

巴戟天 *MoDXS* 基因及其启动子的克隆与分析

谢德金¹, 周成城², 杨 柯¹, 任 可¹, 杨德明¹, 陈凌艳², 荣俊冬¹,
郑郁善^{1,2,*}

(¹ 福建农林大学林学院, 福州 350002; ² 福建农林大学园林学院, 福州 350002)

摘 要: 从药用植物巴戟天根部组织中克隆了 3 个 1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸合成酶基因 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2*, 其全长 cDNA 分别为 2 676、2 667 和 2 610 bp, 编码区序列长度为 2 154、2 121 和 2 190 bp, 编码 717、706 和 729 个氨基酸。BlastP 序列比对分析表明 MoDXS 蛋白与其他植物的 DXS 蛋白高度同源; 系统进化发育树分析显示, MoDXS 蛋白与中粒咖啡和小粒咖啡 DXS 蛋白亲缘关系最近。MoDXS1、MoDXS2-1 和 MoDXS2-2 蛋白被分别归为 clade 1、clade 3 和 clade 2。*MoDXS1* 在巴戟天根中表达量最高; *MoDXS2-1* 在巴戟天根、茎、叶中的相对表达量差异显著, 叶中最高; *MoDXS2-2* 在根中表达量最高, 而在茎和叶中最低。*MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 基因的 5'端上游启动子序列长度分别为 2 538、732 和 1 744 bp。亚细胞定位预测 3 个 MoDXS 均在叶绿体上。

关键词: 巴戟天; 1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸合成酶; 启动子序列; 亚细胞定位

中图分类号: S 567; Q 756; Q 812 **文献标志码:** A **文章编号:** 0513-353X(2021)03-0577-13

Cloning and Analysis of *MoDXS* Gene and Its Promoter in *Morinda officinalis*

XIE Dejin¹, ZHOU Chengcheng², YANG Ke¹, REN Ke¹, YANG Deming¹, CHEN Lingyan², RONG Jundong¹, and ZHENG Yushan^{1,2,*}

(¹ College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; ² College of Landscape, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In the root tissue of *Morinda officinalis*, three full-length cDNA sequences of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase genes (*MoDXS1*, *MoDXS2-1* and *MoDXS2-2*) were successfully cloned and their length were 2 676, 2 667, and 2 610 bp, respectively. The coding sequence (CDS) of the three cDNAs were 2 154, 2 121, and 2 190 bp, encoding 717, 706, and 729 amino acid residues, respectively. Sequence comparison by BlastP in NCBI database revealed that MoDXS proteins had high homology with DXS proteins from other species. The result of the phylogenetic tree displayed that MoDXS proteins had the closest relationship with DXS proteins from *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. Furthermore, MoDXS1, MoDXS2-1, and MoDXS2-2 proteins were grouped into clade 1, clade 3, and clade 2, respectively. *MoDXS1* gene had the highest expression level in roots. The expression level of

收稿日期: 2020-09-29; 修回日期: 2020-11-26

基金项目: 福建省科技重大专项项目 (2004YZ02-05); 福建省科技创新平台项目 (2008Y2001)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zys1960@163.com)

MoDXS2-1 gene had significant differences in three tissues, and the expression level was the highest in leaves. However, the expression level of *MoDXS2-2* gene was the highest in roots but lower in stems and leaves. The plantCARE analysis indicated that the upstream regulation sequences of *MoDXS1*, *MoDXS2-1*, and *MoDXS2-2* were 2 538, 732, and 1 744 bp, respectively. The subcellular localization exhibited that the three MoDXS proteins were located on chloroplast.

Keywords: *Morinda officinalis*; 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase; promoter sequence; subcellular localization

茜草科的巴戟天 (*Morinda officinalis* How) 为药用植物, 广泛分布于中国长江以南大部分地区, 其干燥的根含有多种生物活性成分, 如蒽醌类、环烯醚萜类和寡糖类化合物, 具有补肾阳、强筋骨和祛风湿的功效 (黄珍珍, 2013; 杨菲, 2016)。在已研究的巴戟天属植物中, 几乎都存在游离型蒽醌类化合物, 其中茜草素型蒽醌类有机物的合成需要莽草酸途径、产生活性异戊二烯 IPP (isopentenyl diphosphate) 和 DMAPP (dimethylallyldiphosphate) 的甲基赤藓醇磷酸途径 MEP (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway) 和甲羟戊酸途径 MVA (mevalonate pathway)。茜草素型蒽醌的 A 环和 B 环主要是通过莽草酸途径形成的, 而关于 C 环的形成有研究认为以 MEP 合成途径为主 (Han et al., 2001, 2002)。1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸合成酶 (DXS) 作为 MEP 合成途径的第 1 步反应的关键酶, 能催化代谢中间产物丙酮酸和 3-磷酸甘油醛形成 1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸 (DXP), 继而形成 IPP 或 DMAPP。关于 DXS 基因克隆的研究多有报道, 如拟南芥 (Estévez et al., 2001)、水稻 (Kim et al., 2005)、玉米 (Elizabeth et al., 2011)、番茄 (潘夕春等, 2007)、茉莉 (孙君等, 2014) 等。对茜草科植物 DXS 基因近几年也有研究, 如咖啡属的小粒咖啡 (*Coffea arabica*, XP_027070828.1)、中粒咖啡 (*Coffea canephora*, CDP04804.1), 巴戟天属的海巴戟 (Han et al., 2003; Quevedo et al., 2010)。对于药用植物丹参 (Zhou et al., 2016)、青蒿 (Zhang et al., 2018)、铁皮石斛 (Fan et al., 2016)、雷公藤 (Tong et al., 2015) 及土沉香 (Xu et al., 2014) 中涉及到萜类化合物 MEP 合成途径的相关基因也相继被揭示。早期研究显示, 拟南芥中过表达 DXS 基因, 能使植物体内不同的萜类化合物有不同水平升高 (Estévez et al., 2001)。青蒿素是一种萜类化合物, 其合成相关基因在腺毛中特异表达, 并且青蒿素合成相关基因在花和嫩叶组织中的表达量也较高, 这与其腺毛数量众多有直接关系 (Lu et al., 2013)。Zhang 等 (2018) 为了探究青蒿中 *DXS2* 的组织特异性表达模式, 通过构建其表达载体, 并侵染拟南芥花序, 结果显示, 其主要在拟南芥叶片的腺毛中表达, 这说明 *DXS2* 可能是青蒿 DXS 基因家族中唯一和青蒿素合成有关的成员。

以往关于巴戟天的研究主要集中在化学成分分析鉴定 (黄珍珍, 2013; 杨菲, 2016)、生物活性成分提纯工艺改良 (蔡月琴等, 2019)、药理 (何玉琼, 2019) 和栽培种植 (李美映等, 2020) 等方面, 而对于活性成分的生物合成途径相关基因的研究鲜有报道。本研究中利用 RT-PCR 技术从巴戟天根部组织中成功克隆了 3 个 *MoDXS* 基因, 并对其进行生物信息分析。这为下一阶段通过转基因方法大幅提高巴戟天中茜草素型蒽醌类的含量提供了可能的理论依据, 也丰富了巴戟天的基因功能方面的研究。

1 材料与方法

1.1 材料及其总 RNA、DNA 的提取和 cDNA 第 1 链的合成

2019 年 4 月 22 日, 将 2 年生巴戟天植株栽植于福建省福州市福建农林大学园林学院温室大棚, 培养 2 个月, 取 9 株生长良好的巴戟天用于试验研究, 3 株 1 个重复, 共 3 个重复。于 2019 年 6 月 22 日 8:00—12:00 取样 (根、茎和叶), 立即放入液氮中冷冻, -80°C 保存。

按照总 RNA 提取试剂盒说明书 (DP441) 和反转录试剂盒 (ThermoFisher Scientific 公司) 说明书的操作步骤提取试验材料的总 RNA, 反转录合成 cDNA 第 1 链, 并将其质量浓度调整至 $100\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 左右。采用传统的 CTAB 法提取巴戟天的 DNA, 并进行浓度测定和琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2 *MoDXS* 全长 cDNA 序列的克隆

