

温郁金中茉莉酸氨基酸合酶关键基因 *JAR* 的克隆及生物信息学分析

李 帆¹, 薛 畅^{2#}, 张金华³, 任仙樱⁴, 喻明军⁵, 吴志刚^{2*}, 姜程曦^{1*}

1. 温州大学生命科学研究院, 浙江 温州 325035

2. 温州医科大学药学院, 浙江 温州 325035

3. 大理药业股份有限公司, 云南 大理 671000

4. 温州栽金医药有限公司, 浙江 乐清 325600

5. 安徽环球基因科技有限公司, 安徽 滁州 239004

摘要: 目的 克隆温郁金茉莉酸氨基酸合酶关键基因 *JAR* (JA-amino acid synthetase) 的全长 cDNA 序列, 并进行生物信息学和表达分析。方法 根据温郁金转录组数据设计特异性引物。以温郁金根茎的 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增获得 *JAR* 全长 cDNA 序列, 利用生物信息学软件预测基因编码蛋白的特征; 利用 ClustalW 和 MEGA 6.06 软件构建温郁金 *JAR* 的系统进化树; 构建原核表达载体 PET-22B(+)-*JAR*, 纯化重组蛋白 JAR5, 并进行鉴定。结果 扩增后的基因编码 582 个氨基酸, 全长 1749 bp, 且具有典型的 GH3 特征结构域, 不具跨膜域, 不存在信号肽, 属于不稳定蛋白; PCR 扩增后得到约 1 800 bp 大小的片段, 经凝胶过滤色谱纯化, 最终得到基于蛋白印迹实验 (Western blotting) 验证正确的 66 200 大小的重组蛋白。结论 首次克隆并分析了温郁金 *JAR* 基因, 纯化了 JAR5 蛋白, 为进一步研究温郁金 *JAR* 基因蛋白功能研究提供依据。

关键词: 温郁金; *JAR* 基因; 基因克隆; JAR5; 蛋白纯化

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)06-1838-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.06.027

Cloning and protein purification of key gene *JAR* of jasmonate amino acid synthase in *Curcuma wenyujin*

LI Fan¹, XUE Chang², ZHANG Jin-hua³, REN Xian-ying⁴, YU Ming-jun⁵, WU Zhi-gang², JIANG Cheng-xi¹

1. Institute of Life Sciences, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China

2. School of Pharmacy, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

3. Dali Pharmaceutical Co., Ltd., Dali 671000, China

4. Wenzhou Ejin Pharmaceutical Co., Ltd., Yueqing 325600, China

5. Anhui Global Gene Technology Co., Ltd., Chuzhou 239004, China

Abstract: Objective To clone the full-length cDNA sequence of the key gene *JAR* (JA-amino acid synthetase) jasmonic acid synthetase from *Curcuma wenyujin*, and construct a recombinant plasmid for purification and bioinformatics and expression analysis.

Methods Specific primers were designed according to the transcriptome data of *C. wenyujin*. The *JAR* cDNA sequence was amplified by RT-PCR from the rhizome of *C. wenyujin*, and the characteristics of the gene encoding protein were predicted by bioinformatics; By cloning the JAR5_2075 sequence from the rhizome cDNA of *C. wenyujin*, using bioinformatics software to predict the characteristics of the gene encoded protein, using ClustalW and MEGA 6.06 software to construct the phylogenetic tree of *JAR*; It constructed the prokaryotic expression vector PET-22B (+)-*JAR*, purifying and recombining protein JAR5, and identified it.

