 1183。

All-Unigene 序列长度主要分布在 300 ~ 3000 bp 范围内 (见图 2)。大于 3000 bp 的序列仅为 915 个,占 1.3%,92.4% 的序列长度集中在 300 ~ 1500 bp。

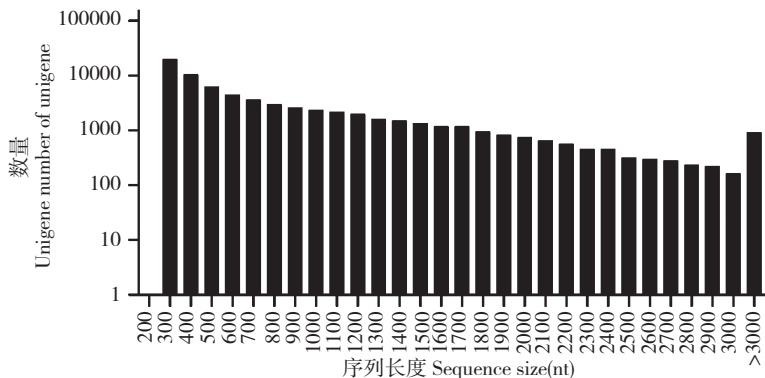


图 2 All-Unigene 长度分布统计

Fig. 2 The length distribution of All-Unigene

2.3 Unigene 功能预测

Unigene 功能注释, 注释到 NR, NT, Swiss-Prot, KEGG, COG, GO 库的 Unigene 分别是 50980 个, 42807 个, 32285 个, 28057 个, 17083 个, 39082 个, 所有注释上的 Unigene 是 52869 个, 占总数的 75.5%。桂花转录组数据库中有 32306 个 Unigene 分布于 25 个 COG 分类中, 其中聚类到一般功能预测的 Unigene 数量最多, 为 16.9%, 其次为转录功能(9.3%), 蛋白质转化及修饰(8.0%)。而聚类到细胞外结构的

最少, 仅为 0.02%。39082 个 Unigene 注释到 GO 分类的三个本体的 55 个条目里(见图 3)。其中注释到“细胞过程”、“代谢过程”、“细胞”、“细胞部分”以及“线粒体”的 Unigene 数量是占主导地位, 注释到“生物调节”、“刺激反应”、“催化活性”、“膜结构”以及“单一的组织过程”的 Unigene 的比例也较大, 而只有很少的 Unigene 注释到“活性调节”、“蛋白标记”等功能。

