

• 药材与资源 •

白木香中 2 个 *MAPK* 基因的克隆、原核表达及活性分析

杨舒雯¹, 戎梅¹, 王斯雨¹, 孙雨萱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:目的 *AsMAPK1* 和 *AsMAPK2* 是白木香 *Aquilaria sinensis* 中 2 个功能未知的丝裂原活化蛋白激酶基因, 为探究其基本特性及其在伤害诱导沉香形成中潜在功能, 对其进行克隆、表达分析及初步体外功能检测。方法 以课题组继代培养的白木香愈伤组织 cDNA 为模板, PCR 扩增获得 *AsMAPK1* 和 *AsMAPK2* 的编码序列; 利用相关在线工具及软件进行生物信息学分析; 构建 pGEX4T-1-*AsMAPK1/2* 原核表达载体, 转化大肠杆菌 BL21 表达并对诱导条件进行优化; 构建 *AsMAPK1*-GFP 和 *AsMAPK2*-GFP 融合表达载体, 转化拟南芥原生质体后利用共聚焦显微镜观察其亚细胞定位; 采用体外磷酸化方法检测纯化蛋白的激酶活性。结果 成功克隆了 *AsMAPK1* (1 188 bp) 和 *AsMAPK2* (1 128 bp) 基因。生物信息学分析显示, 二者编码的蛋白均含有典型的激酶结构域, 属于 MAPK 家族成员。系统进化分析表明, *AsMAPK1* 与拟南芥中的 *AtMAPK6* 同源蛋白亲缘关系最近, 属于 A 组, 而 *AsMAPK2* 则与 B 组的 *AtMAPK13* 聚为一支。SDS-PAGE 检测显示, 成功诱导表达了约 71 000 和 69 000 的可溶性重组蛋白。亚细胞定位结果表明, *AsMAPK1*-GFP 和 *AsMAPK2*-GFP 都同时定位于细胞质和细胞核。进一步的激酶活性分析证实, *AsMAPK1* 和 *AsMAPK2* 均能发生自磷酸化, 并能磷酸化通用底物 MBP。结论 证实 *AsMAPK1* 和 *AsMAPK2* 是同时定位于细胞质和细胞核、具有活性的蛋白激酶, 通过对这 2 个基因的克隆、表达与分析, 为深入解析其参与白木香伤害诱导形成沉香的信号传导机制奠定基础。

关键词: 白木香; 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK); 克隆; 生信分析; 原核表达

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)06-2265-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.06.021

Cloning, prokaryotic expression, and activity analysis of two *MAPK* genes in *Aquilaria sinensis*

YANG Shuwen¹, RONG Mei¹, WANG Siyu¹, SUN Yuxuan¹, XU Yanhong¹, WEI Jianhe^{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 & Peking Union Medical College, Haikou 570311, China

Abstract: Objective *AsMAPK1* and *AsMAPK2* are two mitogen-activated protein kinase (MAPK) genes with unknown functions in *Aquilaria sinensis*. To investigate their fundamental characteristics and potential functions in wound-induced agarwood formation, in this study, we performed cloning, expression analysis, and preliminary *in vitro* functional assays on the two genes. **Methods** Using cDNA from subcultured *A. sinensis* callus as the template, the coding sequences of *AsMAPK1* and *AsMAPK2* were obtained by PCR amplification. Bioinformatics analysis was performed using relevant online tools and softwares. The prokaryotic expression vectors

收稿日期: 2025-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82173925); 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-I2M-1-032)

作者简介: 杨舒雯, 硕士研究生, 研究方向为药用植物次生代谢调控机制。E-mail: s2023009040@student.pumc.edu.cn

*通信作者: 徐艳红, 研究员, 博士生导师, 从事药用植物次生代谢产物调控机制研究。E-mail: xuyanhong99@163.com

魏建和, 研究员, 博士生导师, 从事药用植物遗传育种及栽培学研究。E-mail: wjianh@263.net

pGEX4T-1-*AsMAPK1/2* were constructed, transformed into *E. coli* BL21 for expression, and induction conditions were optimized. The *AsMAPK1*-GFP and *AsMAPK2*-GFP fusion expression vectors were constructed and transformed into *Arabidopsis thaliana* protoplasts to observe their subcellular localization using confocal microscopy. The kinase activity of the purified proteins was detected using an *in vitro* phosphorylation assay. **Results** The *AsMAPK1* (1 188 bp) and *AsMAPK2* (1 128 bp) genes were successfully cloned. Bioinformatics analysis revealed that both encoded proteins contain typical kinase domains and belong to the MAPK family. Phylogenetic analysis indicated that *AsMAPK1* is most closely related to the *AtMAPK6* homolog in *A. thaliana* and belongs to Group A, while *AsMAPK2* clusters with Group B *AtMAPK13*. SDS-PAGE detection showed successful induction of soluble recombinant proteins of approximately 71 000 and 69 000. Subcellular localization results demonstrated that both *AsMAPK1*-GFP and *AsMAPK2*-GFP are localized in the cytoplasm and nucleus. Further kinase activity analysis confirmed that both *AsMAPK1* and *AsMAPK2* undergo autophosphorylation and can phosphorylate the universal substrate MBP. **Conclusion** This study confirms that *AsMAPK1* and *AsMAPK2* are active protein kinases localized in both the cytoplasm and nucleus. The cloning, expression analysis, and kinase activity detection of the two *AsMAPKs* provide a foundation for further elucidating their roles in the signal transduction mechanism underlying wound-induced agarwood formation in *A. sinensis*.