Results The amplified gene encoded 582 amino acids, with a total length of 1749 bp, and had a typical GH3 characteristic domain, without transmembrane domain, and no signal peptide. It was an unstable protein; The size of PCR amplification was about 1800 bp, the fragment was purified by gel filtration chromatography, and finally obtained the correct 66 200 recombinant protein based on

收稿日期: 2021-10-21

基金项目: 大理药业股份有限公司横向课题 (KJHX1603); 温莪术规范化生产及基地建设研究 (KJHX2008)

作者简介: 李 帆 (1994—), 女, 山东泰安人, 硕士, 研究方向为中药次生代谢学。Tel: 13676796304 E-mail: 1471750585@qq.com

薛 畅 (1997—), 男, 安徽池州人, 在读硕士研究生, 研究方向为生物信息学。Tel: 18156637292

*通信作者: 姜程曦, 研究员, 研究方向为中药学。Tel: 18969715696 E-mail: jiangchengxi@126.com

吴志刚, 副教授, 研究方向为中药次生代谢产物研究。Tel: 15867176058 E-mail: wuzhigang177@126.com

Western Blot. **Conclusion** The *JAR* gene of *C. wenyujin* was cloned and analyzed for the first time, and the JAR5 protein was purified, which provided a basis for further research on the protein function of the *JAR* gene of *C. wenyujin*.

Key words: *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen & C. Ling; *JAR* gene; gene cloning; JAR5; protein purification

温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen & C. Ling 系姜科姜黄属药用植物, 其根茎、块根均可供药用, 为《中国药典》2020 年版收载品种^[1], 是浙江省著名道地药材, 属“浙八味”之一^[2]。现代药理与临床研究表明温郁金主要有效成分为萜类和姜黄素类^[3-5], 具有抗肿瘤、抗血栓、保肝、抗过敏等多种药理活性^[6-7]。

JA-amino Acid Synthetase (*JAR*) 为编码茉莉酸氨基酸合酶的重要基因, 是植物响应茉莉酸途径的重要基因^[8]。而茉莉酸类物质 (JAs), 作为一种激素, 广泛存在于植物的幼嫩组织、花和发育的生殖器官中^[9], 在其生长发育、应激反应和次生代谢过程中起着重要的调控作用^[10-11]。此外, 研究发现茉莉酸信号途径在萜类合成过程中发挥了重要的作用, 茉莉酸甲酯对甜罗勒挥发物的生成有促进作用^[12], 茉莉酸激素处理使橡胶树 *HbJAR1* 的表达量上调^[13], 倍半萜化合物青蒿素的生物合成受茉莉酸类物质的调控。

近年来, 已经从百合^[14]、地黄^[15]、花椒^[16]等药用植物中克隆出了茉莉酸途径的相关基因。而 *JAR* 基因在温郁金中直接参与萜类挥发物合成调控的研究尚无报道, 根据本课题组前期温郁金相关实验, 发现温郁金根茎中有 *JAR* 相关转录本序列 (*JAR5_2075*)。本研究以 *JAR5_2075* 序列为模板, 克隆 *JAR* 基因, 构建原核表达载体并转化至大肠杆菌重组纯化 *JAR5* 蛋白并进行鉴定, 为后期开展该基因蛋白功能研究提供依据。

1 材料

温郁金样品采自温州瑞安陶山镇种植基地, 经温州医科大学药学院吴志刚副教授鉴定为姜科植物温郁金 *C. wenyujin* Y. H. Chen & C. Ling。样品洗净、切碎, 液氮下研成粉末并于 -80 °C 保存备用。TB Green®Premix Ex Taq™购自于 TaKaRa 公司; 高保真酶购自于 NEB 公司; 切胶回收试剂盒、感受态细胞 BL21 (DE3) 购自于北京全式金生物技术有限公司; 所需引物由安徽环球基因科技有限公司合成; 氨苄霉素、氯霉素购自北京 Solarbio 公司; 蛋白纯化的凝胶过滤色谱材料购自北京瑞达恒辉科技发展有限公司; DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自天根生化试剂公司。PCR Buffer 缓冲液、

ddH₂O、琼脂糖等均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

2 方法

2.1 温郁金总 RNA 提取与 cDNA 的合成

参照 CTAB 法^[10]提取样品总 RNA 并按 RNA 纯化试剂盒说明纯化, 1% 的琼脂糖电泳检查 RNA 完整性、浓度和纯度, 发现提取所得的 RNA 质量好, 可进行下一步实验。依据反转录试剂盒的说明反转录合成第一链 cDNA, -20 °C 保存备用。