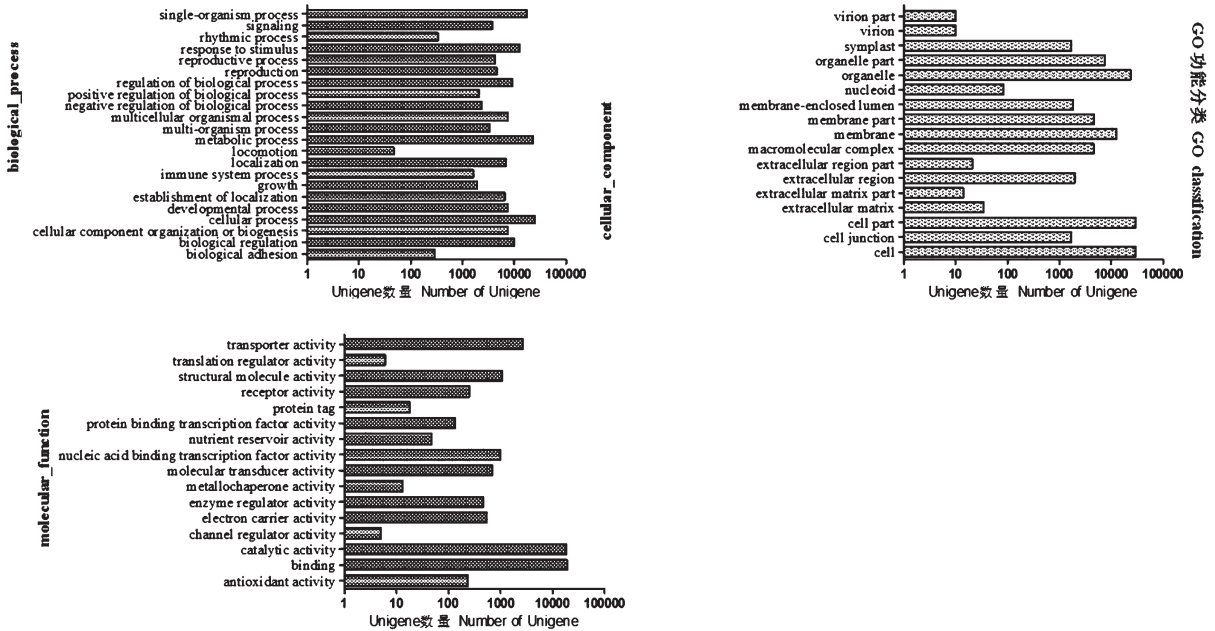


图 3 Unigene 的 GO 分类图
Fig. 3 GO classification of Unigene

KEGG 是系统分析基因产物在细胞中的代谢途径以及这些基因产物的功能的数据库, 利用 KEGG 可以进一步研究基因在生物学上的复杂行为。根据 KEGG 注释信息我们能进一步得到 Unigene 的 Pathway 注释。28057 个 Unigene 注释到 128 个代谢通路中。在 128 个通路中, 注释到代谢途径、次生代谢

物的生物合成以及植物—病原体相互作用过程的 Unigene 的数量最多, 分别占总数的 20.9%、10.5% 以及 5.9%, 而注释到咖啡因代谢、甜菜红碱的 Unigene 数目最少, 仅为 0.01%。注释到与桂花精油物质合成相关通路的 Unigene 数目见图 4。注释到苯

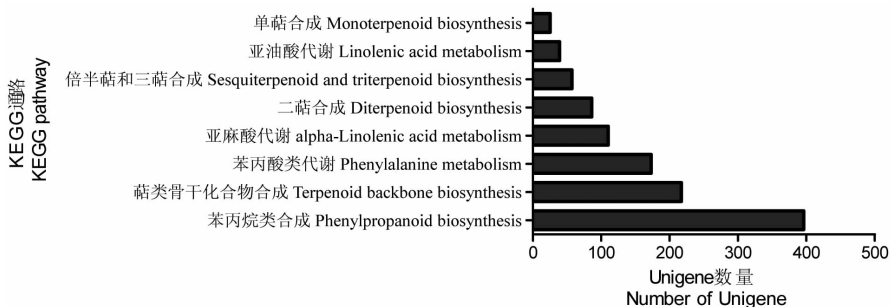


图 4 注释到与桂花精油物质合成相关通路的 Unigene 数目
Fig. 4 Number of Unigene associated with *Osmanthus* oil biosynthesis pathway

丙烷类合成通路的 Unigene 数目为 396, 占总数的 1.4%, 其次有 217(0.8%) 个 Unigene 注释到萜类骨干化合物合成通路, 173(0.6%) 个 Unigene 注释到苯丙酸类代谢, 110(0.4%) 个 Unigene 注释到亚麻酸代谢通路, 86(0.31%) 个 Unigene 注释到二萜生物合成, 57(0.2%) 个注释到倍半萜和三萜合成, 39(0.14%) 个注释到亚油酸代谢, 25(0.1%) 个注释到单萜合成。

2.4 基于转录组数据的桂花精油物质成分差异的初步探讨

我们将不同品种桂花的转录组数据进行两两比较, 通过通路富集分析确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径, 明确不同品种桂花精油成分差异的分子机制。通过金球桂与白洁、金球桂与日香桂以及日香桂与白洁的转录组数

据库比较, 发现分别有 6259、7770 以及 9981 个差异 Unigene 通过通路显著性分析注释到 127、127 以及 128 条代谢途径中。在这些代谢通路中我们找出了与桂花精油物质合成有关的代谢途径见表 2。金球桂与白洁相比, 有 328 个差异基因是显著富集的 ($P < 0.05$), 这 328 个差异基因分布在二萜合成 (29)、萜类骨干化合物合成 (60)、苯丙烷类合成 (132)、苯丙酸类代谢 (55)、亚麻酸代谢 (37) 以及亚油酸代谢 (15) 通路中。金球桂与日香桂相比, 有 366 个显著富集的差异基因, 分布在二萜合成 (39)、萜类骨干化合物合成 (71)、单萜合成 (13)、苯丙烷类合成 (174)、苯丙酸类代谢 (69) 5 个通路中。日香桂与白洁相比, 则有 422 个显著富集的差异基因分布在与苯丙酸合成有关的 2 个通路以及与萜类物质合成有关的 3 个通路中。