Key words: *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg; mitogen-activated protein kinase (MAPK); cloning; bioinformatic analysis; prokaryotic expression

白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 为瑞香科沉香属常绿乔木, 是我国特有的濒危药用物种, 也是《中国药典》2025年版收录的正品沉香唯一的植物来源, 主产于广东、海南、广西及福建等热带及亚热带地区^[1]。当白木香树干受到物理损伤、真菌侵染等胁迫时, 会启动复杂的防御反应, 在受伤部位逐渐形成芳香性树脂——沉香^[2]。沉香中富含的特征性倍半萜类及色酮类化合物, 赋予其独特的香气, 并具备行气止痛、温中止呕、纳气平喘的药理活性, 具有极高的药用价值^[3-4]。然而, 天然沉香的形成过程缓慢且不可控, 野生白木香资源因过度采伐已濒临枯竭, 现已被列入国家二级保护植物及《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 附录II物种。尽管人工促香技术(如物理钻孔、真菌接种、化学诱导)已广泛应用^[5-7], 但伤害诱导沉香形成的分子调控机制尚未得到系统解析, 尤其是介导外部胁迫信号与内部沉香合成之间信号转导的早期分子事件, 是当前亟需研究的关键课题。

在植物复杂的细胞内信号转导网络中, 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 扮演着核心效应器与信号整合枢纽的关键角色。作为MAPK级联通路的终端激酶, MAPK直接负责将上游信号(通常由MAPKK/MKK磷酸化激活)转化为特定的细胞生理响应^[8-9]。其分子特征在于催化结构域内高度保守的“Thr-X-Tyr(TXY)”基序, 其中的苏氨酸和酪氨酸残基是被上游MAPKK特异性磷酸化并完全激活的关键位点^[10]。激活后的MAPK通过其激酶活性, 特异性磷酸化下游众多的胞质和核内靶蛋

白底物, 包括转录因子[如WRKY家族成员、MYB家族成员(v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)、MYC家族成员(myelocytomatosis oncogene)以及乙烯应答元件结合因子(ethylene-responsive element binding factor, ERF)等]、其他激酶、细胞骨架相关蛋白、代谢酶以及膜转运蛋白等, 从而广泛调控基因表达、蛋白质功能、代谢途径和细胞行为^[11-13]。在植物中, MAPK通路广泛参与调控生长发育、激素信号转导以及对多种胁迫的防御反应^[14-16]。例如, 在拟南芥中*AtMAPK3*和*AtMAPK6*被证实是响应损伤、病原体侵染及茉莉酸(jasmonic acid, JA)信号的关键分子^[17-18]。在丹参的萜类化合物的生物合成调控中, *SmMPK3*响应JA信号后通过磷酸化*SmWRKY33*显著增强其DNA结合能力与转录激活功能, 进而调控JA响应基因表达, 正调控丹参中丹参酮的生物合成^[19]。JA信号也是诱导沉香形成最有效的信号分子, 白木香中沉香倍半萜合酶*ASS1*转录抑制因子*WRKY44*响应JA信号在E3泛素连接酶的介导下发生降解, 解除对*ASS1*的抑制作用^[20-22]。后续在蛋白质磷酸化修饰组学数据中, 本课题组发现*WRKY44*发生了磷酸化。为了探究*WRKY44*的磷酸化机制及其调控沉香倍半萜合成过程的意义, 对基于*WRKY44*抗体的IP-MS结果进行分析, 发现2个MAPK序列片段, 鉴于MAPKs在JA信号通路的重要作用, 故推测这2个MAPK极有可能是连接胁迫信号与沉香合成代谢的关键信号节点。

本研究基于白木香中沉香形成关键转录因子*WRKY44*的IP-MS结果筛选与基因组数据, 成功

克隆出了 2 个 *MAPK* 基因, 命名为 *AsMAPK1* 和 *AsMAPK2*, 然后对其进行生物信息学分析、亚细胞定位, 最后构建了原核表达载体分析其编码蛋白的可溶性表达产物并对激酶活性进行了确认, 为其后续的具体功能验证及解析白木香中从上游伤害信号到调控形成沉香的分子机制等提供了研究基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

本实验所用材料为课题组稳定继代培养于 MS 培养基经茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 处理的白木香 *A. sinensis* (Lour.) Gilg 愈伤组织^[23]。

1.2 试剂与仪器

pGEX4T-1 质粒购自上海生工生物工程股份有限公司; pSYB03-EGFP 质粒购自武汉伯远生物科技有限公司; pEASY[®]-Blunt Simple Cloning Kit、Blue Plus[®] Protein Marker (14 000~100 000)、氨苄抗生素、卡那霉素、大肠杆菌 DH5 α 化学感受态细胞及 BL21 (DE3) 化学感受态细胞均购自北京全式金生物技术有限公司; PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒和 PrimeSTAR[®] HS (Premix) 购自 TAKARA; EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司; BamHI 酶、XhoI 酶和 λ PP 酶购自 NEB; “盼紧连”一步法无缝单/多片段克隆 mix (5 \times , 高浓缩版)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒和“染立显”超微量无毒不加热蛋白染液购自北京聚合美生物科技有限公司; 彩色预染蛋白 Marker (15 000~130 000) 购自 Biosharp; DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen; GST 标签蛋白纯化试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司; MeJA (批号 MKBW9129V)、牛

髓磷脂碱性蛋白 (Myelin Basic Protein, MBP) 购自 Sigma-Aldrich 公司。

基因扩增仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、小型垂直电泳转印系统 (美国 Bio-Rad 公司)、立式恒温振荡器 (美国精骐公司)、冷冻离心机 (德国 Eppendorf)、高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)、电热恒温水浴锅 (北京长风仪器仪表有限公司)、凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)、Nanodrop 2000 分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific)、激光共聚焦显微镜 (日本 Nikon 公司)、超净工作台 (北京东联哈尔仪器制造有限公司)、H₂O₃ 金属浴 (北京卡尤迪生物科技有限公司)、自动蒸汽灭菌锅 (北京发恩科贸有限公司)、紫外分光光度计 (苏州岛津仪器有限公司)。PCR 引物合成委托北京新时代众合科技有限公司完成, 序列测定由上海生工生物工程股份有限公司完成。

