

白木香细胞色素 P450 基因 *AsCYP71D1* 的克隆及表达分析

高世玺¹, 戎梅¹, 彭俊祥¹, 徐艳红^{1*}, 魏建和^{1,2*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院, 药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 濒危药材繁育国家工程实验室, 北京 100193; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院, 药用植物研究所海南分所, 海南省南药资源保护与开发重点实验室, 国家中医药管理局沉香可持续利用重点研究室, 海南海口 570311)

摘要: 细胞色素 P450 (cytochrome P450 monooxygenases, CYP450) 是一类超基因家族编码的含有血红素的氧化酶类, 分布于各种需氧生物体内, 广泛参与萜类、生物碱、黄酮、脂肪酸等的生物合成。本研究依据课题组前期测得白木香转录组数据库中一个 CYP450 单加氧酶基因的部分转录本序列设计引物, 利用逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 和 cDNA 末端快速扩增 (rapid-amplification of cDNA ends, RACE) 技术克隆该基因的全长 cDNA 序列; 并对其组织表达及亚细胞定位进行了研究。结果发现, 该基因全长 cDNA 序列为 1 920 bp, 其中 5'-非翻译区 (untranslated region, UTR) 为 88 bp, 3'-UTR 为 344 bp 并具有 21 bp 的 polyA 尾, 开放阅读框为 1 488 bp, 编码 495 个氨基酸。序列比对发现该蛋白属于 CYP450 家族的 CYP71D 家族成员, 命名为 *AsCYP71D1*。组织表达分析的结果显示, *AsCYP71D1* 基因主要在茎中表达。进一步洋葱表皮中亚细胞定位显示, *AsCYP71D1* 编码的蛋白在细胞质、细胞核及细胞膜上都有表达。本研究为后续深入研究其在沉香倍半萜合成途径的功能奠定了基础。

关键词: 白木香; 倍半萜; 细胞色素 P450; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)10-3123-07

Cloning and expression analysis of cytochrome P450 *AsCYP71D1* from *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg

GAO Shi-xi¹, RONG Mei¹, PENG Jun-xiang¹, XU Yan-hong^{1*}, WEI Jian-he^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education & National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine & Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Agarwood Sustainable Utilization, Hainan Branch of the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Haikou 570311, China)

Abstract: Cytochrome P450 (CYP450) is a kind of superfamily oxidase containing heme, which is distributed in various aerobic organisms. They are widely involved in the biosynthesis of terpenoids, alkaloids, flavonoids, fatty acids, etc. In this study, the full-length cDNA sequence of a P450 was cloned by reverse transcription-PCR (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology, with the specific primers that designed according to the sequence of a transcript annotated as P450 from the *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg transcriptome database. The tissue expression and subcellular localization were also studied. The full-length cDNA of the cloned P450 gene is 1 920 bp, with 88 bp 5'-untranslated region (UTR), 344 bp 3'-UTR and a 21 bp polyA tail, and 1 488 bp

收稿日期: 2023-04-03; 修回日期: 2023-07-07.

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (7222286); 国家自然科学基金项目 (81573525); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程--重大协同创新项目 (2021-1-12M-032).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-57833359, 86-10-57833358, E-mail: xuyanhong99@163.com; wjianh@263.net

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0404

open reading frame (ORF), encoding 495 amino acids. Sequence alignment revealed that the protein belonged to CYP71D family of cytochrome P450 family, and named *AsCYP71D1*. Tissue expression analysis indicated that *AsCYP71D1* was mainly expressed in stem. Further subcellular localization of onion epidermis showed that *AsCYP71D1* was expressed in cytoplasm, nucleus and cell membrane. This study will provide a foundation for further research on its function in agarwood sesquiterpene biosynthesis.