2.2 *JAR* 基因克隆与原核表达载体构建

根据前期的温郁金相关实验, 用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异性引物。上游引物: GT1-F: 5'-AATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAC-ATATGCGCCTGTTTAGCCTGGAAAGTGTT-3'; 下游引物: GT1-R: 5'-AGCCGGATCTCAGTGG-TGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGATTACCGTATGCG-GTGCTAAAATA-3', 由安徽环球基因科技有限公司扩增并测序。以温郁金的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 扩增采用 Phusion High-Fidelity 酶 (NEB, M0501S), PCR 体系为 96 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 20 s, 需 23 个循环; 最后 72 °C 延伸 1 min, 4 °C 保存。将 PCR 扩增的得到的目的基因构建到 PET-22B (+) 载体, 提取质粒, 用 XbaI-XhoI 进行双酶切, 转化至大肠杆菌中, 挑菌并进行菌液测序验证为阳性克隆。

2.3 重组蛋白的诱导表达与纯化

将重组质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞, 涂在卡那霉素抗性固体培养基上, 37 °C 倒置培养过夜, 选取单克隆于 5 管 LB 培养基 37 °C 培养至菌体吸光度 (A_{600}) 为 0.6~0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 37 °C 培养 4 h 后离心, 收菌制样, SDS-PAGE 与 Western blotting 检测。

选取单克隆于 5 管 LB 培养基 37 °C 培养至菌体 A_{600} 为 0.6~0.8, 加入 IPTG 至终浓度分别为 0.2 mol/L 与 1 mol/L, 分别在 37 °C 和 15 °C 220 r/min 培养 4 h 和 16 h, 诱导融合蛋白表达, 各条件制样 SDS-PAGE 分析; 然后将表达最优克隆菌株 37 °C 扩大培养 4 L 至 $A_{600}=0.6$, 37 °C 诱导 4 h 收菌; 离心收菌, 重悬菌体, 超声破碎; 离心, 沉淀经变性

缓冲液溶解后离心,上清进行 Ni 柱亲和色谱纯化和凝胶过滤色谱 (Superdex200) 纯化 (PBS, 8 mol/L Urea, pH 7.4), 收集目的蛋白进行 SDS-PAGE 确定纯度, 复性至 Buffer (PBS, 500 mol/L L-Arg, 2 mol/L GSH, 0.2 mol/L GSSG, 2 mol/L DTT, pH 7.4) 中, 过滤除菌, 4 °C 保存。

2.4 JAR 基因的生物信息学分析

在克隆得到 *JAR* 基因完整开放阅读框的前提下, 利用在线软件 ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/) 对 *JAR5* 蛋白进行蛋白相对分子质量及等电点的预测; 通过 TMHMMOL2.0 (<http://www.Cbs.Dtu.dk/services/TMHMMOL/>) 和 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分别预测蛋白的跨膜结构和疏水性; 利用 Signal4.1 (<http://www.Cbs.Dtu.dk/services/SignalP/>) 在线预测蛋白的信号肽有无, 利用 PSORTII (<https://psort.hgc.jp/>) 对 *JAR5* 进行了亚细胞定位分析, SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 在线预测蛋白质的二级结构, 利用 SWISS-MOEL (<https://www.Swissmodel.expasy.org/>) 在线软件预测获得 *JAR5* 蛋白三级结构; 利用 NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行 *JAR* 基因的同源性比较, 利用 MEGA 6.06 软件进行多序列比对构建系统进化树。

3 结果与分析

3.1 JAR5_2075 序列 PCR 扩增

以温郁金的 *JAR5_2075* 序列 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 进行目的基因扩增, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳条带约为 1800 bp, 与目的基因片段大小吻合。重组质粒 PET-22B(+)-*JAR*, 提取质粒, 用 XbaI-XhoI 进行双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳检测得目的基因条带, 约为 1800 bp, 与预测的片段大小 1815 bp (加上保护碱基) 相符, 部分样品的扩增结果见图 1。