表 2 转录组数据库中与桂花精油物质合成有关的差异基因通路富集分析

Table 2 Pathway enrichment analysis of DEGS of *Osmanthus* oil biosynthesis

差异基因富集途径 Pathway enrichment of DEGS		差异 Unigene 数量 Number of DEGS	金球桂与白洁 Jinjiugui-vs -Baijie	金球桂与日香桂 Jinjiugui-vs -Rixianggui	日香桂与白洁 Rixianggui-vs -Baijie
萜烯类合成 Terpenoid biosynthesis	二萜合成 Diterpenoid biosynthesis	29(0.46%)	29(0.46%)	39(0.50%)	41(0.41%)
		P 值 P - value	0.0100	0.000343	0.0138
	萜类骨干化合物合成 Terpenoid backbone biosynthesis	60(0.96%)	60(0.96%)	71(0.91%)	90(0.90%)
		P 值 P - value	0.0371	0.0482	0.0410
单萜合成 Monoterpenoid biosynthesis	单萜合成 Monoterpenoid biosynthesis	7(0.11%)	7(0.11%)	13(0.17%)	14(0.14%)
		P 值 P - value	0.316	0.00864	0.0293
	倍半萜与三萜合成 Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	11(0.18%)	11(0.18%)	15(0.19%)	29(0.29%)
		P 值 P - value	0.755	0.641	0.0950
苯丙酸类合成 Phenylalaninebiosynthesis	苯丙烷类合成 Phenylpropanoid biosynthesis	132(2.14%)	132(2.14%)	174(2.24%)	191(1.91%)
		P 值 P - value	8.146×10^{-8}	2.404×10^{-12}	1.314×10^{-7}
	苯丙酸类代谢 Phenylalanine metabolism	55(0.88%)	55(0.88%)	69(0.89%)	86(0.86%)
		P 值 P - value	0.00246	0.00291	9.123×10^{-5}
脂肪族化合物合成 Aliphatic compound biosynthesis	亚麻酸代谢 α - Linolenic acid metabolism	37(0.59%)	37(0.59%)	36(0.46%)	42(0.42%)
		P 值	0.00420	0.142	0.316
	亚油酸代谢 Linolenic acid metabolism	15(0.24%)	15(0.24%)	10(0.13%)	14(0.14%)
		P 值 P - value	0.0166	0.671	0.543

在三种桂花的转录组数据库中,与苯丙酸类物质合成途径相关的苯丙烷类合成以及苯丙酸类代谢均为差异基因显著富集的通路。在植物体内,苯丙酸类化合物主要经由肉桂酸途径合成。该途径以莽草酸为前体,由莽草酸途径产生分支酸^[16],分支酸再转换成苯丙氨酸。在苯丙氨酸解氨酶的催化下,苯丙氨酸生成反式肉桂酸。然后反式肉桂酸经过甲基化或酰化形成乙酰丁子香酚、水杨酸甲酯、苯甲酸甲酯以及乙酸苜酯等挥发性物质^[17]。此外,苯丙素类物质还可以通过依赖乙酰辅酶 A 的 β 氧化途径和不依赖于乙酰辅酶 A 的非 β 氧化途径转变为苯型烃苯丙氨酸,继而在苯乙醛合成酶的催化下直接生成苯乙醛,继而生成苯甲酸苯乙酯^[18]。通过同源性比对,共有 415 个 Unigene 编码苯丙烷合成通路中的 17 个酶基因,119 个 Unigene 编码苯丙酸类代谢通路中的 10 个酶基因。