Key words: *Aquilaria sinensis*; sesquiterpene; cytochrome P450; gene clone; expression analysis

细胞色素 P450 (cytochrome P450 monooxygenases, CYP450) 是一类超基因家族编码的含有血红素的氧化酶类, 分布于各种需氧生物体内。在植物体内催化多种初生和次生代谢反应, 参与萜类、生物碱类、脂肪酸、甾醇类、植物激素、信号分子等的合成与代谢反应^[1,2]。CYP450 具有多种催化机制, 对多种底物表现出催化活性, 参与的反应包括羟基化、环氧化和脱烷基化反应等^[3,4]。自 1969 年, Frear 等^[5]在棉花中首次发现 CYP450 以来, 大量 P450 家族基因被鉴定出来。然而, 由于植物 P450 通常丰度很低, 不稳定且难以提纯, 使基因克隆及功能研究受到阻碍, 要从 P450s 超基因家族中, 鉴定到参与次生代谢途径的特异 P450 仍然具有极大的难度和挑战性。

植物中 P450 参与许多萜类化合物的生物合成。在单萜类衍生物中, CYP450 催化烯丙基的羟基化^[6]; 二萜类衍生物如植物生长调节剂赤霉素的生物合成途径中, 由内-贝壳杉烯生成醛基-GA12 的过程有 5 个连续的步骤都由 P450 催化^[7]; 在三萜皂苷的合成中, 更是有多个 P450 基因的参与^[8]。P450 还参与多种植物中倍半萜的氧化生成, 棉花中的 CYP706B1 具有 (+) δ -杜松烯-8-羟化酶活性, 催化棉酚生物合成的第二步反应, 是迄今为止第一个被分离的植物倍半萜羟化酶^[9]。另外, α -barbatene 羟化酶 CYP706A3^[10]、檀香烯氧化酶 CYP76F39v1 和香柠檬烯氧化酶 CYP76F37v1^[11] 也是催化倍半萜氧化的酶类。

沉香是沉香属白木香等物种由伤害诱导产生的含树脂木材, 是珍稀濒危南药和高价值的世界性资源。倍半萜和色酮类物质是沉香主要成分^[12-15]。在合成途径中, 倍半萜合酶催化 FPP 形成萜烯类中间产物, 然而, 沉香倍半萜终产物多为醇、酮类化合物, 说明萜烯类中间产物形成后下游还要经过一步或多步氧化修饰过程, 也就是需要加氧酶的参与才能形成沉香倍半萜终产物。CYP450 家族蛋白可能参与沉香倍半萜合成的下游氧化步骤, 但迄今沉香属植物中 CYP450 的研究还鲜有报道。

为揭示伤害诱导沉香形成的分子机制, 课题组前期利用 454 测序技术对白木香转录组进行了分析^[16]。后续重点关注了沉香倍半萜的生物合成与调控相关基

因, 分析了 CYP450 基因响应 MeJA 处理的表达特性, 发现序列 Cluster57402.seq. Singlet1 受 MeJA 诱导表达, 推测其可能参与沉香倍半萜的合成。本研究对该基因的部分 cDNA 片段进行了全长序列克隆, 并对其组织表达特性和编码蛋白的亚细胞定位进行研究, 为进一步揭示其功能及解析沉香倍半萜的生物合成途径奠定基础。

材料与方法

试验材料及处理 中国医学科学院药用植物研究所温室栽培的健康三年生白木香由中国医学科学院药用植物研究所魏建和研究员鉴定, 用酒精消毒后的砍刀取生长良好的根、茎、叶, 取样后迅速放入液氮中冷冻, 置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

菌株、载体和试剂 瞬时表达载体 pAN580 为本实验室保存; 测序载体 pEASY-Blunt Simple 和大肠杆菌感受态 Trans-T1 均购自北京全式金生物技术有限公司; RNA 提取纯化试剂盒购于 Aidlab 公司; Super SMART™ PCR cDNA 合成试剂盒、Advantage® 2 PCR 试剂盒均购自 Clontech 公司; MMLV 逆转录酶、Oligod (T)₁₈·2×SYBR Premix Ex Taq™ *SpeI/BamHI* 和 T4 连接酶均购自 TaKaRa 公司。