3.2 生物信息学分析

3.2.1 JAR5 蛋白理化性质分析 *JAR* 基因序列完整开放阅读框大小为 1749 bp, 编码 582 个氨基酸。ExPASy 在线预测 *JAR5* 蛋白相对分子质量大小为 66 400, 等电点为 5.91, 化学分子式为 $C_{2976}H_{4613}N_{793}O_{885}S_{23}$, 正电荷残基数为 58, 负电荷残基数为 70, 亮氨酸含量最高 (占比 9.8%), 色氨酸含量最低 (占比 0.8%), 不稳定系数为 40.47%,

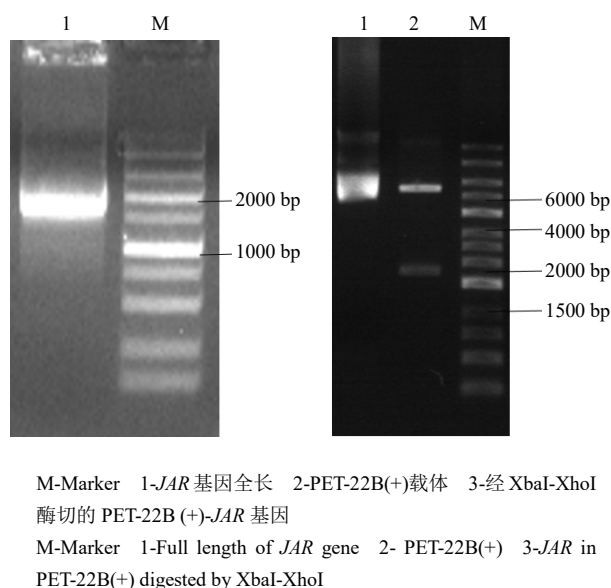


图 1 *JAR* 和 PET-22B (+) -*JAR* 的基因克隆

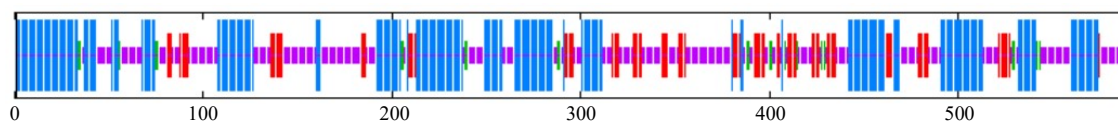
Fig. 1 Cloning of *JAR* and PET-22B(+)-*JAR*

为不稳定蛋白, 体内半衰期超过 10 h, 预测得到蛋白质的平均亲水系数是 -0.215, 故此蛋白为疏水蛋白。并且分析此 *JAR* 基因蛋白保守结构域, 发现其具有 *JAR* 特征性结构域, 属于 GH3 家族成员。

3.2.2 JAR5 蛋白二级和三级结构预测分析 利用 NPS 在线软件对 *JAR5* 蛋白的二级结构进行预测分析。结果显示 (图 2), *JAR5* 蛋白二级结构元件中无规卷曲 (random coil) 所占的比例最高, 包含 250 个氨基酸, 占 42.37%; α -螺旋包含 230 个氨基酸, 占 38.98%; 延伸链包含 87 个氨基酸, 占 14.75%。然后利用 SWISS-MODEL Workspace 在线软件对 *JAR5* 蛋白进行同源建模, 预测获得的 *JAR5* 蛋白三级结构 (图 3-A、B) 与二级结构结果相符合, 主要是由 α 螺旋、无规则卷曲和延伸链进一步折叠组装形成三级结构, 且与拟南芥 *JAR* 预测得到的其中 1 个三级结构符合。