由巴戟天转录组数据分析得到关于 *MoDXS* 基因的核心片段, 使用 Primer Premier 5.0 软件分别设计 5'-RACE 和 3'-RACE 特异性扩增引物, 经 PCR 扩增的产物纯化后与 pEASY-T5 Zero 载体 (北京全式金公司) 连接后转化涂板, 菌液 PCR 验证后送福州铂尚测序公司测序, 使用 DNAMAN 软件进行拼接, 得到 *MoDXS* 的全长 cDNA 序列。使用 NCBI-ORFfinder 预测 *MoDXS* 的 CDS 序列。依据其 CDS 序列设计 3 对特异性扩增引物 (表 1)。KOD 酶 (TOYOBO 公司) $50\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系: (1) KOD-Plus-Neo $1\text{ }\mu\text{L}$, MgSO_4 $4\text{ }\mu\text{L}$, dNTPs $5\text{ }\mu\text{L}$, $10\times$ PCR Buffer $5\text{ }\mu\text{L}$, 引物各 $1.5\text{ }\mu\text{L}$, cDNA 模板 $2\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $30\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增反应程序: 94°C 2 min; 94°C 15 s, 57°C 30 s, 68°C 140 s, 共 35 个循环; 4°C 保存。(2) TaKaRa primeSTAR max (TaKaRa 公司) $50\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系: primeSTAR max Premix $25\text{ }\mu\text{L}$, 引物各 $2\text{ }\mu\text{L}$, cDNA 模板 $2\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $19\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增反应程序: 98°C 10 s, 55°C 15 s, 72°C 140 s, 共 35 个循环。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检验合格后, 用 OMEGA 的 DNA 胶回收试剂盒纯化 PCR 扩增产物。

1.3 *MoDXS* 启动子的分离

依据 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 的 CDS 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件从 ATG 起始密码子下游 600 bp 内设计 3 条退火温度较高的特异性引物 (SP1、SP2 和 SP3) 进行巢式 PCR 反应 (表 1)。SP3 在 SP2 内侧, SP2 在 SP1 内侧, 与试剂盒 (TaKaRa 公司) 提供的 4 种退火温度较低的兼并性引物 (AP1、AP2、AP3 和 AP4) 进行 3 次热不对称 PCR 反应。取上述 3 次 PCR 反应液 $5\text{ }\mu\text{L}$ 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收第 3 次 PCR 扩增产物, 将回收的 PCR 产物与 pEASY-T5-Zero 载体连接并测序。

1.4 *MoDXS* 生物信息分析

NCBI 的 ORFfinder 分析预测基因的 CDS 序列; 使用 ExPASy-prosite 在线工具进行蛋白功能位点分析; 使用 NCBI-Blastp、DNAMAN、NCBI-CDD 和 InterPro 软件进行蛋白序列的同源比对和保守结构域分析; 利用 MEGA7.0 软件的 Neighbor-Joining 法对巴戟天和其他植物 DXS 蛋白进行聚类分析; 运用在线工具 Rare Codon Caltor 进行稀有密码子预测; 运用在线处理软件 ExPASy-Protparam、ExPASy-ProtScale 和 NetPhos3.1server 分析预测 *MoDXS* 编码的氨基酸序列组成、理化性质、亲疏水性及磷酸化修饰位点; 分别用在线工具 TMHMMserver2.0、SignalP 分析和预测跨膜结构域及信号肽分析; 运用 WoLF PSORT 在线工具进行 *MoDXS* 蛋白的亚细胞定位分析; 运用 ChloroP 在线工具预

测叶绿体转运肽存在与否；分别用在线工具 SOPMA 和 SWISS-MODEL 预测 MoDXS 蛋白的二级和三级结构；运用 plantCARE 在线分析工具进行基因启动子区顺式作用元件分析。

1.5 MoDXS 亚细胞定位分析

设计带有 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切位点及部分载体序列的引物,并克隆 3 个 *MoDXS* 基因的 CDS 序列,用 *infusion* 构建融合表达载体 pCambia2300-35s-eGFP-*MoDXS1*/*MoDXS2-1*/*MoDXS2-2*, 测序验证后提取质粒。将质粒转入拟南芥原生质体中,获得高效瞬时表达。使用 Leica TCS SP8X DLS 激光共聚焦显微镜分别在波长 488 nm 和 555 nm 的激发光下观察 GFP 和叶绿体自发红色荧光信号。

1.6 MoDXS 表达量分析

选择 *Elongation factor 1-alpha* (*ef1a*) 作为巴戟天的内参基因(谢德金 等, 2020)。用于 qRT-PCR 分析的 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 基因引物见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

用途 Usage	基因 Gene	引物序列 Primer sequences
cDNA 末端快速克隆 5'RACE and 3'RACE	<i>MoDXS1</i>	5'RACE-1: 5' - TCGTGTAGGGAACGGCGAAGAA - 3' 5'RACE-2: 5' - CCCCTTGGCAACTTCTCTCAGTTCTC - 3' 3'RACE-1: 5' - CCAAGGGGGTTACCAAGCAGATT - 3' 3'RACE-2: 5' - ATATGCCCGTGGCTTGATTAGTGG - 3'
	<i>MoDXS2-1</i>	5'RACE-1: 5' - CACATTGTGTGGACCATCCGATC - 3' 5'RACE-2: 5' - TCACTGAGAGTGCAGGGCTGGAC - 3' 3'RACE-1: 5' - TCACTATGTTTTCCACTCACCTGCGG - 3' 3'RACE-2: 5' - TATGAGGCAATGAGTAATGCGGGC - 3'
	<i>MoDXS2-2</i>	5'RACE-1: 5' - AGAACAGGTCCTGGAACAGGCATAG - 3' 5'RACE-2: 5' - CAACTGTGGCTGTAGGGAGGGAGAC - 3' 3'RACE-1: 5' - CAGGAGAGAAACCAGTTACCCCG - 3' 3'RACE-2: 5' - GGAGGTCACGGATGCACACGATC - 3'
	<i>MoDXS1</i>	F: 5' - ATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGGCTCTGAGTGCATTTCG - 3' R: 5' - TTGTCGACGGAGCTCGAATTCCTATGACATGATTTCCAGAGCTTCTC - 3'
	<i>MoDXS2-1</i>	F: 5' - ATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGGGAGTGCAATTTTGTAG - 3' R: 5' - TTGTCGACGGAGCTCGAATTCCTAGCACATCAGAAGAAGAGCCTC - 3'
	<i>MoDXS2-2</i>	F: 5' - ATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGGCTTCAGCATCATATGGCG - 3' R: 5' - TTGTCGACGGAGCTCGAATTCCTATAGATTGAGGAGGTGTAACTTTCCC - 3'
	<i>MoDXS1</i>	F: 5' - ATGTTGTACCGAGAAAGGC - 3'; R: 5' - TGGCACTGGCTTTGAATTGC - 3'
	<i>MoDXS2-1</i>	F: 5' - ACGTTCATGTCCTGTTTGCC - 3'; R: 5' - TTGCCACCATATGAGCAAGC - 3'
	<i>MoDXS2-2</i>	F: 5' - AGGCGTTGTGTAGCTTACTG - 3'; R: 5' - AACGTTTGTGCGGATCGTGTG - 3'
	<i>ef1a</i>	F: 5' - GGCTGCCGAGATGAACA - 3'; R: 5' - CTCAAACTTCCACAAGGCAATA - 3'
	<i>MoDXS1</i>	SP1: 5' - TGACAATGATGCCCCGAATCTAC - 3' SP2: 5' - ATGACCCCAAGTCTTTGAAACG - 3' SP3: 5' - GGCATTTGTCTCTTCTCCAGTCAA - 3'
	<i>MoDXS2-1</i>	SP1: 5' - ACGAACAGATTCTCCTCGGAAGCA - 3' SP2: 5' - CGCAGGTGAGTGGAACATAGTGAA - 3' SP3: 5' - GCAACAATGCGGTCTCGCTTTC - 3'
qRT-PCR	<i>MoDXS1</i>	SP1: 5' - GCTTCACTATTCTCCCTTTGAGCAG - 3' SP2: 5' - ACGGGGTAACTGGTTTCTCTC - 3' SP3: 5' - ATGCCACCGATCTTGGACACT - 3'
	<i>MoDXS2-1</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGCTCTGAGTGCATTTCG - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCTGACATGATTTCCAGAGCTTCTCT - 3'
	<i>MoDXS2-2</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGGCAAGTGCAATTTTGTAG - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCGCACATCAGAAGAAGAGCCTCAC - 3' F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGCTTCAGCATCATATGGC - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCTAGATTGAGGAGGTGTAACTTTCCCTT - 3'
内参基因 Reference gene 热不对称交错 PCR Thermal asymmetric interlaced PCR	<i>MoDXS1</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGCTCTGAGTGCATTTCG - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCTGACATGATTTCCAGAGCTTCTCT - 3'
	<i>MoDXS2-1</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGGCAAGTGCAATTTTGTAG - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCGCACATCAGAAGAAGAGCCTCAC - 3'
	<i>MoDXS2-2</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGCTTCAGCATCATATGGC - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCTAGATTGAGGAGGTGTAACTTTCCCTT - 3'
	<i>MoDXS1</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGCTCTGAGTGCATTTCG - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCTGACATGATTTCCAGAGCTTCTCT - 3'
	<i>MoDXS2-1</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGGCAAGTGCAATTTTGTAG - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCGCACATCAGAAGAAGAGCCTCAC - 3'
	<i>MoDXS2-2</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGCTTCAGCATCATATGGC - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCTAGATTGAGGAGGTGTAACTTTCCCTT - 3'
	<i>MoDXS1</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGCTCTGAGTGCATTTCG - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCTGACATGATTTCCAGAGCTTCTCT - 3'
	<i>MoDXS2-1</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGGCAAGTGCAATTTTGTAG - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCGCACATCAGAAGAAGAGCCTCAC - 3'
	<i>MoDXS2-2</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGCTTCAGCATCATATGGC - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCTAGATTGAGGAGGTGTAACTTTCCCTT - 3'
	<i>MoDXS1</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGCTCTGAGTGCATTTCG - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCTGACATGATTTCCAGAGCTTCTCT - 3'
	<i>MoDXS2-1</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGGCAAGTGCAATTTTGTAG - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCGCACATCAGAAGAAGAGCCTCAC - 3'
	<i>MoDXS2-2</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGCTTCAGCATCATATGGC - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCTAGATTGAGGAGGTGTAACTTTCCCTT - 3'
	<i>MoDXS2-2</i>	F: 5' - ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGCTTCAGCATCATATGGC - 3' R: 5' - AGTGTGCACTCTAGAGGATCCTAGATTGAGGAGGTGTAACTTTCCCTT - 3'