RNA 提取 利用 RNA 提取纯化试剂盒提取总 RNA。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 分光光度计 NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, USA) 测定 RNA 浓度。

cDNA 第一链的合成 cDNA 末端快速扩增法 (rapid-amplification of cDNA ends, RACE) cDNA 的合成: 取约 2 μ g RNA 利用 Super SMART™ PCR cDNA 合成试剂盒进行反转录, 利用 Advantage® 2 PCR 试剂盒扩增。实时荧光定量 PCR 分析样品的 cDNA 的合成: 取约 1 μ g RNA, 以 MMLV 为逆转录酶, 以 oligod (T)₁₈ 为引物, 反转录合成 cDNA 第一链。

5'-RACE 和 3'-RACE 454 测序得到的 unigene (Cluster57402.seq. Singlet1) 预测为含部分开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列的 CYP450 基因, 属于 CYP71D 亚族, 序列比对发现 ORF 5' 和 3' 端都不完整。

根据已知的 ORF 序列片段, 利用 primer5.0 软件设计特异性引物 (表 1), 进行 5'-RACE 和 3'-RACE。RACE 方法参照文献^[17,18]。将 RACE 测序结果与 454 测序结果拼接, 得到能够完整翻译的基因全长。RACE 用到的引物见表 1。

Table 1 Primers information. LD-PCR: Long distance-PCR; qRT-PCR: Quantitative real-time PCR

Purpose	Primer sequence (5'→3')
5'/3'-RACE	UPM-S: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
	UPM-L: 5'-ctaatacgactcactatagggcAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
	5'-f1: GACTTGTTTCAGCGATTTCAGGGGACG
	5'-f2: GGTGGAGGTTACCTATCAGGGGCAGC
	3'-f1: TCCCAGCCAAGACCCAAGTCATAGTG
	3'-f2: GGAGGAGGATTGCCCCTGGGATTG
LD-PCR	QCf: ATGGAGCAGCAATTCTTTTCATCTC
	QCr: TCAGGTAATGTTAGGAACCAAAAAGC
qRT-PCR	RT-f: GAAGAAAAGCCCGCTTGATAAG
	RT-r: TAGATGATGTTTCAGCCCCACC
Internal control	GAPDH-f: CTGGTATGGCATTCCGTGTA
	GAPDH-r: AACCACATCCTCTTCGGTGTGA

长距离 PCR (long-distance PCR, LD-PCR) 扩增 根据拼接的结果设计 LD-PCR 引物 (表 1), 以反转录的单链 cDNA 为模板, PCR 验证拼接序列的正确性。扩增程序为 94 °C 预变性 5 min; 然后 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物电泳检测、回收、克隆和测序验证。

实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 为了明确 *AsCYP71D1* 基因在不同组织及不同伤害处理下的表达特性, 利用 qRT-PCR 进行表达量的检测。仪器采用伯乐的 CFX96TM C1000 qRT-PCR 检测系统。反应体系为: 2×SYBR Premix Ex Taq™ 5 μL; 正反向引物浓度均为 0.25 μL; cDNA 模板 0.3 μL; 加水补足至 10 μL, 每个反应体系至少重复 3 次。扩增程序如下: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 40 个循环。qRT-PCR 反应均以三磷酸甘油醛脱氢酶基因 (*GAPDH*) 为内参^[19]。

***AsCYP71D1*-GFP 瞬时表达载体的构建及转化** 在 *AsCYP71D1* ORF 两端分别设计含有 *SpeI* 和 *BamHI* 位点的 PCR 引物, 扩增 *AsCYP71D1* 全长编码区。PCR 产物回收后连接测序载体 pEASY-Blunt Simple。对测序正确的克隆提取质粒, 用 *SpeI/BamHI* 双酶切回收目的片段, 用 T4 连接酶与同时双酶切回收的表达载体 pAN580 片段连接。将连接产物转化大肠杆菌感受态 Trans-T1, 得到的单克隆分别进行菌液 PCR 和酶切 2 种方法鉴定。阳性克隆为构建正确的 pAN580-*AsCYP71D1* 表达载体。构建正确的质粒基因枪法转化洋葱表皮, 黑暗培养 16 h 后激光显微镜观察。