此外,萜烯类合成途径中有关二萜合成以及萜类骨干化合物合成也为三种桂花差异基因显著富集的通路。萜类化合物是植物精油物质中最大的类群,也是许多植物香味物质的主要成分。萜类物质的生物合成分为两个大阶段,第一阶段属于萜类骨干化合物的合成,包括通过 MVA 途径或者 PEP 途径生成萜烯类物质有着共同的前体物质异戊烯基焦磷酸和 3,3-二甲基丙烯基焦磷酸,然后合成 GPP (香叶基焦磷酸)、FPP (法呢基焦磷酸)、GGPP (香叶基焦磷酸)等前体。第二阶段则是前体在一系列萜类合成酶的作用下,合成单萜、二萜与倍半萜,继而生成其他的萜类化合物^[19]。通过转录组数据分析,发现注释到萜类骨干化合物合成通路的差异 Unigene 中,有 23 个差异基因编码 MVA 途径中的 5 个差异酶,包括乙酰 COA 酰基转移酶(AACT)、羟甲基戊二酸 COA 合成酶(HMGS)、羟甲基戊二酸还原酶(HMGR)、甲羟戊酸激酶(MVK)以及二磷酸甲羟戊酸脱羧酶(MVD)。16 个差异基因编码 MEP 途径中的 6 个差异酶,包括 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸盐合成酶(DXS)、5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶(DXR)、CDP-ME 激酶(ISPE)、MEP-cPP 合酶(ISPF)、HMBPP 合酶(ISPG)以及 IPP/DMAPP 合酶(LYTB)。10 个差异基因编码分别编码与前体物质合成有关的异戊烯基二磷酸异构酶(IPI)、法尼基焦磷酸盐合成酶(FDPS)以及香叶基焦磷酸合成酶(GGPS)。而在二萜合成通路中发现了 67 个差异基因编码 14 个差异酶,包括柯巴基焦磷酸合酶(12)、

3 二萜合成酶(3)、二萜氧化酶(3)、DTC1 酶(1)、CYP71Z6(6)、CYP76M7(3)、赤霉素-20-氧化酶(7)、赤霉素双加氧酶(8)、赤霉素-2-氧化酶(6)、CPS4(1)、蓖麻烯合成酶(5)、CYP99A3(7)、DTS2(1)以及稻壳酮 A 合成酶(9)。

3 结论

本文通过 Illumina Hiseq2000 平台,首次利用 RNA-seq 技术对以金球桂、白洁、日香桂为代表的金桂、银桂以及四季桂三种不同品种的桂花进行了转录组测序与功能分析,初步建立了它们的基因表达图谱,并通过桂花精油物质合成途径差异酶基因的发掘初步阐述了不同品种桂花精油成分差异的分子机制。

三个品种的桂花样品共获得 70029 个 Unigene 序列。通过对转录组数据的差异表达分析发现与桂花精油物质合成途径有关的差异基因主要注释在二萜合成、萜类骨干化合物合成、单萜合成、倍半萜与三萜合成、苯丙烷类合成、苯丙酸类代谢、亚麻酸代谢以及亚油酸代谢 8 个通路中。而三种桂花差异基因显著富集的通路则注释在与苯丙酸类物质合成途径有关的苯丙烷类合成和苯丙酸类代谢通路以及与萜烯类合成有关的二萜合成和萜类骨干化合物合成通路。在苯丙酸合成途径中,有 534 个差异 Unigene 编码了两个通路的 27 个相关差异酶,其中包括了苯丙氨酸氨裂解酶、细胞色素 P450 等精油物质合成的关键酶。一共有 116 个差异 Unigene 编码了与萜烯类合成途径有关的 27 个差异酶。

参考文献

- Li FF(李芳芳),Huang QZ(黄齐志). Analysis of fragrance composition in three cultivars of *Osmanthus fragrans* Albus group flower by gas chromatography-mass spectrometry. *Wuhan Univ J Nat Sci* (武汉大学学报,理学版),2011,16: 342-348.
- Chen HX(陈虹霞),Wang CZ(王成章),Sun Y(孙燕). Analysis of essential oil compounds from different species *Osmanthus fragrans* Lour. by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomass Chem Eng* (生物质化学工程),2012,46(4):37-41.
- Sun BJ(孙宝军). Study on the aromatic constituents of some *Osmanthus fragrans* cultivars in China. Henan: Henan University(河南大学),MSc. 2011.
- Wang C(王晨). Study on the aroma components and the ini-