3.2.3 JAR5 蛋白结构功能域、跨膜结构域以及信号肽分析 利用 TMHMMOL 2.0 在线工具对 *JAR5* 进行跨膜结构区域预测, 结果表明, *JAR5* 蛋白不含跨膜螺旋区, 说明 *JAR5* 不属于跨膜蛋白。利用 SinalP4.0 Server 预测分析 *JAR5* 蛋白的信号肽 (图 4), 结果显示存在信号肽的概率为 0.17%, 故推测 *JAR5* 蛋白不存在信号肽, 是非分泌蛋白。

3.2.4 温郁金 JAR 基因 NCBI-Blast 比对 通过 NCBI-Blast 数据比对, 发现对比的 6 个样品 *E* 值均为零, *E* 值越小越好, 越小表示同源性越高。此外,



蓝色代表 α -螺旋, 红色代表延伸链, 紫色代表无规卷曲
blue: alpha helix; red: extended strand; purple: random coil

图 2 JAR5 蛋白的二级结构

Fig. 2 Secondary structure of JAR5

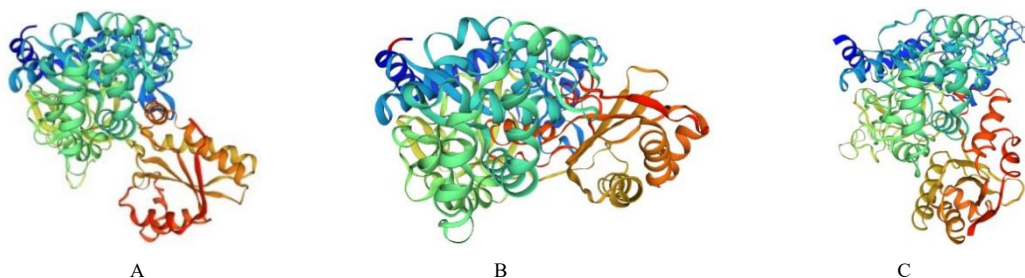


图 3 JAR5 蛋白的三级结构模型

Fig. 3 Three tertiary structure of JAR5

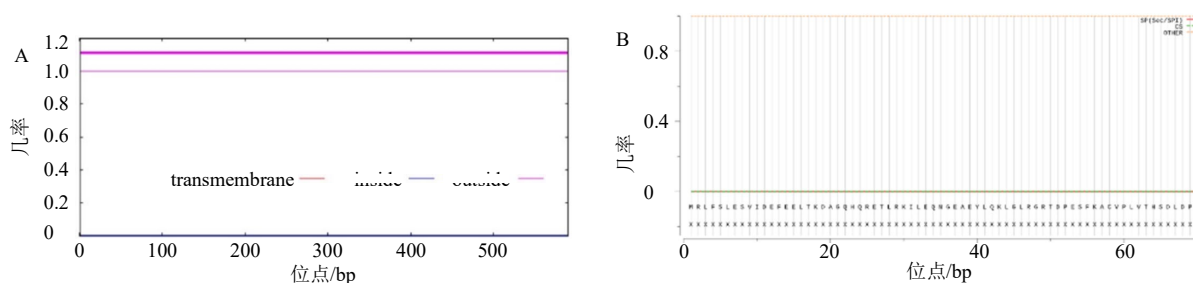


图 4 JAR5 跨膜结构域 (A) 与信号肽 (B)

Fig. 4 Transmembrane domain (A) and signal peptide (B) of JAR5

温郁金 *JAR* 基因与姜科姜黄属生姜 *Zingiber officinale* L. 同源性最高, 序列相似度可达 95%, 其次是与芭蕉科野蕉 *Musa balbisiana* L., 同源性为 85%; 与天南星科植物芋 *Colocasia esculenta* L.、棕榈科海枣 *Phoenix dactylifera* L.、槟榔科椰子 *Cocos nucifera* L. 同源性较低, 约 80%。

3.2.5 JAR 基因系统进化分析 构建温郁金 *JAR* 基因编码的氨基酸序列进化树。结果表明 *JAR* 基因形成了单子叶植物与双子叶植物的不同进化分支, 其与姜黄 *Curcuma longa* L. 形成一个小亚群, 亲缘关系最近, 其次是野蕉, 同菠萝、海枣、油棕等形成大的亚群, 这几种植物的亲缘性较远 (图 5)。