结果与分析

1 *AsCYP71D1* 基因的 5'/3'-RACE 及全长 cDNA 的克隆

根据已知序列, 设计了基因特异引物 5'-f1 和巢式引物 5'-f2, 进行 5'-RACE 实验。扩增结果见图 1, 第一轮 PCR 得到了弥散条带 (图 1A 条带 1), 随后以第一轮 PCR 扩增产物为模板, 进行第二轮巢式 PCR, 得到一条清晰的条带 (图 1A 条带 2)。3'-RACE 步骤同上, 结果见图 1B 条带 3 和条带 4。将第二次的条带回收, 连接到 pMD19-T 载体, 并克隆测序。结果表明, 测序序列和已有的序列有重叠片段, 确认该克隆片段为目的基因的 5'/3'延伸序列。将两端 RACE 片段与已知中间片段拼接后得到含有完整 ORF 的全长 cDNA 序列, 其 5'-非翻译区 (untranslated region, UTR) 为 88 bp, 3'-UTR 为 344 bp 并具有 21 bp 的 polyA 尾, ORF1 488 bp, 编码 495 个氨基酸。为进一步验证拼接序列的可靠性, 根据拼接的 ORF 序列, 设计 LD-PCR 引物, 结果扩增出了 1 488 bp 的特异条带 (图 1C 条带 5), 测序结果与拼接序列完全一致。将该基因命名为 *AsCYP71D1*, GenBank 登录号为 OP581932。

2 *AsCYP71D1* 的生物信息学分析

利用 ExPASy Proteomics Server 的在线软件 ProtParam (<http://www.cn.expasy.org/tools/protparam.html>)

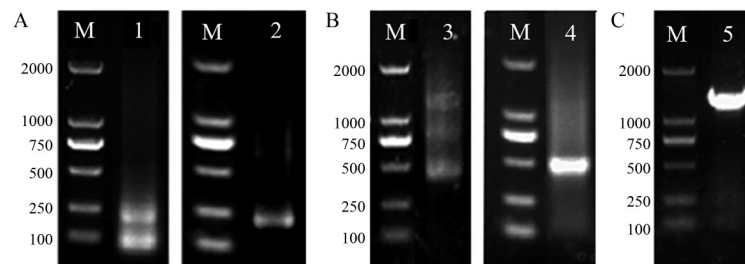


Figure 1 Amplification and detection of *AsCYP71D1* rapid-amplification of cDNA ends (RACE) and open reading frame (ORF). A: Product of 5' race (M-DL2000 DNA Marker; 1-the first PCR product; 2-the nest PCR product); B: Product of 3' race (M-DL2000 DNA Marker; 3-the first PCR product; 4-the nest PCR product); C: 5-Product of *AsCYP71D1* ORF

对 *AsCYP71D1* 蛋白的理化性质进行预测分析。推测其分子式为 $C_{2504}H_{3957}N_{679}O_{720}S_{17}$, 分子质量为 55.6 kD, 带正电残基 (Asp+Glu) 为 59, 负电残基 (Arg+Lys) 为 59, 脂肪系数为 92.81, 等电点 pI 7.17, 该蛋白的不稳定系数为 39.88, 为稳定性蛋白, 平均亲水性系数为 -0.157, 预测该蛋白为亲水蛋白。

NCBI BLAST 在线比对显示, *AsCYP71D1* 氨基酸序列与来自茶树 (*Camellia sinensis*)、木薯 (*Manihot esculenta*) 以及夏栎 (*Quercus robur*) 中的蛋白 (GenBank 登录号分别为 XP_028065313.1、XP_021603267.1、XP_050246566.1) 序列一致性最高, 达到 73% 以上, 推测具有相似功能。为了预测白木香 *AsCYP71D1* 的生物学功能, 利用 DNAMAN 软件将其氨基酸序列和检索到的与其序列一致性最高的其他氨基酸序列进行多重序列比对 (图 2), 发现蛋白序列具有高度的保守性, 均具有血红素结合域 FxxGxRxCxG、电子传递通道残基 PERF 和 K 螺旋中的 ExxR 残序, 序列一致性大于 55%, 说明 *AsCYP71D1* 属于 CYP71D 亚家族。然而, 结果中序列一致性较高的蛋白均未有功能验证的报道, 其具体催化功能仍需进一步实验验证。图 3 所示为由不同物种的 16 个 P450 蛋白构建的系统发育树, *AsCYP71D1* 编码的蛋白与木薯来源的 CYP71D10 (GenBank number: XP021603267.2) 聚为一支, 说明其亲缘关系较近, 进