4 对引物溶解曲线为单峰, 引物无二聚体, 特异性良好。扩增体系和反应程序按照 TaKaRa 公司的 TB Green *Premix Ex Taq* 试剂盒的说明操作, 每个样品做 3 个平行试验, 3 个生物学重复, 后用 $C_t (2^{-\Delta\Delta C_t})$ 法计算 *MoDXS* 基因在巴戟天根、茎、叶 3 个不同组织中的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *MoDXS* 全长 cDNA 克隆

按照 SMARTer RACE 5'/3' kit 试剂盒说明书操作步骤对 *MoDXS* 分别进行 5'/3'-RACE 扩增, 经测序和拼接后得到 3 个 *MoDXS* 的全长 cDNA 序列, 长度分别为 2 676、2 667 和 2 610 bp。预测的 CDS 序列长度分别为: 2 154、2 121 和 2 190 bp, 分别编码 717、706 和 729 个氨基酸。经 Blastp 比对分析, 确认所获得的 3 个片段为 DXS 基因。由 ExPASy-prosite 软件功能位点鉴定, 其中 1 个基因同时含有 Transketolase1 (TK1) 和 Transketolase2 (TK2) 功能位点, 命名为 *MoDXS1*, 其余 2 个基因都只含有 Transketolase2 (TK2) 功能位点, 将其命名为 *MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2*。

以巴戟天的 cDNA 为模板, 经两种 PCR 聚合酶扩增和琼脂糖凝胶电泳检测, *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 的 CDS 序列条带都在 2 000 bp 左右, 大小与预期相符 (图 1)。将两种方法纯化的克隆片段连接到克隆载体上, 挑取部分阳性单克隆测序, 最终验证 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 基因编码区的序列与转录组数据相同。

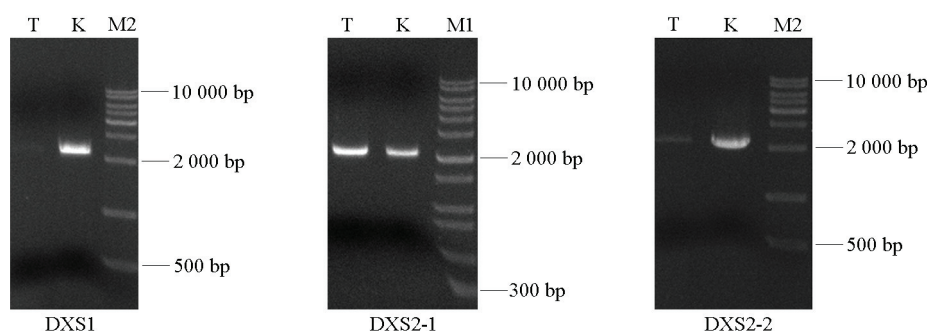


图 1 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 基因的 PCR 扩增产物

M1: 1 kb plus DNA marker; M2: 1 kb DNA marker; T: TaKaRa PCR 扩增产物; K: KOD PCR 扩增产物。

Fig. 1 PCR amplification product of *MoDXS1*, *MoDXS2-1*, and *MoDXS2-2* genes

M: 1 kb plus DNA marker; M2: 1 kb DNA marker; T: PCR amplification product of TaKaRa; K: PCR amplification product of KOD.

2.2 巴戟天 *MoDXS* 生物信息分析

将 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 预测的氨基酸序列用 DNAMAN 软件进行同源序列比对, 结果 (图 2) 表明三者的同源性只有 54.74%。

用 NCBI 的蛋白质相似性比对检索数据库 (Blastp) 分析发现巴戟天 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 蛋白的氨基酸序列与中粒咖啡和小粒咖啡的 DXS 基因家族相似性程度最高, 其中 *MoDXS1* 与中粒咖啡 CcDXS1 (CDO98935.1) 和小粒咖啡 CaDXS1 (XP_027121155.1) 的相似性高达 97.49%, *MoDXS2-1* 与中粒咖啡 CcDXS3 (CDP04804.1) 的相似性为 80.08%, *MoDXS2-2* 与小粒咖啡 CaDXS2 (XP_027070828.1) 的相似性为 84.38%, 这说明 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2*

都属于植物 DXS 基因家族,但是三者又有所不同。从巴戟天、中粒咖啡和小粒咖啡的比对结果还可以看出,DXS 蛋白的 C 端相较于 N 端保守性更高,序列同源性差异主要来自于 N 端,而 N 端主要是 DXS 蛋白的质体转运肽所在区域。由 NCBI-CDD 数据库和 InterPro 在线软件的保守结构域分析可知巴戟天的 *MoDXS1* 蛋白都含有 3 个结构域: Transketolase1 (TK1), N-terminal domain 结构域; Transketolase-like, pyrimidine-binding domain 结构域; Transketolase2 (TK2), C-terminal domain 结构域。*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 蛋白却都只含有 2 个结构域: Transketolase-like, pyrimidine-binding domain 结构域和 Transketolase2 (TK2), C-terminal domain 结构域。这说明 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 蛋白都含有转酮酶保守结构域。结合 ExPASy-prosite 对 TK 酶的分类和分析结果(图 2)显示: *MoDXS1* 蛋白含有 2 个转酮醇酶功能位点,分别是位于 N 端属于 Transketolase1 (TK1) 的转酮醇酶功能位点(RSDIIFNVSKTGGHGLGSSLG)和位于 C 端属于 Transketolase2 (TK2) 的转酮醇酶功能位点(GSDGPTHCGSFDVAFLA),而 *MoDXS2-1* 蛋白含有的转酮醇酶功能位点(GSDGPTQCGAFDITFMS)和 *MoDXS2-2* 蛋白含有的转酮醇酶功能位点(GADGPTHCGAFDITYMA)都位于 C 端部分属于 Transketolase2 (TK2)。N 端的 TK1 中包含 1 个组氨酸残基,它的功能似乎与转酮醇酶催化过程中质子的转移有关。而位于 C 端的 TK2 中含有保守的酸性氨基酸残基,是整个转酮醇酶活性裂缝的一部分,可能与底物的结合有关。