3.3 表达鉴定、优化及可溶性分析结果

将以上扩增后的重组质粒进行 Western blotting 表达鉴定, 分析该蛋白能识别相应抗体 (图 6), 说明该质粒表达成功。然后对重组蛋白进行表达优化

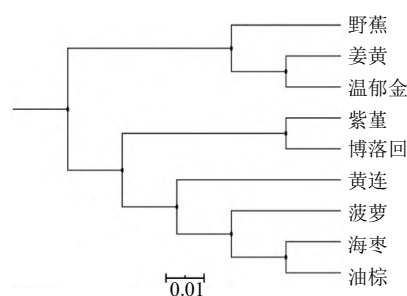


图 5 温郁金 *JAR* 基因编码氨基酸的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *JAR*'s amino acid sequence

研究, 结果显示, 温度对诱导重组蛋白的表达有较强的影响, 在 37 °C 诱导后的沉淀样品中蛋白表达量较高, 诱导剂浓度对之几乎没有影响 (图 7)。重组蛋白经 Ni^{2+} -NTA 柱纯化, 大部分存在于 B12~B6 洗脱液中, 且纯化效果良好 (图 8)。透析后的纯化 JAR5 蛋白 SDS-PAGE 结果见图 9。不含其他

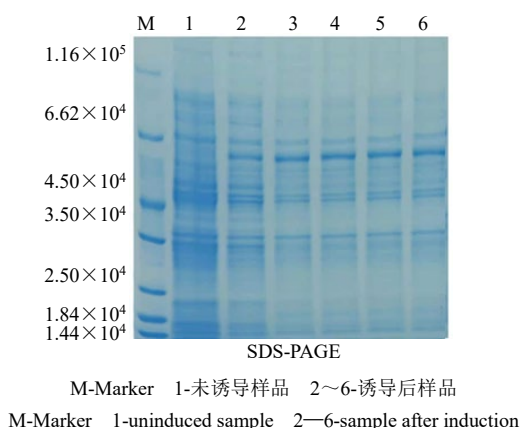
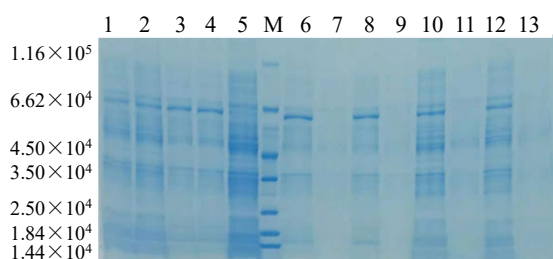


图 6 表达鉴定结果

Fig. 6 Expression identification results



M-Marker 1-15 °C 0.2 mol·L⁻¹ IPTG 诱导后样品 2-15 °C 1.0 mol·L⁻¹ IPTG 诱导后样品 3-37 °C 0.2 mol·L⁻¹ IPTG 诱导后样品 4-37 °C 1.0 mol·L⁻¹ IPTG 诱导后样品 5-未诱导样品 6-37 °C 1.0 mol·L⁻¹ IPTG 诱导后沉淀样 7-37 °C 1.0 mol·L⁻¹ IPTG 诱导后上清样 8-7 °C 0.2 mol·L⁻¹ IPTG 诱导后沉淀样 9-37 °C 0.2 mol·L⁻¹ IPTG 诱导后上清样 10-15 °C 1.0 mol·L⁻¹ IPTG 诱导后沉淀样 11-15 °C 1.0 mol·L⁻¹ IPTG 诱导后上清样 12-15 °C 0.2 mol·L⁻¹ IPTG 诱导后沉淀样 13-15 °C 0.2 mol·L⁻¹ IPTG 诱导后上清样