2 方法

2.1 白木香总 RNA 提取和 cDNA 合成

实验材料为 MeJA 处理后白木香愈伤组织样品。按照艾德莱 RNA 快速提取试剂盒说明书进行总 RNA 提取, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 的质量, Nanodrop 2000 检测总 RNA 浓度。按照 TAKARA PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行反转录得到白木香 cDNA, 产物存放于 -20 $^{\circ}$ C, 备用。

2.2 *AsMAPK1* 和 *AsMAPK2* 基因的克隆及测序

基于前期课题组测得的白木香基因组数据, 得到 2 个 MAPK 基因编码序列。根据序列信息, 使用软件 Primer Premier 5.0 针对 2 个 *MAPK* 基因设计特异性引物 (表 1) 进行 PCR 扩增, PCR 反应体

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

目的	引物标注	引物序列 (5'-3')
克隆	MAPK1F	ATGGACGGAGCTCCATCTC
	MAPK1R	CAGCTGCTGATATTCAGGGT
	MAPK2F	ATGGAGAATGAAGAAGAAATGGT
	MAPK2R	TTCAACGATATTGTCCGCGT
原核表达	MAPK1F	ggttccgcgtggatccATGGACGGAGCTCCATCTCAC
	MAPK1R	gatcgccgctcgaCAGCTGCTGATATTCAGGGTTGAAC
	MAPK2F	ggttccgcgtggatccATGGAGAATGAAGAAGAAATGGTGATTGG
亚细胞定位	MAPK2R	gatcgccgctcgaTTCAACGATATTGTCCGCGTTGA
	EGFP-1F	ttctgttgaactttaatttagcc ATGGACGGAGCTCCATCTCACC
	EGFP-1R	agatcctcctccagatcctcctcc CAGCTGCTGATATTCAGGGTTG
	EGFP-2F	ttctgttgaactttaatttagcc ATGGAGAATGAAGAAGAAATGGTGATTGGGG
	EGFP-2R	agatcctcctccagatcctcctcc TTCAACGATATTGTCCGCG

序列中小写字母代表同源臂碱基序列。

The lowercase letters in the sequence represent the homologous arm bases.

系: 白木香 cDNA 模板 2 μ L、正向引物和反向引物各 2 μ L、2 \times PrimeSTAR[®]HS (Premix) 25 μ L、无菌无酶水补足至 50 μ L; 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、58 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s、34 个循环数, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 切下目的条带区域用 DNA 凝胶回收试剂盒进行胶回收。

将得到的胶回收产物 (目的基因片段) 进行 NanoDrop 2000 浓度及纯度测定后, 与克隆载体 pEASY-Blunt Simple Cloning Vector 按物质的量比 7:1 混合, 25 $^{\circ}$ C 金属浴 20 min 后得到连接产物, 再通过热激法转化大肠杆菌 TransT1 感受态细胞, 涂布于氨苄霉素抗性的 LB 固体平板, 于 37 $^{\circ}$ C 培养培养箱中倒置过夜培养。次日挑取单克隆至 1 mL 氨苄霉素抗性的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 6 h 后, 进行菌液 PCR 后跑胶检测, 挑选有正确大小条带的的新鲜菌液送至上海生工生物工程股份有限公司测序, 测序引物为 M13-20、M13-26。

2.3 生物信息学分析

通过在线软件 ExPasy-ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对 AsMAPK1 和 AsMAPK2 基因编码氨基酸的理化性质进行预测; 通过在线分析工具 SignalP4.1 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 进行 AsMAPK1 和 AsMAPK2 编码蛋白的信号肽预测; 采用 TMHMM1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepTMHMM-1.0/>) 在线工具对 AsMAPK1 和 AsMAPK2 基因编码蛋白进行跨膜结构域预测; 利用 Cell-PLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/>) 在线分析工具, 对 AsMAPK1 和 AsMAPK2 基因编码的蛋白进行亚细胞定位预测; 利用 PRABI 网站 (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>) 中的 SOPMA 工具 (<https://npsa.lyon.inserm.fr>) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 网站, 对 AsMAPK1 和 AsMAPK2 基因编码蛋白的二级、三级结构进行预测。利用 MEGA 11 软件, 采用其内置的 MUSCLE 算法对 AsMAPK1 和 AsMAPK2 以及从 TAIR 数据库获取的拟南芥全部 20 个 MAPK 家族成员的氨基酸全长序列进行了多序列比对。随后, 基于比对结果, 使用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 并通过 1 000 次重复抽样计算自举值 (Bootstrap value) 以评估系统发育树节点的

的可靠性。

2.4 原核表达载体的构建

为了对 AsMAPK1 和 AsMAPK2 基因进行原核表达, 利用无缝克隆的方式进行重组蛋白表达载体的构建。设计带同源臂的扩增引物, 以测序正确的 MAPK-T 质粒载体作为模板进行 PCR 克隆。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收, 获得带同源臂的 MAPK 基因片段; 利用 BamHI 和 XhoI 酶双酶切构建 PGEX4T-1 线性化载体。PCR 产物和线性化载体采用无缝克隆试剂盒进行连接, 连接产物采用热激法转入感受态大肠杆菌 DH5 α , 涂布于含氨苄霉素的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后挑取单菌落于 1 mL 氨苄抗性 LB 液体培养基培养后, 进行菌液 PCR 验证, 挑选 PCR 阳性的新鲜菌液送至上海生工生物工程股份有限公司。

2.5 重组蛋白的表达及诱导条件优化

为获得大量 MAPK 蛋白以进行后续功能研究, 将上述构建成功的重组质粒 pGEX4T-1-MAPK 转化至表达宿主菌 BL21 (DE3) 中, 并对其诱导表达条件 (诱导温度、IPTG 浓度、诱导时间) 进行优化。