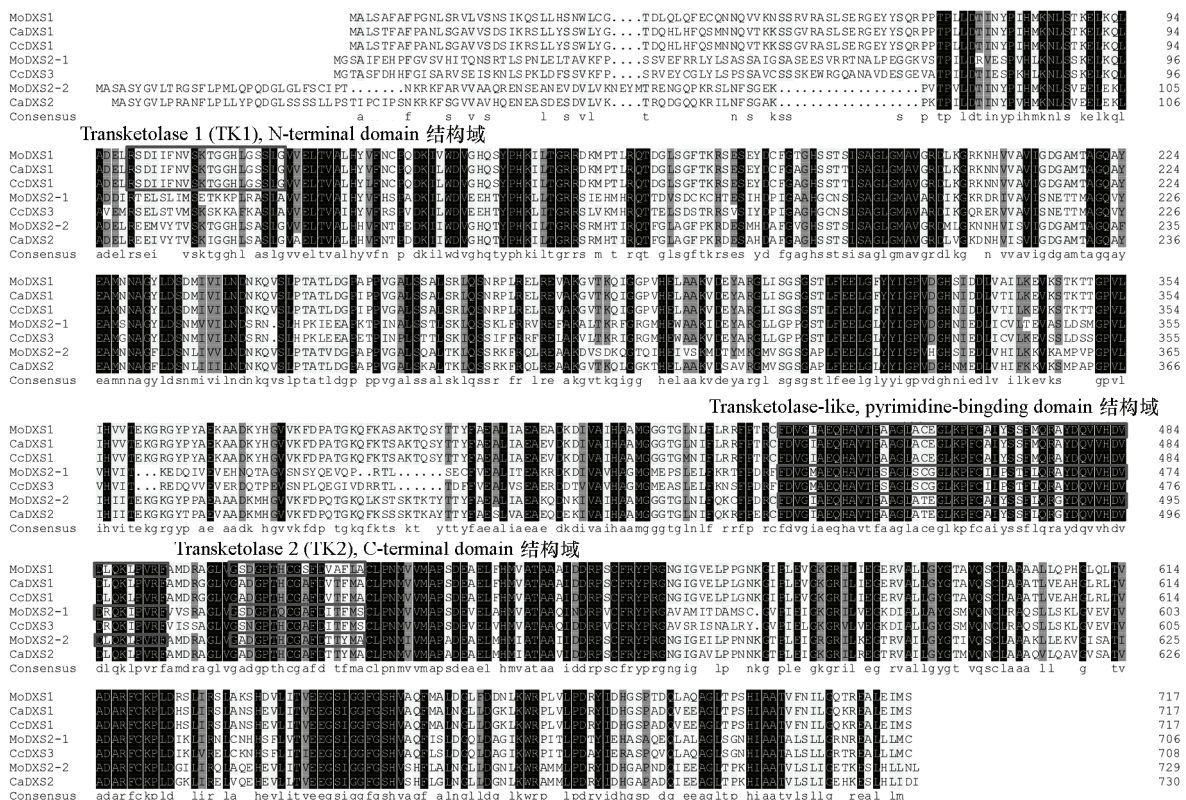


图 2 *MoDXS* 氨基酸序列与其他植物的 DXS 序列比对

Mo: 巴戟天; Ca: 小粒咖啡; Cc: 中粒咖啡。

Fig. 2 Multiple amino acid sequence alignments of DXS between *M. officinalis* and other plants

Mo: *Morinda officinalis*; Ca: *Coffea arabica*; Cc: *Coffea canephora*.

对 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 蛋白和其他 DXS 蛋白进行系统进化分析。结果（图 3）显示，*MoDXS1* 蛋白与中粒咖啡、小粒咖啡、烟草、苜蓿、拟南芥、银杏和水稻等的 DXS1 聚为一类；巴戟天 *MoDXS2-1* 与中粒咖啡、拟南芥、蓖麻和毛果杨的 DXS3 聚为一类；*MoDXS2-2* 与小粒咖啡、丹参、青蒿、毛果杨、蓖麻的 DXS2 聚为一类。*MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 从进化树的角度看亲缘关系较远，这说明即使同属巴戟天的 DXS 蛋白家族，其亲缘关系上还是有一定的距离。这一结果也再次验证了 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 蛋白三者之间同源相似性较低。

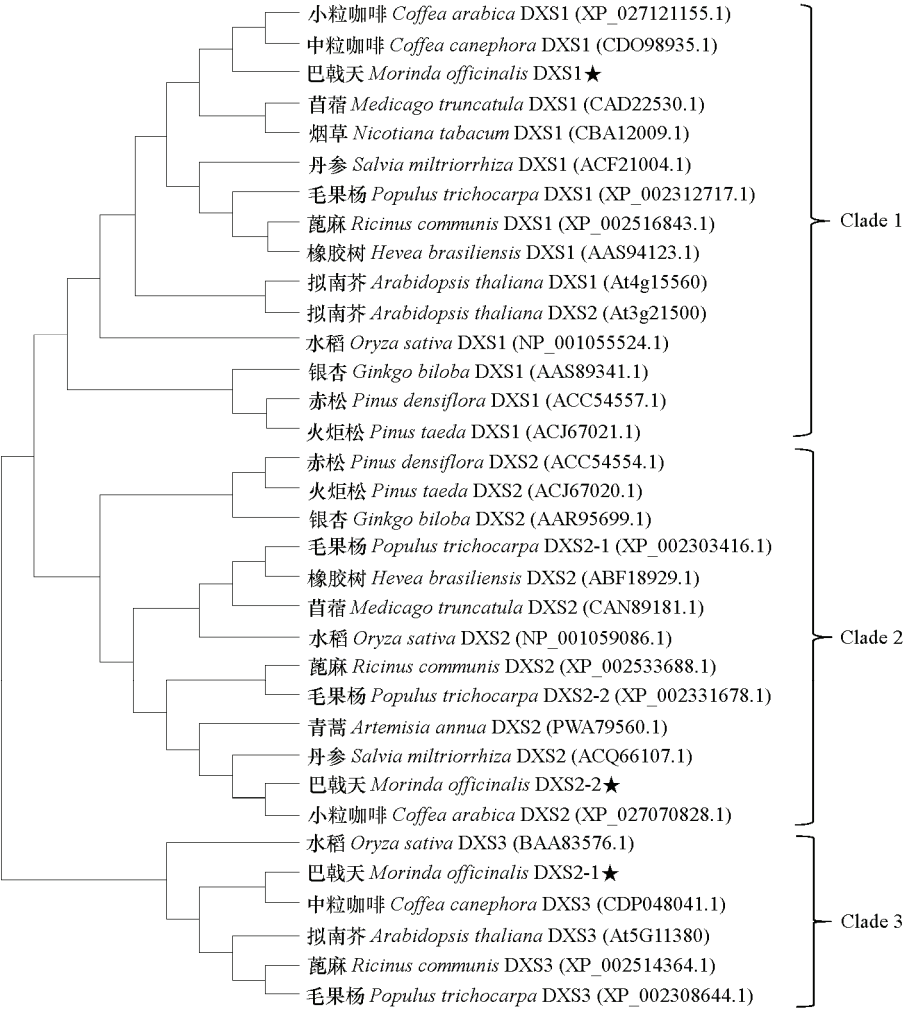


图 3 不同植物的 DXS 氨基酸序列的系统进化树分析
Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of different plants on DXS amino acid sequences