M-Marker 1-15 °C 0.2 mol·L⁻¹ IPTG induced sample 2-15 °C 1.0 mol·L⁻¹ IPTG induced sample 3-37 °C 0.2 mol·L⁻¹ IPTG induced sample 4-37 °C 1.0 mol·L⁻¹ IPTG induced sample 5-Uninduced sample 6-37 °C 1.0 mmol IPTG induced precipitation sample 7-37 °C 1.0 mol·L⁻¹ IPTG induced supernatant 8-37 °C 0.2 mol·L⁻¹ IPTG induced precipitation sample 9-37 °C 0.2 mol·L⁻¹ IPTG induced supernatant 10-15 °C 1.0 mol·L⁻¹ IPTG induced precipitation sample 11-supernatant sample induced by 1.0 mol·L⁻¹ IPTG at 15 °C 12-precipitation sample after induction with 0.2 mol·L⁻¹ IPTG at 15 °C 13-supernatant sample after induction with 0.2 mol·L⁻¹ IPTG at 15 °C

图 7 优化和可溶性分析结果

Fig. 7 Optimization and solubility analysis results

杂带,说明纯化成功。

4 讨论

到目前为止,对于 *JAR* 基因的研究多集中于茉莉酸信号途径响应萜类次生代谢产物合成积累上,对于 *JAR* 基因直接参与次生代谢产物调控的研究较少,尤其是温郁金中尚无深入研究,本研究从温郁

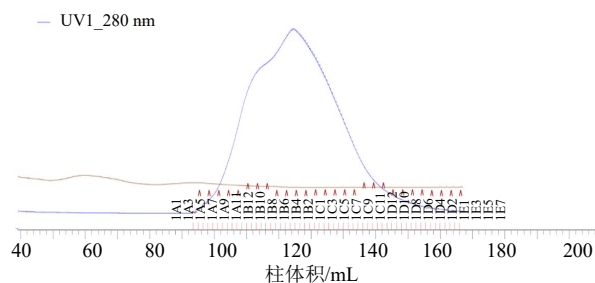
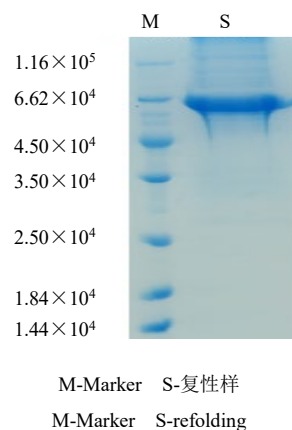


图 8 凝胶过滤色谱纯化峰图

Fig. 8 Gel filtration chromatography purification peak diagram



M-Marker S-复性样
M-Marker S-refolding

图 9 蛋白复性 SDS-PAGE 结果

Fig. 9 SDS-PAGE results of protein renaturation lane

金根茎中成功克隆获得温郁金 *JAR5* 基因,该基因编码 582 个氨基酸,通过 Clustal X 等生物信息学软件将温郁金 *JAR5* 基因与其他物种基因序列进行多重性比对和进化分析,序列同源性较高,部分区段同源性达 100%,说明其在进化中是十分保守的,也有助于其他物种 *JAR* 基因的克隆与分离。这些保守区基因信息为其他物种中该基因的克隆提供了十分有价值的序列信息,为加快基因克隆及 *JAR* 基因的分子调控研究奠定基础。通过 NCBI 对该基因的蛋白质进行二级和三级结构预测,也有助于未来该基因在生物体内的调控研究。

植物的香味对于驱避害虫,传粉授粉起到了至关重要的作用,同时也是重要的观赏性状^[17-18],JA 对许多药用植物次生代谢产物的积累都具有一定促进作用。JA 行使功能通常以 *Me-JA* 和 *JA-Ile* 的形式来实现的研究发现^[19]。萜类生物碱长春花碱的合成积累在过表达 *CrJAR1* 基因之后显著提高^[20]。阳春砂 *MeJA* 诱导之后诱导 *JAR1* 基因的表达同时萜类合成通路上的合成酶的表达也发生变化^[21]。“西伯利亚”百合 *LiJAR1* 相对表达量随着花朵的逐渐开