一步证明 *AsCYP71D1* 属于 CYP71D 亚家族。但与其他 CYP71D 家族成员相距较远, 暗示其可能还有区别于其他 CYP71D 家族成员的特殊功能。

3 *AsCYP71D1* 基因的组织表达特异性分析

利用实时荧光定量 PCR 检测 *AsCYP71D1* 基因的组织表达特异性, 结果表明该基因在茎中的表达量最高, 其次是叶片、花和根中 (图 4), 说明 *AsCYP71D1* 可能主要在茎中发挥生物学功能。白木香受到伤害后主要在茎中合成倍半萜和色酮类化合物, 推测 *AsCYP71D1* 除了可能参与倍半萜的生物合成外, 还可能与植物的生长发育密切相关。

4 *AsCYP71D1*-GFP 瞬时表达载体的构建

菌液 PCR 鉴定 (图 5A) 及双酶切鉴定 (图 5B) 结果表明, *AsCYP71D1* 基因已连接到表达载体 pAN580 上, 进一步经过测序验证该瞬时表达载体构建是正确的。

5 *AsCYP71D1*-GFP 质粒轰击洋葱表皮及荧光观察

将构建好的重组质粒 pAN580-*AsCYP71D1*-GFP 与金粉微载体混合制成金粉-DNA 的复合体。1.1 kPa 压力下, 在基因枪的轰击作用下, 将质粒快速转入 MS 培养的洋葱表皮细胞, 进行 16~24 h 的黑暗培养。在激光共聚焦显微镜蓝色光激发下观察, 发现洋葱表皮细胞核和细胞膜都有很强的绿色荧光发出 (图 6), 证明 *AsCYP71D1* 定位在细胞膜、细胞核和细胞质中。

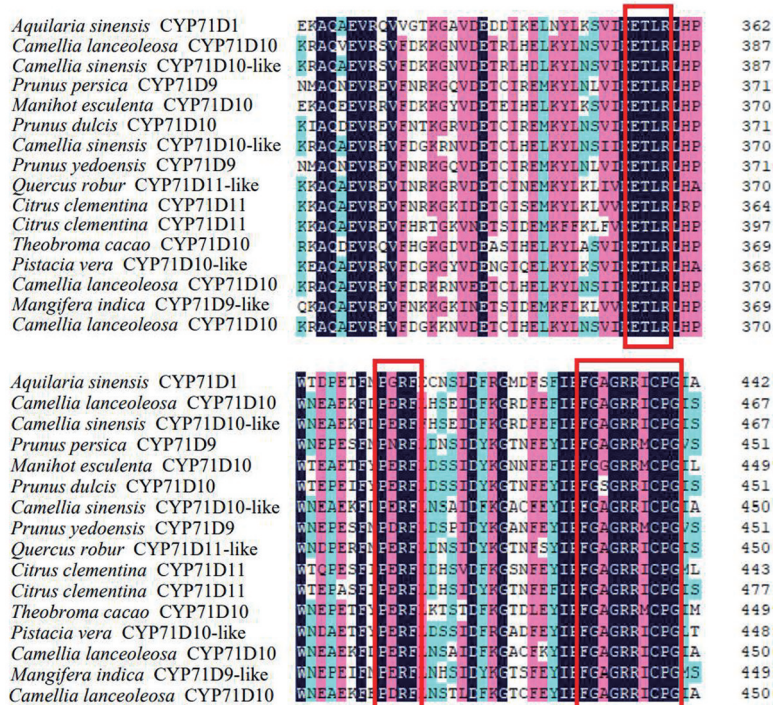


Figure 2 Alignment of the deduced amino acid sequence of *AsCYP71D1* with CYP450s from other plants. Black shading indicates amino acid identities, red and blue shading indicates amino acid with different similarity. The conserved domain of *AsCYP71D1* protein are shown with red boxes