预测的 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 蛋白理化性质结果见表 2。结合 ProtScale 在线工具对亲水性和疏水性的预测结果显示，*MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 蛋白的 N 端部分序列都表现出亲水性，而两个基因的中心和靠近 C 端部分序列，疏水性氨基酸的比例偏高，整体趋向于亲水性。

表 2 MoDXS1、MoDXS2-1 和 MoDXS2-2 蛋白的理化参数

Table 2 Physical and chemical parameters of MoDXS1, MoDXS2-1, and MoDXS2-2 proteins

蛋白名称 Protein name	分子量/kD Molecular weight	等电点 pI	不稳定系数 Instability index	总平均疏水系数 Grand average of hydropathicity
MoDXS1	77.30	6.43	41.72	- 0.072
MoDXS2-1	77.07	6.18	46.82	- 0.013
MoDXS2-2	78.87	6.62	40.63	- 0.095

经在线工具预测 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 编码氨基酸序列中稀有密码子的比例分别为 11.42%、11.17%和 13.83%；分别含有 16、15 和 17 个可信度高的磷酸化位点。SignalP 在线分析软件结果显示：预测 MoDXS1、MoDXS2-1 和 MoDXS2-2 蛋白可能存在信号肽位点的 C、S 和 Y 值都小于 0.2，说明这 3 个蛋白不存在信号肽位点，属于非分泌型蛋白。TMHMM 跨膜分析软件结果显示 MoDXS1、MoDXS2-1 和 MoDXS2-2 蛋白全部在膜外，没有跨膜结构域，不属于跨膜蛋白。在线工具 SOPMA 对 MoDXS1、MoDXS2-1 和 MoDXS2-2 蛋白的二级结构预测结果见表 3。

表 3 MoDXS1、MoDXS2-1 和 MoDXS2-2 蛋白的二级结构预测

Table 3 Protein secondary structure prediction of MoDXS1, MoDXS2-1, and MoDXS2-2 proteins

蛋白二级结构 Protein secondary structure	α 螺旋 (H) Alpha helix (H)	β 折叠 (E) Extended strand (E)	β 转角 (T) Beta turn (T)	无规则卷曲 (C) Random coil (C)
MoDXS1	39.61	15.06	8.09	37.24
MoDXS2-1	39.80	16.15	6.09	37.96
MoDXS2-2	37.45	15.23	7.54	39.78

SWISS-MODEL 预测的 MoDXS1、MoDXS2-1 和 MoDXS2-2 蛋白三级结构显示，这 3 个蛋白主要是 α 螺旋和无规则卷曲组成。

2.3 亚细胞定位分析

由 WoLF PSORT 和 ChloroP 软件的分析预测结果可知：MoDXS1、MoDXS2-1 和 MoDXS2-2 蛋白可能都定位于叶绿体上，且 3 个蛋白的 N 端分别具有 55、46 和 41 个氨基酸残基的叶绿体转运肽。拟南芥原生质体中 pCAMBIA2300-35s-eGFP-MoDXS1/MoDXS2-1/MoDXS2-2 融合表达蛋白的亚细胞定位结果（图 4）显示：在 488 nm 激发光下可以观察到 3 个 MoDXS 蛋白在叶绿体上均有绿色荧

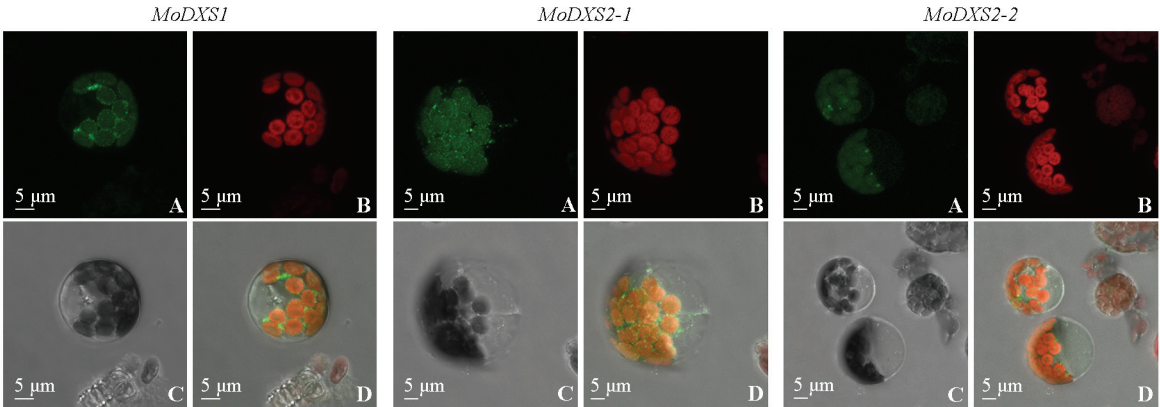


图 4 巴戟天 *DXS* 基因的亚细胞定位

A: 488 nm 激发光下 *MoDXS*-eGFP 的绿色荧光；B: 555 nm 激发光下叶绿体的自发荧光；C: 明场；D: 图像叠加。

Fig. 4 Subcellular localization of *MoDXS*-eGFP

A: Fluorescence microscope images of *MoDXS*-eGFP at 488 nm; B: Chlorophyll autofluorescence at 555 nm; C: Bright field; D: Merged image.