2.5.1 诱导温度 将含有 pGEX4T-1-AsMAPK 重组质粒的 BL21 (DE3) 阳性单克隆接种于含氨苄霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养过夜。再按 1:100 的比例扩大培养至新鲜 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至菌液 A_{600} 值达到 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 为探究不同诱导温度及其对应的常用诱导时间对目的蛋白可溶性表达的影响, 分别在 16 $^{\circ}$ C 诱导 16 h, 25 $^{\circ}$ C 诱导 8 h, 37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h 诱导。诱导结束后, 低温离心收集菌体后用 PBS 重悬, 冰浴下超声破碎, 留存部分作为总蛋白, 剩余低温离心后吸取上清, 沉淀部分用 PBS 重悬。取总蛋白、上清、沉淀液加入蛋白上样缓冲液, 金属浴变性后分别制成全菌、上清及沉淀的蛋白样品。

2.5.2 诱导时间及 IPTG 浓度 在已确定的最佳温度下, 对最适 IPTG 浓度及诱导时间也进行了条件摸索, 分别设置了 0.1、0.5、1.0 mmol/L 3 个 IPTG 浓度梯度, 并在每个浓度下设置了 4、8、16 h 3 个诱导时间点, 以探究其协同作用对蛋白表达量和可溶性的影响。诱导结束后收集菌体, 如上述进行蛋白样品制备。

以转化了空载 pGEXT-1 的 BL21 (DE3) 表达菌及目的基因表达菌不加 IPTG 作为阴性对照, 采

取同样的处理方法, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳检测后, 经“染立显”染色后观察蛋白表达情况。

2.5.3 蛋白纯化 在已确定最佳诱导条件的基础上, 进行 AsMAPK1 和 AsMAPK2 蛋白的纯化。将诱导结束后的菌液在 4 °C 下离心收集菌体, 按原菌液: 裂解液=10:1 比例预冷的裂解液 (NaCl 140 mmol/L、KCl 2.7 mmol/L、Na₂HPO₄ 10 mmol/L、KH₂PO₄ 1.8 mmol/L, pH 7.3) 重悬。在冰浴条件下进行超声破碎 (功率 230 W, 工作 3 s, 间歇 2 s, 总时长 15 min), 待悬液由浑浊变成澄清透亮时, 表示菌体基本破碎完全。破碎后的菌体 4 °C 条件下离心分离上清和沉淀。后续按照 BeyoGold™ GST-tag Purification Resin 说明书进行蛋白纯化操作, 分别收集流出组分、洗杂组分和洗脱组分以及原始样品, 通过 10% 的 SDS-PAGE 电泳分析。将洗脱得到的蛋白溶液用超滤法浓缩并置换至已过滤除菌的 TBS 缓冲液中, 分装后于 -80 °C 保存备用。

2.6 亚细胞定位

以测序完成的 MAPK-T 质粒作为模板, 设计带同源臂的引物通过 PCR 扩增目的片段后回收, 方法与上述一致。产物片段和亚细胞定位载体 pSYB03-EGFP 通过无缝克隆体系进行连接构建重组载体 pSYB03-EGFP-AsMAPK1/2, 并与上述操作一致进行大肠杆菌 DH5 α 转化、菌落 PCR 及测序验证。取测序结果正确的重组质粒通过转化拟南芥原生质体, 具体参照文献方法^[24]进行, 取 3~4 周龄拟南芥幼叶若干, 加入 5~10 mL 含 1.5% 纤维素酶 R10 的酶解液于 24 °C 静置酶解 4 h。经 W5 溶液洗涤后, 获得叶肉原生质体。取 100 μ L 原生质体, 加入 10 μ g 质粒 DNA 与 110 μ L 40% PEG 4000 溶液, 轻柔混合后室温孵育 10~15 min。反应终止后, 收集原生质体并于 1 mL W5 溶液中培养 18~24 h, 去上清, 留 100 μ L 左右的原生质体于激光共聚焦显微镜下观察荧光情况。pSYB03-EGFP 空载体也进行上述操作作为阴性对照。

2.7 激酶活性分析

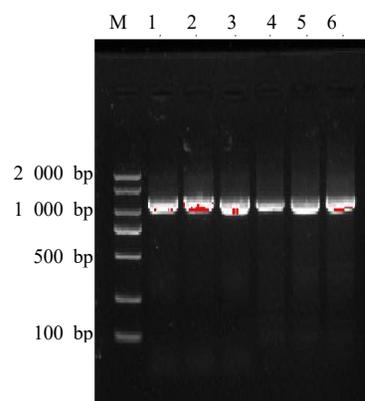
为了验证表达的 2 个 MAPK 蛋白是否具有激酶活性, 以髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 为底物, 与纯化得到的 MAPK 蛋白共同加入到体外磷酸化反应体系: 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、20 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L EGTA、1 mmol/L DTT、0.2 mmol/L ATP、1 \times 磷酸酶抑制剂, 总体系 50 μ L, 在 30 °C 金属浴下孵育 90 min, 最后加入

12.5 μ L 5 \times SDS-PAGE 样品 loading buffer 终止反应, 金属浴高温变性后, 通过 12% Phos-tag SDS-PAGE 凝胶分离, “染立显”染色观察条带变化情况。

3 结果与分析

3.1 CDS 克隆及测序

以白木香 cDNA 为模板, 经 PCR 扩增后 2 个基因均能得到明显单一条带 (图 1), 且条带位置参照 Marker 指示大小与预测的大小一致, 其中 AsMAPK1 基因长为 1 188 bp, 编码 395 个氨基酸; AsMAPK2 基因长为 1 128 bp, 编码 375 个氨基酸。AsMAPK1 和 AsMAPK2 的核苷酸序列及对应氨基酸序列见图 2。



M-Marker; 1—3-AsMAPK1; 4—6-AsMAPK2.