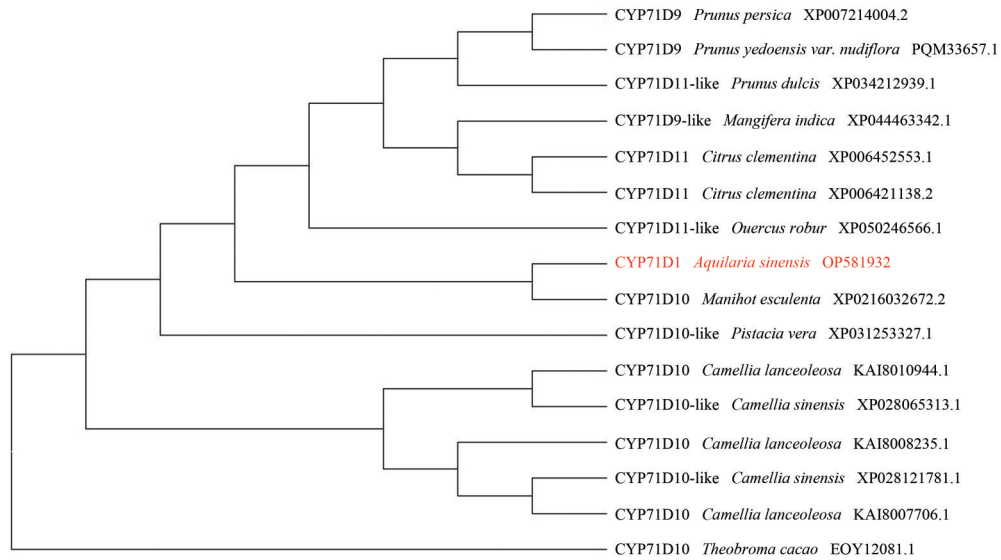


Figure 3 The phylogenetic tree analysis of *AsCYP71D1* and other plant P450 proteins by Maximum Parisimony method

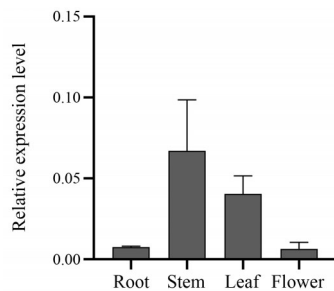


Figure 4 Tissue expression profile of *AsCYP71D1*

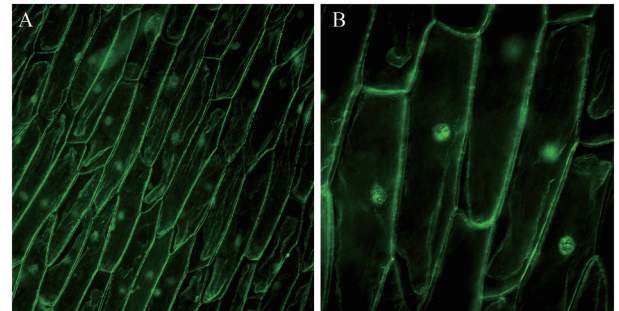


Figure 6 Green fluorescence of onion epidermis transformed with transient expression vector. A: Overall view of subcellular localization; B: Detail of the subcellular localization

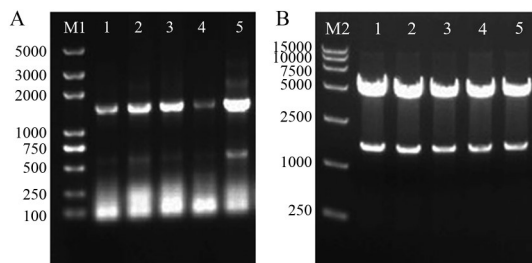


Figure 5 Construction of transient expression vector *AsCYP71D1*-pAN580. A: Bacteria liquid PCR of *AsCYP71D1*-pAN580; B: Double digestion of *AsCYP71D1*-pAN580. M1-DL5000 Marker; M2-DL15000 Marker