2.4 *MoDXS* 启动子区顺式作用元件分析

MoDSX-1

CACTAAGGCACTAGTCTCGCAGTTTAAACGAATTGGCCCTTCGTGCAGAGAGAAAGAAGGCAAGTTC
 AATTCTAGTGAAGCTGTTTTCGCGGCTGTACTGGATTTTCTATGTGGTTAGAAAGACTAAGAGCCTT
 CAGAATAGCCAGACAAAGCTGGAGTTTTCGCAAGTATGATCCTCGTGAATCGCCATGTTTGTGTTCACTG
 AGGCAAAATGATGAAGTGAGACAGTTGAAATATCCACTCCGTGGTGAATTCATTAAGTGAGAGATTAT
 TAATGACACATAAATTTGAGACAACTTTTCATATCTCTAATATTCACAGCAAGAACCTGACTTGGG
 AGTTTGTAGTCTCAAATATGCTGCAGCGTTATCTGGCTTCTTTATTTAGCAAGTTATATTTTAACTGTG
 CAGGCATTAAATTTTGTATTACTTATGCTCGGCTTACTCTGGACTGTATTATTCGGAGAGCTATACTT
 TTCTAACCTAAGGAAAAAGAGCTCTACCATGTTTCAGCCATTAAATTTGTGCAATTCAGTTG
 CGATTAGATACGGAGGCTTCTTGTGTTTATTGTGTTAAACATGTTGAATGAGTGCCTGTAGCTTTACAA
 TCCTTGAATGTTCCCATATCTTATGCATCAAGTCAACGAAAGATGTATGCTTTCGAGAAATCAGAC
 CAGCAGATTTGTTAGTGTATTAACCAATATTGTAATGGAATTCATTACCTTTGTATCCAGTACCTCGC
 CCTTTGCAATTCCTTTTAGAATAATAGAATTGAGCAAAATCAAGCCATGTTATGTCGCGAGAAATATA
 AGTCGCTGGAATGTTAGGTTTATGAATAGGAATTTGAGGGGTGGCTGTAGAAAACTGGAAGCGGTGTTG
 ACCATCATTAGTCAGTTTGGGAAGTTAGGCATTATCTGTTCAATTCGTCAAGTACGCCGTGAGCCG
 ATTGATCTTATCCATCTGTTTGAAGTCTATGAATGATCTTCGATAGCCATTGAATCTTGCATACCTT
 CTATTAAGGAAAGAAAGGCTCAACTTATAGTGGCTATGGATGAAATAACATCTCAGTTTTCTCTCA
 CTACTTTCAGCTCCACTCTACTTCAGTTTTCGCTGATTCAATTCAATTTGTCGAACGTAAATGTTGGGT
 TCCGTGATCTTTACATGATGCAGTCCAGTGCCACTGACTCGTGTTAATATTGTGTAGTGCCAAAATCTT
 GCTACGTAACTAGCAATTCACATGATCTGTTGTTGTAATGGGAATAAATTTGGCTGTGGGCAAAA
 TTTCTTGCTGGTTATCAAGTGGTAGTCTTCTCTTTTACATAAGTCCAAATCCACTGATAGATGTT
 TCTTATCTTTATCTCTCGCTGTCAATATACTTCAATGTTGATAGATATGATTCGGGCTAAATGACATT
 CATGGACATCATGCTCTGCATTCATTCAATCTTTTACCAACCTAATTTTCACATCCAAATACATGAA
 GAATCTCTTCAATATTTTACGTGTTTAAAAAGTACCCCAACATCTGATCAAGCAACATTGGACA
 TAGCTCACTCAATGCTGTTTATATAGTTCGGGATTTGCAAGTTATATCATAGATAGGCGCTACTTA
 ACGAGTACTTTTGTAGTCTGGTGCCTTAATCAACAAAGCAACATGTGAACATGCAATGACTTCATCC
 AGAAAACAATGGTCTATCTCTTCTGTGAAAAATTTGTTCTCAGATATTTGGGAGAAATCATATTTGCC
 ATGGCTACTGAATTAGTGGGTAGATGAAAGGCACGTCCTTCAATAGCACTAAAAATGAAGTCAACC
 ACAGCGAAATGAAAGAACTCACCATAAAGTGGGTTTAAATGAGGAATTGACACCAACACAGGGT
 AAATTACATTAACATCTCTATCTTCCTCAGCTTATCATATCTTTTCATCCATTTGGGATTTCTTCCAC
 GTGGCCCAATCAAAACATCTCTCTCAATTTTGAATATATACATTTTTTTTTGGGATGAATATTACAA
 TATGAGCTAGCATAAATGTGTTCAAGCTTTGCCTTTCTCAATAGCAATTTTTTCAGTCACTCTT
 CATTTCAGCAACATCCGTAAGATATCTCCGTTGCCATTCTCCTTCAATCATCAACATTATCAAAAT
 TCCGCTCAACACATCTTCCACCATATACAGAGTTTTTCTGTGTTCTCCTTCTCTTTTTTCTG
 GTCGGTTGTTTGGGTTTCTGAATATAGGTCACATGCTGTACTGCTGTTCCATCAGCACTGTG
 TTGAAGCTCTCGACGGTTGTTGATTGAACCCCTTAAATTTATTTGTAATGGGATTTCATCTTGGAACTT

MoDSX-2-2

AGTGAGAGAGCATAGGGGATATCATATTAGAAAAGTCGGTGAAATTTACGTTTAAAAATATTTTTA
 TGAGC-motif/CGTCA-motif/TGA-box
 TGTATTTGACGTGAATTTGTAATAAATAAATTTATTTAAAGATATAAAAAATATCTTAAAAAAGTC
 AAAATATATTTTGAACACATTCTACATATACGTAACCTTTTATGAAGCCATTTTAATGTCAAAATGAAGAC
 ATGAGATAGAGCTGTTGGTGGATGTCATGAGTGAAGTAACTAAGTGGTTCGAGATCGAAAT
 CTTTAAATACCAAAAAAGAAAGAAAAAATTAACCGTAAAGTGAAGCAATGTGTATGAGTTAACGTAC
 GTAATAACATATTTGCGAGTCATGATTAATTAACCCCTTGAATGTTGATTAGGAACCACTGAGTGTG
 ATGGTCAATTTATGATTAAAGCAAAAAAATATGATGACTATGTTTTCAAGACATTACTTGTGTGAG
 GTCACAGGGGCGACAGCAATGCCGCATTCAAATCTTGATGAATAAATTTGGACGAATACGAGCTCT
 ATCTCTGCTGAATCTTTATTTCTTCAAAATGATGTTGAAGAATTTCGAAAGCAATCTGCTGTTGTTG
 CCATGACCATCTCAATCTAGTATTTTATTTATACATAGTGAATACTAGAATCTAGTACAAACATAT
 AGTTCAGTGGCGGCTCTTTCAGCATATATATCAGTTTGGTGGGCATGATGCGATCGAGGCTGTCAA
 ATTATTAGATTAGAGAGACAGAGAGCTCTGATAGAATAATGTTGATTAATACTAAACCTTAGAGAG
 AATCGTGACAAACATAAAGAGTGATATAAATATGGATTGGTTTAAAAATGCGTTATTTTACATTATTAATA
 TGTATAAATGAGACATAGTAATAATCAATCTCTTTTATCTAGTATTATCAATCACTAAATTCGACTTT
 CACTTTGCTGATACATAAAGTGTATATATCTCTGTTGCGGAGGTTCTGTAGCCAGTATCGTTGTG
 CCATTCAGTTGAATTAATCTCCGTCGCTGAGAAAAATTTTTCAGGACCTTTTTTCTTTGAAG
 GACTATGCTTTTAAACACATGATCTCTTTTAAATGCAATTTATGCTTTTGGAGAAAT
 ATTATAACATAGAAGTTATTAGAAATTAATATTATTGAAAGCAGGAAAAATATAGGCTCTTTTGG
 AAAGCTCAATGATGCGACCCGACATCATAGCTACGACAAAAATAGCATGCAATCTTATCCATT
 TTTCTCTCTTCGTTGCTTCTCTTTTCAATCAATCAAAACAAAGGTTATGTTATGTTATCACC
 TGATTTGACTCGCATGGACAATAATGCTATGATGCTTTTAAATTTATAATCTAAATATATTGTTAA
 ACTCAATCTGCAATATATCATATAGTAACTTTGTTTATTTGTTGCCCCCAACAGTTTG
 TCTGTTTAGCTGATGTTCTGGGACCTTTTTTCTATATACAAACATTTCCCGCAGCATCAGCAGAA
 GCTGGCAGAACTTCTCTCATTGAAAAATGATTCTTTTGTGCTCTCTGCCAGCTCCAGTTTAA
 CAGTTCACAAATTCATCTGGTACGTGAGAGGAAGACGACACAGAAAAATTTGAGAAAGATG

Fig. 5 The sequence of upstream promoter element of *MoDXS1*, *MoDXS2-1*, and *MoDXS2-2* genes

由 plantCARE 在线软件分析结果可知, *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 都含有基本启动子元件 TATA-box 和 CAAT-box; 并且 3 个 DXS 基因含有多个光响应顺式作用元件, 如: AE-box、Box 4、Box II、G-box、GT1-motif、Gap-box、AAAC-motif、ATCT-motif、I-box、GATA-motif 和 TCT-motif; 厌氧诱导顺式作用元件 ARE; 还有与转录因子 MYB 和 MYC 结合位点有关的顺式作用元件; *MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 启动子区都含有与脱落酸 (ABRE)、生长素 (AuxRR-core、TGA-box) 和茉莉酸甲酯 (CGTCA-motif、TGACG-motif) 等激素诱导有关的响应元件; 除此之外, *MoDXS1* 启动子区还含有与分生组织表达相关的顺式作用元件 CAT-box, 赤霉素响应元件 P-box 和 GARE-motif, 与玉米醇溶蛋白调控相关的顺式作用元件 O₂-site, 与种子特异性调控有关的顺式作用元件 RY-element. *MoDXS2-2* 启动子区介导诱导子激活的顺式作用元件 AT-rich sequence, 以及与逆境胁迫有关的响应元件 LTR 和 TC-rich repeats. 由以上结果可知, *MoDXS* 的表达易受到外界光环境、低温及干旱等逆境胁迫响应的影响, 同时激素的诱导也对 *MoDXS* 的表达产生一定的作用。