图 1 AsMAPK1 和 AsMAPK2 的 CDS 扩增

Fig. 1 CDS amplification of AsMAPK1 and AsMAPK2

3.2 生物信息学分析

3.2.1 AsMAPK1 及 AsMAPK2 基因的进化树分析 为了确定 AsMAPK1 和 AsMAPK2 的进化关系及其所属亚族, 利用其氨基酸全长序列与拟南芥 MAPK 家族的所有成员进行了多序列比对并构建了系统发育树。系统发育分析结果表明 (图 3), AsMAPK1 和 AsMAPK2 分别属于 MAPK 家族的 Group A 和 Group B。如图 3 所示, 系统发育树将 MAPK 家族清晰地划分为 4 个主要进化枝 (Group A~D), 这与先前的研究报道一致。值得注意的是, AsMAPK1 在系统发育关系上与拟南芥基因 AtMAPK6 最为接近, 而 AsMAPK2 则与 AtMAPK13 亲缘关系更近, 该分类为推测其功能奠定了基础。值得一提的是, 本研究构建的系统发育树中, 部分非研究目标分支的自展支持率较低 (如 Group D 分支中自展值 \approx 48%)。这可能是由于在拟南芥 D 组 MAPK 序列分化程度较高、序列保守性较低问题所致。然而, 这些不确定性仅限于树中特定区域, 并不影响本研究关注的核心分支 (Group A 和 Group B) 的拓扑结

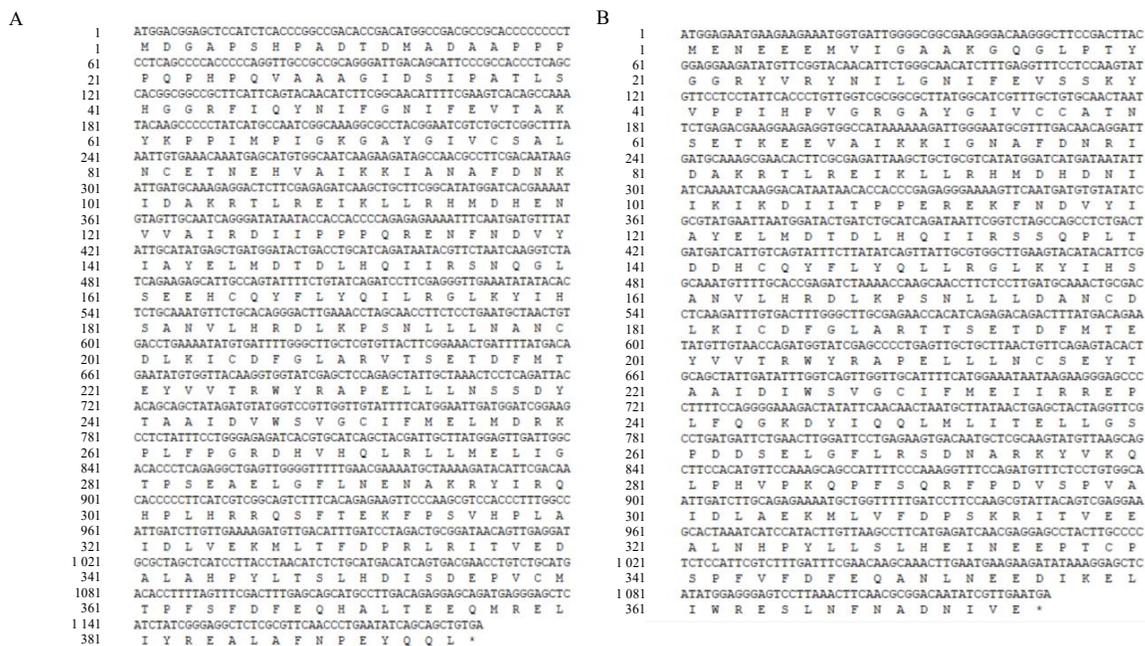


图2 AsMAPK1 (A) 和 AsMAPK2 (B) 的核苷酸序列及对应氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of AsMAPK1 (A) and AsMAPK2 (B)

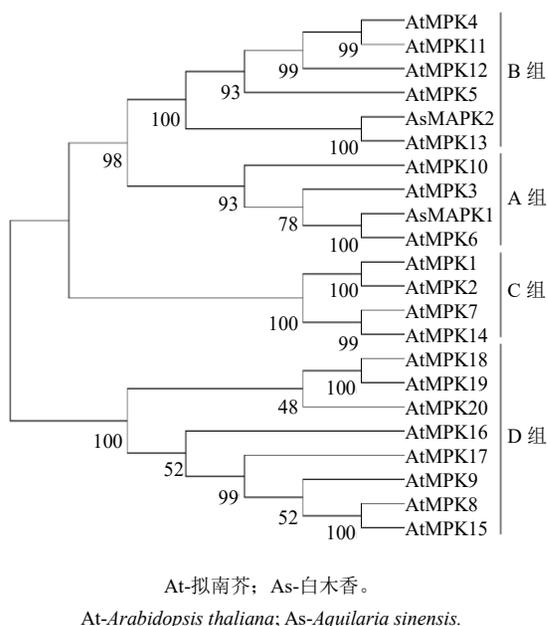


图3 AsMAPK1 和 AsMAPK2 与拟南芥 20 条 MAPK 基因的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of AsMAPK1 and AsMAPK2 with 20 MAPK genes from *A. thaliana*

表2 AsMAPK1 和 AsMAPK2 的理化性质分析

Table 2 Physicochemical characterization of AsMAPK1 and AsMAPK2

基因名	编码蛋白分子式	氨基酸数目/aa	相对分子质量	PI	不稳定系数	脂肪系数	GRAVY
<i>AsMAPK1</i>	C ₂₀₂₄ H ₃₁₄₀ N ₅₁₃ O ₅₇₅ S ₁₉	395	45 163.67	5.61	37.30	90.43	-0.277
<i>AsMAPK2</i>	C ₁₉₃₉ H ₃₀₂₇ N ₅₈₇ O ₆₁₈ S ₁₆	375	43 238.42	5.09	47.87	94.64	-0.313