讨论

沉香具有很高的药用价值和经济价值, 倍半萜类化合物是其主要活性成分之一。倍半萜类化合物上游合成途径已经清晰, 然而其下游途径的关键酶还研究甚少。P450 是一类含有血红素配基的多功能酶, 具有广泛的催化活性, 主要涉及萜类、生物碱类、甾醇类、黄酮/异黄酮类、植物激素等的合成和代谢, 在植物体内起着重要作用。对参与次生代谢的 CYP450 基因的分

离、筛选和功能鉴定一直是研究的热点和难点问题。

基于白木香转录组数据, 本研究利用 RT-PCR 和 RACE 技术获得 CYP450 *AsCYP71D1* 的全长 cDNA 序列。多序列比对发现 *AsCYP71D1* 编码的蛋白中含有三个保守基序, 分别为: 血红素结合域 FxxGxRxCxG、电子传递通道残基 PERF 和 K 螺旋中的 ExxR 残序。已有的研究表明, 在所有已知的 P450 蛋白中, 都含有一个保守的血红素结合域 FxxGxRxCxG 及螺旋 K 区的 ExxR 序列, 这也是鉴定 P450 的主要特征序列。说明本研究分离的 *AsCYP71D1* 编码的蛋白属于 P450 家族酶。系统发育树分析显示 *AsCYP71D1* 编码的蛋白属于 CYP71D 亚家族, 与木薯来源的 CYP71D10 聚为一支, 推测可能具有相似的功能, 然而木薯来源的 CYP71D10 蛋白暂未有功能验证的报道, *AsCYP71D1* 的具体催化功能仍需进一步实验验证。根据 Pateraki 等^[20]的报道, 倍半萜类物质的合成通常由 CYP71 和/或 CYP76 家族的 P450s 参与, 推测 *AsCYP71D1* 有可能参

与沉香倍半萜的下游合成反应。P450 基因的表达调控主要在转录水平,并具有组织器官的特异性。本研究中 *AsCYP71D1* 主要在茎中表达,而且响应 MeJA 诱导。在健康组织中几乎不表达,受 MeJA 诱导后表达量迅速升高,这与之前鉴定的倍半萜合酶基因的表达具有相似的表达特性^[21],表明其可能参与沉香倍半萜生物合成。CYP450 多定位于细胞质^[22,23],也有研究表明,部分 CYP450 定位在细胞膜和细胞核,如苦蕒中 CYP450 基因 *comp152181* 编码的蛋白在细胞质、细胞膜和细胞核中均有表达^[24],这和 *AsCYP71D1* 编码蛋白相一致。

这些发现有助于进一步对参与沉香倍半萜生物合成的 CYP450 基因进行功能鉴定。虽然随着测序技术的进步,很多物种中的 P450 基因家族被预测和注释出来,但只有极少数的基因功能被鉴定,它仍然是该领域研究的难点和焦点。这些酶基因功能鉴定的方法主要有两种,一种是利用原核或真核表达系统异源表达酶蛋白,进行体外催化反应,以确定基因功能。另一种方法就是利用转基因技术,分析转基因植株的化学成分变化;或者是合成生物学的手段,利用酵母体系进行底盘改造,检测化学成分的变化。然而,由于很多次生代谢合成途径并不完全清晰,很难获得相应的底物和产物,以及很多非模式植物缺乏转基因体系等,诸多因素限制了 P450 基因功能的发掘。因此,从数量众多的 P450 家族中鉴定一个基因的功能仍然存在极大的难度和挑战性。

作者贡献: 高世玺执行本项工作的实验、数据分析和论文初稿的撰写;戎梅参与实验和数据分析;彭俊祥参与实验材料取样和 RNA 提取;徐艳红和魏建和负责实验设计、文章修改和课题资助。