2.5 *MoDXS* 基因相对表达量分析

MoDXS1、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 在巴戟天根、茎、叶中的相对表达量分析结果显示: *MoDXS1* 和 *MoDXS2-1* 在幼苗的根、茎、叶都有表达, 但表达程度不同, *MoDXS1* 在根中表达量最高, *MoDXS2-1* 在叶中的表达量显著大于根和茎; *MoDXS2-2* 在根中表达量最高, 而在茎和叶中表达量最低 (图 6)。

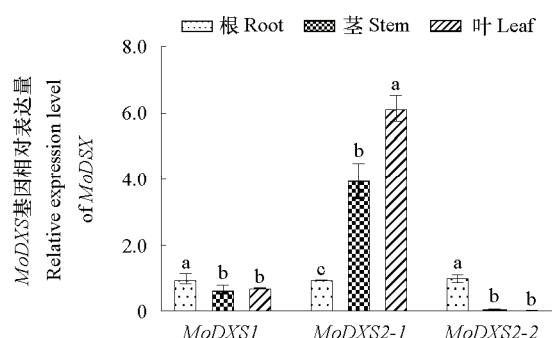


图 6 巴戟天不同组织中 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 基因的相对表达量

同一基因不同字母表示在不同组织中的表达量差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 Relative expression of *MoDXS1*, *MoDXS2-1*, and *MoDXS2-2* in different tissues from *Morinda officinalis*

In same gene, different letters indicate there are significant difference among different tissues ($P < 0.05$).

3 讨论

萜类化合物是植物界中广泛存在的一类次级代谢产物, 是由异戊二烯为结构单元组成的。活性的异戊二烯 (IPP 和 DMAPP) 的产生来自 MVA 途径和 MEP 途径 (孟楠 等, 2015)。近年来, 科研人员开发新的除草剂和抗菌药物以及提高药用植物有效成分大多是以 MEP 途径中相关的酶和基因作为靶标进行人为调控来实现的。MEP 生物合成途径主要在质体中进行, 其合成的产物包括萜类植物激素、类胡萝卜素、叶绿素 a 的支链 (植醇) 等化合物 (Phillips et al., 2008)。在 MEP 途径中从最初的代谢中间产物丙酮酸和 3-磷酸甘油醛到萜类化合物的骨架成分 IPP 或 DMAPP 大约需要 8 个步骤, 每个步骤都需要一种特定的酶, 大部分酶都是由单拷贝基因编码的, 而 DXS 作为 MEP 合

成途径的第一步反应的关键酶, 通常是由 DXS 家族编码的 (Cordoba et al., 2009)。DXS 蛋白的 N 端含有叶绿体转运肽, 其最终定位于叶绿体上, 主要催化丙酮酸和 3-磷酸甘油醛缩合, 从而得到中间代谢产物 DXP。现在已经有大量的研究将 DXS 作为类异戊二烯生物合成途径调控的候选基因, 如: 在拟南芥中过表达或者抑制 DXS 基因表达水平, 可以使不同的萜类化合物的产量增加或减少 (Estévez et al., 2001); 在过表达 DXS 基因的番茄转基因株系中, 类胡萝卜素的含量增加了 1.6 倍, 并且可以稳定遗传到下一代 (Eugenia et al., 2010)。

根据前人的报道可知, DXS 基因家族在不同植物中包含的数量不同, 如拟南芥 (Estévez et al., 2001; Lorenzo et al., 2013)、挪威云杉 (Phillips et al., 2007)、水稻 (Kim et al., 2005)、玉米 (Elizabeth et al., 2011)、土沉香 (Xu et al., 2014) 和青蒿 (Zhang et al., 2018) 有 3 个 DXS 基因; 苜蓿 (Michael et al., 2002)、雷公藤 (Tong et al., 2015) 只有 2 个 DXS 基因。对不同植物的 DXS 基因进行系统进化树分类, 一共分为 3 大类, 第 1 类 (clade 1): DXS 基因在很多植物的光合组织中高表达, 主要参与光合相关的萜类化合物的合成; 第 2 类 (clade 2): DXS 基因参与植物本身特异的萜类衍生物的合成过程。第 3 类 (clade 3): DXS 基因只在少数植物的特定组织中表达, 说明这些 DXS 基因有特定的功能, 但是具体的功能还需要再做深入的研究 (Cordoba et al., 2009; Lorenzo et al., 2013)。对多种植物的 DXS 蛋白进行功能结构域预测发现: clade 1 中所有的 DXS 蛋白都含有 TK1 和 TK2 转酮醇酶功能位点; clade 2 中一部分 DXS 蛋白同时含有 TK1 和 TK2 转酮醇酶功能位点, 剩下一部分 DXS 蛋白只含有 1 个 TK2; clade 3 中一部分 DXS 蛋白只含有 1 个 TK2 转酮醇酶功能位点, 剩下一部分 DXS 蛋白没有预测到含有 TK1 和 TK2。巴戟天的 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 蛋白分别被归为 clade 1、clade 3 和 clade 2, 且 *MoDXS1* 蛋白含有 TK1 的转酮醇酶功能位点 (RSDIIFNVSKTGGHLGSSLG) 和 TK2 的转酮醇酶功能位点 (GSDGPTHCGSFdVAFLA), *MoDXS2-1* 蛋白含有 TK2 转酮醇酶功能位点 (GSDGPTQCGAFDITFWS), *MoDXS2-2* 蛋白含有 TK2 转酮醇酶功能位点 (GADGPTHCGAFDITTYMA)。对 DXS 蛋白含有的 TK 转酮醇酶功能位点的数量和种类方面的预测在一定程度上与 DXS 基因系统进化树分类结果一致。也有文献中提到植物 DXS 基因进化为 3 个独立的分支的时间比单双子叶植物物种多样性的发育时间要早 (Cordoba et al., 2009)。

根据 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 在巴戟天根、茎、叶中的相对表达量和系统进化树分析可知, *MoDXS1* 的相对表达量在根、茎、叶中有显著差异, 其在根中的表达量最高。clade 1 中的 DXS 主要参与光合相关的萜类化合物的合成的过程中, *MoDXS1* 在根中的表达量显著高于叶和茎组织, 而根并不是与光合相关的萜类化合物合成的主要部位, 这与 *MoDXS1* 被划分到 clade 1 的理论依据不一致 (Cordoba et al., 2009; Lorenzo et al., 2013)。*MoDXS2-1* 在 3 个组织中都显著表达, 且叶中的相对表达量分别是茎和根的 1.5 倍和 6 倍, 前人认为 clade 3 中的 DXS 只在少数植物的特定组织中表达, 这与其被划分到 clade 3 的依据 (Cordoba et al., 2009; Lorenzo et al., 2013) 也不相符。*MoDXS2-2* 只在根中显著表达, 且主要参与巴戟天根部特异的蒽醌类的合成过程, 这与其被划分到 clade 2 的依据 (Cordoba et al., 2009; Lorenzo et al., 2013) 一致。在接下来的研究中, 可以用建立好的巴戟天的组培转化体系, 通过组织化学定位检测的方式, 进一步验证 *MoDXS1*、*MoDXS2-1* 和 *MoDXS2-2* 的组织表达模式。

References

Cai Yue-qin, Liu Yi-min, Fan Li-li, Du Rong-qi, Rong Jun-dong, Zheng Yu-shan. 2019. Optimization of extraction of polysaccharide from *Morinda*