构。目的基因 *AsMAPK1* 和 *AsMAPK2* 所在支系的高支持率 (100%) 表明, 其系统发育关系在统计学上是可靠的, 足以支持后续的功能与进化分析。

3.2.2 AsMAPK1 和 AsMAPK2 基因编码蛋白的理化性质分析 利用 ExPASy-ProtParam tool 预测 *AsMAPK1* 与 *AsMAPK2* 蛋白的理化性质, 汇总于表 2。结果表明, *AsMAPK1* 和 *AsMAPK2* 分别编码 395、375 个氨基酸, 理论蛋白质分子式分别为 C₂₀₂₄H₃₁₄₀N₅₁₃O₅₇₅S₁₉、C₁₉₃₉H₃₀₂₇N₅₈₇O₆₁₈S₁₆, 理论相对分子质量分别为 45 163.67、43 238.42, 理论等电点 (PI) 分别为 5.61、5.09, 故推断 MAPK1 与 MAPK2 均为酸性蛋白质。蛋白的稳定性是根据蛋白的不稳定系数分析判断的, MAPK1 与 MAPK2 的不稳定系数预测值分别为 37.30、47.87, 表明 MAPK1 蛋白比 MAPK2 蛋白更为稳定。相对较高的脂肪系数可以维持蛋白质良好的稳定性, 有助于在不同环境中发挥正常的功能, MAPK1 和 MAPK2 蛋白的脂肪系数预测值分别为 90.43、94.64, 推测其蛋白具有良好的稳定性, 可以正常发挥 MAPK

的功能。MAPK1 和 MAPK2 蛋白的总平均亲水系数 (GRAVY) 预测值分别为-0.277 与-0.313, 推测其均为疏水蛋白。

3.2.3 AsMAPK1 和 AsMAPK2 编码蛋白信号肽、跨膜区和亚细胞定位预测 运用 SignalP 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 进行目的基因 MAPK1 与 MAPK2 编码蛋白的信号肽预

测。结果表明 (图 4), MAPK1 蛋白和 MAPK2 蛋白都没有信号肽, 都是非分泌蛋白。

运用在线软件 TMHMM1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepTMHMM-1.0/>) 对 AsMAPK1 和 AsMAPK2 基因编码蛋白跨膜区进行预测。结果汇总见图 5, 可知 MAPK1 蛋白与 MAPK2 蛋白均位于膜内, 不存在跨膜区。

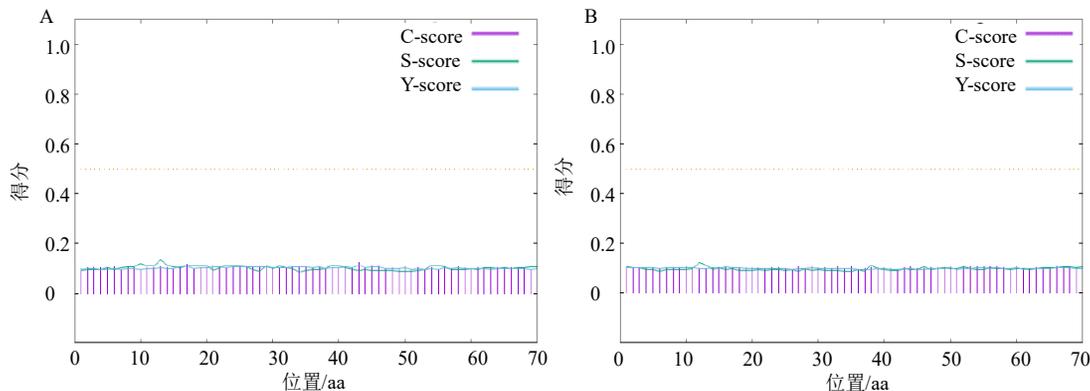


图 4 AsMAPK1 (A) 和 AsMAPK2 (B) 蛋白的信号肽预测

Fig. 4 Prediction of signal peptides in AsMAPK1 (A) and AsMAPK2 (B)

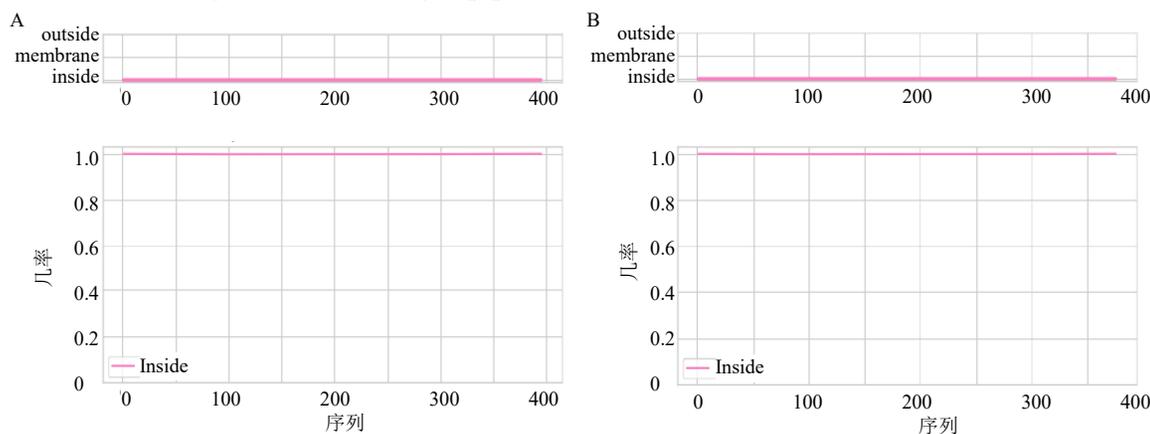


图 5 AsMAPK1 (A) 和 AsMAPK2 (B) 蛋白的跨膜区预测

Fig. 5 Prediction of transmembrane domains in AsMAPK1 (A) and AsMAPK2 (B)