放至盛开期而逐渐升高,很有可能在萜烯类挥发物次生代谢产物的生物合成中发挥着作用^[15]。因此,可以推测 *JAR* 基因与萜类合成代谢的一些基因有一定的关联性。本研究成功克隆获得了温郁金 *JAR5* 基因,该基因有典型的 GH3 特征结构域,研究结果为后续利用代谢工程手段调控温郁金萜类成分提供了重要靶标基因,有益于温郁金重要价值萜类成分的开发利用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 286.
- [2] 陶正明, 冷春鸿, 吴志刚, 等. 温郁金遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 浙江农业学报, 2009, 21(3): 207-210.
- [3] 任明, 李九席. RP-HPLC 同时测定莪术中莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 155-158.
- [4] 唐思丽, 王声, 孙明娜, 等. 莪术活性成分的分离鉴定及活性研究 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(3): 354-357.
- [5] 陈金凤, 熊亮, 刘菲, 等. 蓬莪术姜黄素类化学成分研究 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 16-20.
- [6] 袁晓旭, 杨明明, 赵桂琴. 郁金化学成分及药理作用研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2016, 33(6): 487-489.
- [7] 秦洛宜. 姜黄、莪术、郁金的化学成分与药理作用研究分析 [J]. 临床研究, 2019, 27(2): 3-4.
- [8] Wasternack C, Hause B. Jasmonates and octadecanoids: Signals in plant stress responses and development [J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2002, 72: 165-221.
- [9] Wasternack C, Stenzel I, Hause B, *et al.* The wound response in tomato: Role of jasmonic acid [J]. *J Plant Physiol*, 2006, 163(3): 297-306.
- [10] 朱家红, 彭世清. 茉莉酸及其信号传导研究进展 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(10): 2166-2172.
- [11] Stenzel I, Otto M, Delker C, *et al.* ALLENE OXIDE CYCLASE (*AOC*) gene family members of *Arabidopsis thaliana*: Tissue- and organ-specific promoter activities and *in vivo* heteromerization [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(17): 6125-6138.
- [12] Jiang Y F, Ye J Y, Li S, *et al.* Regulation of floral terpenoid emission and biosynthesis in sweet basil (*Ocimum basilicum*) [J]. *J Plant Growth Regul*, 2016, 35(4): 921-935.
- [13] 李晓娜, 肖厚贞, 万三连, 等. 巴西橡胶树生长素响应 HbJAR1 基因克隆与表达分析 [J]. 热带作物学报, 2017, 38(8): 1478-1484.
- [14] 沈乾, 陆续, 颜廷祥, 等. 茉莉酸介导的 MYC 类转录因子调控青蒿素生物合成的机制研究 [A] // 上海市植物生理与植物分子生物学学会. 第十届上海市植物生物学青年学术研讨会摘要集 [C]. 上海: 上海市植物生理与植物分子生物学学会, 2016: 2.
- [15] 王浩楠, 付宇辰, 马波, 等. 百合 LiJAR1 基因的克隆及表达分析 [J/OL]. 基因组学与应用生物学 [2021-08-23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20210525.0905.002.html>.
- [16] 彭淑萍, 董诚明, 朱昀昊. 响应内生菌侵染的两个地黄茉莉酸合成关键基因的克隆与表达分析 [J]. 植物研究, 2021, 41(2): 294-301.
- [17] Martin D, Tholl D, Gershenzon J, *et al.* Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129(3): 1003-1018.
- [18] 缪旻珉, 陈建春, 张宗东. 花朵香味的生理、遗传及调控 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(S1): 67-74.
- [19] Staswick P E, Tiryaki I. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2117-2127.
- [20] 徐岩, 韩玉乾, 于放, 等. 过表达长春花 *JAR1* 基因促进文朵灵和长春质碱的生物合成 [J]. 生物技术通报, 2017, 33(6): 62-68.
- [21] 何雪莹. 基于 RNA-Seq 的阳春砂 JA 信号转导及萜类合成相关转录因子的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.

[责任编辑 时圣明]