- officinalis* by response surface methodology. *Journal of Forest and Environment*, 39 (3): 303 – 309. (in Chinese)
- 蔡月琴, 刘艺敏, 凡莉莉, 杜溶訖, 荣俊冬, 郑郁善. 2019. 响应面法优化巴戟天多糖提取工艺. *森林与环境学报*, 39 (3): 303 – 309.
- Cordoba Elizabeth, Salmi Mari, León Patricia. 2009. Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2933 – 2943.
- Elizabeth Cordoba, Helena Porta, Analilia Arroyo, Carolina San Rom. 2011. Functional characterization of the three genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in maize. *Journal of Experimental Botany*, 62: 2023 – 2038.
- Estévez J M, Cantero A, Reindl A, Reichler S, Leon P. 2001. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 22901 – 22909.
- Eugenia M.A-Enfissi, Paul D-fraser, Lois L-maria, Albert Boronat. 2010. Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate - forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 3: 17 – 27.
- Fan Hong-hong, Wu Qiu-ju, Wang Xiang, Wu Lin-song, Cai Yong-ping, Lin Yi. 2016. Molecular cloning and expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in *Dendrobium officinale*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 125: 381 – 385.
- Han Ying-shan, Heijden Rob-van-der, Alfons W M-lefeber, Cornelis Erkelens, Robert Verpoorte. 2002. Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of *Cinchona* ‘Robusta’ proceeds via the ethylerythritol 4-phosphate pathway. *Phytochemistry*, 59 (1): 45 – 55.
- Han Ying-shan, Heijden Rob-van-der, Robert Verpoorte. 2001. Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of the Rubiaceae. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 67: 201 – 220.
- Han Ying-shan, Sittiruk Roytrakul, Marianne C-verberne, Heijden Robert-van-der, Huub J M. 2003. Cloning of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Morinda citrifolia* and analysis of its expression in relation to anthraquinone accumulation. *Plant Science*, 164: 911 – 917.
- He Yu-qiong. 2019. Studies on effects and mechanism of iridoid glycoside and anthraquinone compounds from *Morinda officinalis* radix for regulating bone metabolism [M. D. Dissertation]. Shanghai: The Second Military Medical University. (in Chinese)
- 何玉琼. 2019. 巴戟天环醚萜苷及蒽醌类成分调节骨代谢的作用及机制研究 [硕士论文]. 上海: 海军军医大学.
- Huang Zhen-zhen. 2013. Studies on chemical constituents and their bioactivities of *Morinda officinalis* How [M. D. Dissertation]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine. (in Chinese)
- 黄珍珍. 2013. 巴戟天的化学成分及其生物活性研究 [硕士论文]. 广州: 广州中医药大学.
- Kim Bo-ra, Kim Soo-un, Chang Yung-jin. 2005. Differential expression of three 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase genes in rice. *Biotechnology Letters*, 27: 997 – 1001.
- Li Mei-ying, Shao Ling, Lin Pei-hua, Li Yi-min, Guo Zhen-zhao, Zhu Yu-kang. 2020. Effect of planting pattern on the growth of *Morinda officinalis*. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 28 (2): 163 – 170. (in Chinese)
- 李美映, 邵玲, 林培华, 李伊敏, 郭珍招, 朱宇康. 2020. 种植模式对巴戟天生长的影响. *热带亚热带作物学报*, 28 (2): 163 – 170.
- Lorenzo Carretero-paulet, Albert cairo, David Talavera, Anderu Saura, Santiago Imperial, Manuel Rodriguez-concepcion, Narciso Campos. 2013. Functional and evolutionary analysis of *DXLI*, a non-essential gene encoding a 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase like protein in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 524: 40 – 53.
- Lu Xu, Zhang Ling, Zhang Fang-yuan, Jiang Wei-min, Shen Qian, Zhang Li-da, Lv Zong-you, Wang Guo-feng, Tang Ke-xuan. 2013. *AaORA*, a trichome-specific AP2/ERF transcription factor of *Artemisia annua*, is a positive regulator in the artemisinin biosynthetic pathway and in disease resistance to *Botrytis cinerea*. *New Phytologist*, 198: 1191 – 1202.
- Meng Nan, Liu Bin, Pan Qiu-hong. 2015. Research advance on biosynthesis and regulation of norisoprenoids in grape berry. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (9): 1673 – 1682. (in Chinese)
- 孟楠, 刘斌, 潘秋红. 2015. 葡萄果实降异戊二烯类物质合成调控研究进展. *园艺学报*, 42 (9): 1673 – 1682.
- Michael Herbert-waiter, Joachim Hans, Dieter Strack. 2002. Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *Plant Journal*, 31: 243 – 254.
- Pan Xi-chun, Chen Min, Liu Yan, Liao Zhi-hua. 2007. Cloning of deoxyxylulose-5-phosphate synthase gene from tomato and its color

- complementation in *E. coli*. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (2): 371 - 376. (in Chinese)
- 潘夕春, 陈 敏, 刘 颜, 廖志华. 2007. 番茄 *dxs* 基因的克隆及在大肠杆菌中的颜色互补. *园艺学报*, 34 (2): 371 - 376.
- Phillips M A, Walter M, Ralph S, Dabrowska P, Luck K, Uros E, Boland W, Strack D, Rodríguez-Concepción M, Bohlmann J, Gershenzon J. 2007. Functional identification and differential expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in induced terpenoid resin formation of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Molecular Biology*, 65 (3): 243 - 257.
- Phillips M A, León P, Boronat A, Rodríguez-Concepción M. 2008. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends in Plant Science*, 13 (12): 619 - 623.
- Quevedo Carla, Perassolo María, Alechine Eugenia, Corach Daniel, Giulietti Ana María, Talou Julián Rodríguez. 2010. Increasing anthraquinone production by overexpression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase in transgenic cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Biotechnology Letters*, 32: 997 - 1003.
- Sun Jun, Chen Gui-xin, Ye Nai-xing, Lü Shi-heng, Liu Zhi-qin, Huang Wei, Lin Zhi-da. 2014. Cloning and expression analysis of deoxyxylulose-5-phosphate synthase gene related to aroma from *Jasminum sambac* and isolation of its promoter. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (6): 1236 - 1244. (in Chinese)
- 孙 君, 陈桂信, 叶乃兴, 吕恃衡, 刘志钦, 黄 玮, 林志达. 2014. 茉莉花香气相关基因 *JsDXS* 及其启动子的克隆与表达分析. *园艺学报*, 41 (6): 1236 - 1244.
- Tong Yu-ru, Su Ping, Zhao Yu-jun, Zhang Meng, Wang Xiu-juan, Liu Yu-jia, Zhang Xia-nan, Gao Wei, Huang Lu-qi. 2015. Molecular cloning and characterization of *DXS* and *DXR* genes in the terpenoid biosynthetic pathway of *Tripterygium wilfordii*. *Int J Mol Sci*, 16: 25516 - 25535.
- Xie De-jin, Ye You-jie, Yang De-ming, Zhang Ya-xin, He Tian-you, Chen Li-guang, Zheng Yu-shan. 2020. Cloning and analysis of the *DXR* gene and its promoter in *Morinda officinalis*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 55 (2): 335 - 344. (in Chinese)
- 谢德金, 叶友杰, 杨德明, 张娅欣, 何天友, 陈礼光, 郑郁善. 2020. 巴戟天 *MoDXR* 基因及其启动子的克隆与分析. *药学报*, 55 (2): 335 - 344.
- Xu Yan-hong, Liu Juan, Liang Liang, Yang Xin, Zhang Zheng, Gao Zhi-hui, Sui Chun, Wei Jian-he. 2014. Molecular cloning and characterization of three cDNAs encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase in *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. *Plant Physiology & Biochemistry*, 82: 133 - 141.
- Yang Fei. 2016. Studies on chemical constituents of the roots *Morinda officinalis* How [M. D. Dissertation]. Tianjin: Tianjin University. (in Chinese)
- 杨 菲. 2016. 巴戟天的化学成分研究 [硕士论文]. 天津: 天津大学.
- Zhang Fang-yuan, Liu Wan-hong, Xia Jing, Zeng Jun-lan, Xiang Li-en, Zhu Shun-qin, Zheng Qiu-min, Xie He, Yang Chun-xian, Chen Min, Liao Zhi-hua. 2018. Molecular characterization of the 1-deoxy-D-Xylulose 5-phosphate synthase gene family in *Artemisia annua*. *Frontiers in Plant Science*, 9: 952 - 963.
- Zhou Wei, Huang Fen-fen, Li Shen, Wang Yang, Zhou Cong-cong, Shi Min, Wang Jing, Chen Ying-jie, Wang Yao, Wang Hui-zhong, Kai Guo-yin. 2016. Molecular cloning and characterization of two 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase genes involved in tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Molecular Breeding*, 36: 124 - 135.