利用 Cell-PLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/>) 在线分析工具, 对 AsMAPK1 和 AsMAPK2 基因编码的蛋白进行亚细胞定位预测, 结果表明二者均最可能定位于细胞核。

3.2.4 白木香 MAPK 家族目的基因编码蛋白的二级、三级结构预测 运用在线分析工具 SOPMA (<https://npsa.lyon.inserm.fr>) 预测 MAPK1 与 MAPK2 蛋白的二级结构。结果表明 (图 6), 蛋白 MAPK1 的 α -螺旋结构共计 160 个氨基酸, 占比 40.51%; 延伸主链结构共计 50 个氨基酸, 占比 12.66%, 无规则卷曲结构共计 185 个氨基酸, 占比 46.84%; 蛋白

MAPK2 的 α -螺旋结构共计 161 个氨基酸, 占比 42.93%; 延伸主链结构共计 51 个氨基酸, 占比 13.60%; 无规则卷曲结构共计 163 个氨基酸, 占比 43.47%。无规则卷曲和 α -螺旋是构成二级结构最主要的方式。

运用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 进行白木香 MAPK 目的基因蛋白的三级结构预测 (图 7)。结果表明, 蛋白 MAPK1 和 MAPK2 的三级结构均接近球形, 其主要类型为无规则卷曲, 且 α -螺旋所占比例较多。其三级结构符合二级结构的推测。

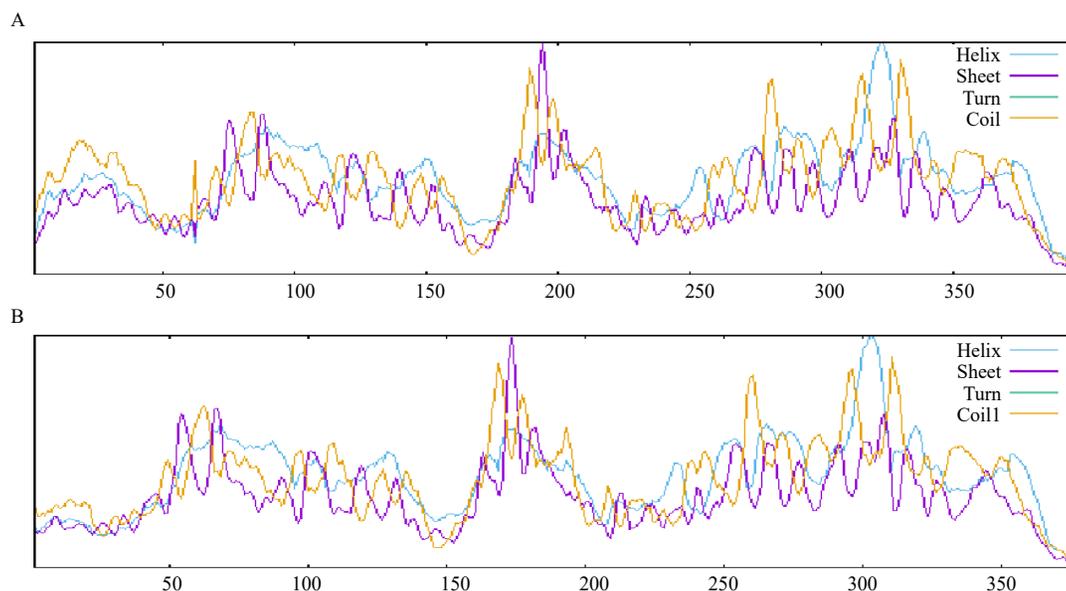


图6 AsMAPK1 (A) 和 AsMAPK2 (B) 蛋白的二级结构预测
Fig. 6 Prediction of secondary structures in AsMAPK1 (A) and AsMAPK2 (B)

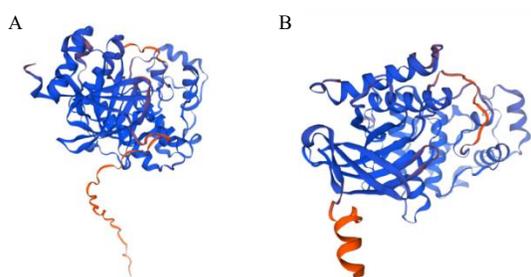


图7 AsMAPK1 (A) 和 AsMAPK2 (B) 蛋白的三级结构预测
Fig. 7 Prediction of tertiary structures of AsMAPK1 (A) and AsMAPK2 (B)

3.3 原核表达载体的构建与蛋白表达

为获得 AsMAPK1 和 AsMAPK2 基因的重组表达菌株,本研究采用无缝克隆技术成功构建了重组表达载体 pGEX4T-1-MAPK,并转化至 BL21(DE3) 感受态细胞中,并对原核表达的诱导温度、IPTG 浓度及诱导时间等关键参数进行了系统优化。