利益冲突: 所有作者声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Schuler MA, Werck-Reichhart D. Functional genomics of P450s [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 629-667.
- [2] Chapple C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 311-343.
- [3] Coon MJ. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005, 45: 1-25.
- [4] Ehltling J, Hamberger B, Million-Rousseau R, et al. Cytochromes P450 in phenolic metabolism [J]. *Phytochem Rev*, 2006, 5: 239.
- [5] Frear DS, Swanson HR, Tanaka FS. N-Demethylation of substituted 3-(phenyl)-1-methylureas: isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton [J]. *Phytochemistry*, 1969, 8: 2157-2169.
- [6] Hotze M, Schröder G, Schröder J. Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P450 proteins as translational fusions with P450 reductase in *Escherichia coli* [J]. *FEBS Lett*, 1995, 374: 345.
- [7] Davidson SE, Reid JB, Helliwell CA. Cytochromes P450 in gibberellin biosynthesis [J]. *Phytochem Rev*, 2006, 5: 405.
- [8] Shang Y, Huang S. Multi-omics data-driven investigations of metabolic diversity of plant triterpenoids [J]. *Plant J*, 2019, 97: 101-111.
- [9] Luo P, Wang YH, Wang GD, et al. Molecular cloning and functional identification of (+)-d-cadinene-8-hydroxylase, a cytochrome P450 mono-oxygenase (CYP706B1) of cotton sesquiterpene biosynthesis [J]. *Plant J*, 2001, 28: 95-104.
- [10] Boachon B, Burdloff Y, Ruan JX, et al. A promiscuous CYP706A3 reduces terpene volatile emission from arabidopsis flowers, affecting florivores and the floral microbiome [J]. *Plant Cell*, 2019, 31: 2947-2972.
- [11] Diaz-Chavez ML, Moniodis J, Madilao LL, et al. Biosynthesis of sandalwood oil: *Santalum album* CYP76F cytochromes P450 produce santalols and bergamotol [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e75053.
- [12] Hashimoto K, Nakahara S, Inoue T, et al. A new chromone from agarwood and pyrolysis products of chromone derivatives [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1985, 33: 5088-5091.
- [13] Ito M, Okimoto K, Yagura T, et al. Induction of sesquiterpenoid production by methyl-jasmonate in *Aquilaria sinensis* cell suspension culture [J]. *J Essent Oil Res*, 2005, 17: 175-180.
- [14] Kumeta Y, Ito M. Characterization of δ -guaiene synthases from cultured cells of *Aquilaria*, responsible for the formation of the sesquiterpenes in agarwood [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154: 1998-2007.
- [15] Chen HQ, Wei JH, Yang JS, et al. Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants [J]. *Chem Biodivers*, 2012, 9: 236-250.
- [16] Xu Y, Zhang Z, Wang M, et al. Identification of genes related to agarwood formation: transcriptome analysis of healthy and wounded tissues of *Aquilaria sinensis* [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 227.
- [17] Xu Y, Yang X, Zhang Z, et al. Cloning and expression analysis of HMG-CoA reductase from *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 953-959.
- [18] Xu Y, Tian M, Sun P, et al. Cloning and expression analysis of AsMAPK3 from *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg [J]. *Mod Chin Med (中国现代中药)*, 2017, 19: 1083-1088.
- [19] Gao ZH, Wei JH, Yang Y, et al. Selection and validation of reference genes for studying stress-related agarwood formation of *Aquilaria sinensis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31: 1759-1768.
- [20] Pateraki I, Heskes AM, Hamberger B. Cytochromes P450 for terpene functionalisation and metabolic engineering [J]. *Adv*

- Biochem Eng Biotechnol, 2014, 148: 107-139.
- [21] Lv FF, Sun PW, Liu PW, et al. Study on background and wound induced expression of 22 sesquiterpene synthase genes of *Aquilaria sinensis* [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2017, 19: 1076-1082.
- [22] Schuler MA. Plant cytochrome P450 monooxygenases [J]. CRC Crit Rev Plant Sci, 1996, 15: 235-284.
- [23] Cheng Y, Liu HB, Tong XJ, et al. Identification and analysis of CYP450 and UGT supergene family members from the transcriptome of *Aralia elata* (Miq.) seem reveal candidate genes for triterpenoid saponin biosynthesis [J]. BMC Plant Biol, 2020, 20: 214.
- [24] Jiang ZF, Han YD, Lou PP, et al. Identification and expression analysis of cytochrome P450 family genes from *Physalis angulata* L [J]. Acta Agric Zhejiangensis (浙江农业学报), 2021, 33: 2009-2016.