- tial establishment of distinguish model using infrared spectrum of sweet *Osmanthus* cultivars. Nanjing: Nanjing Forestry University (南京林业大学), MSc. 2012.
- 5 Li ZG(李祖光), Cao H(曹慧), Zhu GH(朱国华), *et al.* Study on chemical constituents of fragrance released from fresh flowers of three different *Osmanthus fragrans* Lour. during different florescences. *Chem Ind Forest Prod* (林产化学与工业), 2008, 28(3): 75-80.
 - 6 Kang WY(康文艺), Wang JM(王金梅). Composition of the essential oil in four species *Osmanthus fragrans*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 22: 807-811.
 - 7 Deng XJ(邓晓军), Chen XY(陈晓亚), Du JW(杜家纬). Plant volatiles and their metabolic engineering. *J Plant Physiol Molecul Biol* (植物生理与分子生物学学报), 2004, 30(1): 11-18.
 - 8 Han YJ, Li LX, Dong MF, *et al.* cDNA cloning of the phytoene synthase (PSY) and expression analysis of PSY and carotenoid cleavage dioxygenase genes in *Osmanthus fragrans*. *Biologia*, 2013, 68: 258-263.
 - 9 Liu RR, Xu SH, Li JL, *et al.* Expression profile of a PAL gene from *Astragalus membranaceus* var. *Mongholicus* and its crucial role in flux into flavonoid biosynthesis. *Plant Cell Rep*, 2006, 25: 705-710.
 - 10 Vishwakarma RK, Ruby, Singh S, *et al.* Molecular cloning, biochemical characterization, and differential expression of an acetyl-CoA:acetyltransferase gene (AACT) of Brahmi (*Bacopa monniera*). *Plant Mol Biol Rep*, 2013, 31: 547-557.
 - 11 Baldermann S, Kato M, Kurosawa M, *et al.* Functional characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase 1 and its relation to the carotenoid accumulation and volatile emission during the floral development of *Osmanthus fragrans* Lour. *J Exp Botan*, 2010, 61: 2967-2977.
 - 12 Lv XM, Xu HM, Yu HW. Significantly enhanced production of isoprene by ordered coexpression of genes *dxs*, *dxr* and *idi* in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 2357-2365.
 - 13 Mu HN, Li HG, Wang LG, *et al.* Transcriptome sequencing and analysis of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans* Lour.) *Genes Genom*, 2014, 36: 777-788.
 - 14 Wei MM, Song MZ, Fan SL, *et al.* Transcriptomic analysis of differentially expressed genes during anther development in genetic male sterile and wild type cotton by digital gene-expression profiling. *BMC Genomics*, 2013, 14: 97-113.
 - 15 Audic S, Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res*, 1997, 7: 986-995.
 - 16 Schuurink RC, Haring MA, Clark DG. Regulation of volatile benzenoid biosynthesis in petunia flowers. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(1): 20-25.
 - 17 Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol*, 2004, 135: 1893-1902.
 - 18 Boatright J, Negre F, Chen X, *et al.* Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in petunipetal tissue. *Plant Physiol*, 2004, 135: 1993-2011.
 - 19 Aharoni A, Jongsma MA, Kim T, *et al.* Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochem Reviews*, 2006, 5(1): 49-58.
-
- (上接第 528 页)
- 10 Liu Y, Hong L, Kempf VR, *et al.* Ion-exchange and adsorption of Fe(III) by sepia melanin. *Pigm Cell Res*, 2004, 17: 262-269.
 - 11 Chen SG(陈士国), Xue Y(薛勇), Xue CH(薛长湖), *et al.* Absorption of Fe(III) by squid melanin. *Ion Exchange Adsorption* (离子交换与吸附), 2010, 26: 310-316.
 - 12 Fan Q, Cheng K, Hu X, *et al.* Transferring biomarker into molecular probe: melanin Nanoparticle as a naturally active platform for multimodality imaging. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 15185-15194.
 - 13 Cheun WL. The chemical structure of melanin. *Pigm Cell Res*, 2004, 17: 422-423.
 - 14 Ozeki H, Ito S, Wakamatsu K, *et al.* Spectrophotometric characterization of eumelanin and pheomelanin in hair. *Pigm Cell Res*, 1996, 9: 265-270.
 - 15 Ito S. Advances in chemical analysis of melanins. *Pigmentary System*, 1998, 439-450.