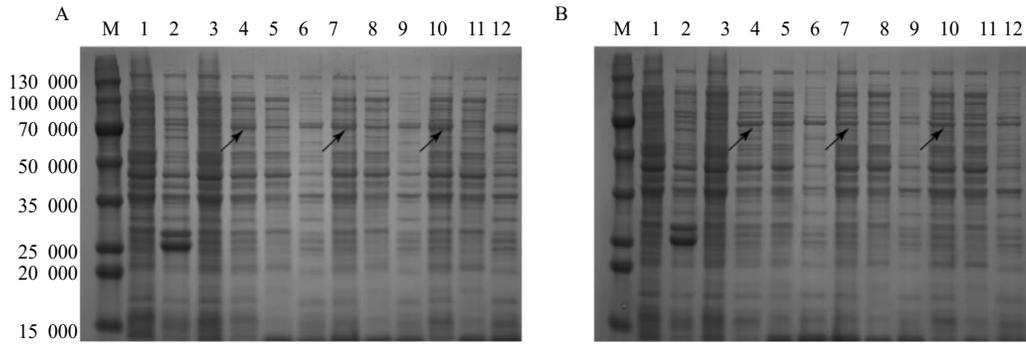
3.3.1 诱导温度 首先在不同温度(16、25、37 °C)下诱导表达重组蛋白。SDS-PAGE 分析结果显示(图8),目的蛋白 MAPK1(约 71 000)及 MAPK2(70 000)在所有诱导温度下均有表达。然而,其可溶性存在稍许差异:对于 MAPK1 蛋白,37 °C 诱导时,目的蛋白主要存在于包涵体沉淀(12 泳道)中;而在 25 °C 和 16 °C 诱导时,上清(5、8 泳道)中可溶性蛋白的比例显著增加,其中 25 °C 诱导产生

的可溶性蛋白量最高。因此,初步确定 25 °C 为 MAPK1 较优的诱导温度。而对于 MAPK2,可以发现 16 °C 诱导时其蛋白表达及可溶性最高,故确定 16 °C 为 MAPK2 的最佳诱导温度。

3.3.2 诱导时间及 IPTG 浓度 前述实验已确定 AsMAPK1 及 AsMAPK2 分别在 25、16 °C 下诱导有利于可溶性表达。在此基础上,为进一步优化蛋白表达效率,本研究对 IPTG 浓度和诱导时间进行了联合优化。结果如图 9 所示,其中 A~C 为 AsMAPK1 分别在 3 个 IPTG 浓度下的蛋白表达情况,D~F 展示 AsMAPK2 的蛋白表达情况。不同终浓度 IPTG 诱导下的蛋白表达量相近。在固定 IPTG 终浓度的情况下(0.5 mmol/L 为例),随着诱导时间从 4 h 延长至 16 h,目的蛋白的表达量逐渐增加,见图 9-B。综合蛋白表达量及可溶性情况,确定 AsMAPK1 及 AsMAPK2 在 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L,诱导 16 h 时蛋白表达量高且可溶性蛋白量相对较多。

综上所述,通过条件优化,确定 MAPK1 重组蛋白的最佳诱导表达条件为:温度 25 °C、IPTG 浓度 0.1 mmol/L、诱导时间 16 h;MAPK2 重组蛋白的最佳诱导表达条件为:温度 16 °C、IPTG 浓度 0.1 mmol/L、诱导时间 16 h。在此条件下,可获得大量高表达的可溶性目的蛋白。

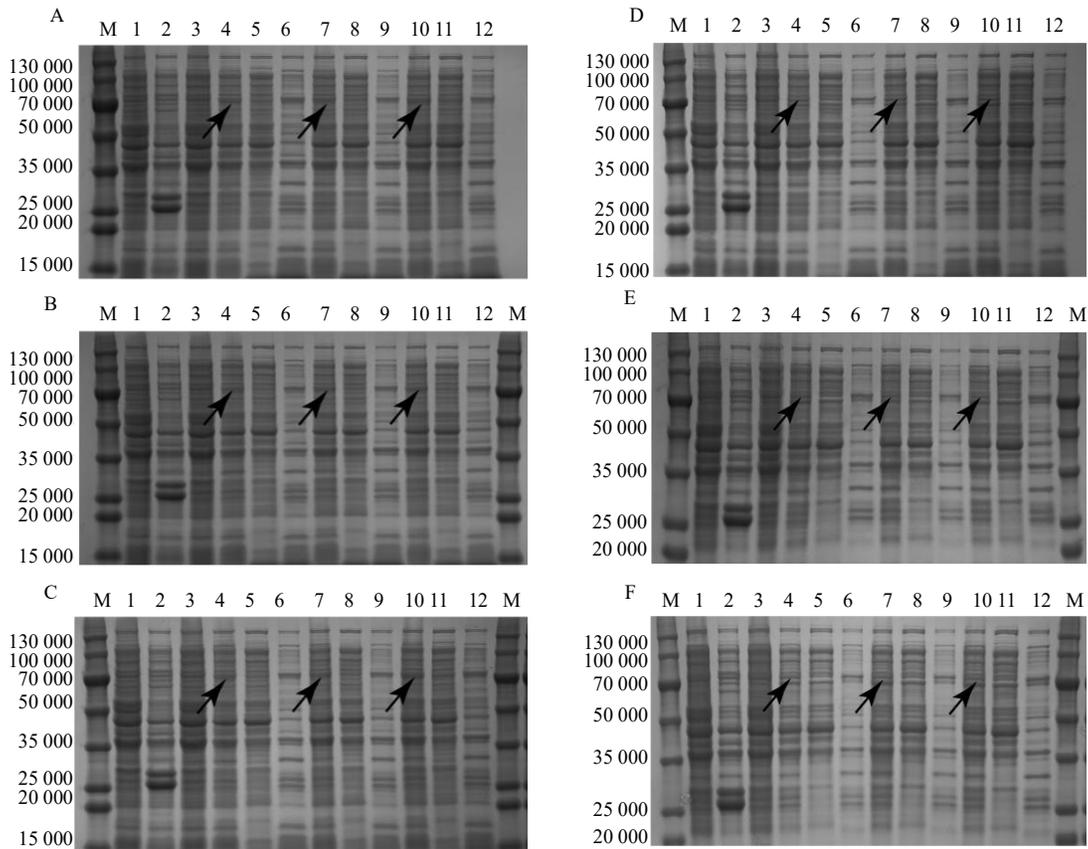
3.3.3 蛋白纯化 AsMAPK1 及 AsMAPK2 蛋白纯化



M-Marker; 1-空载未诱导全菌; 2-空载诱导全菌; 3-AsMAPK1/2 未诱导全菌; 4~6-16 °C 诱导全菌、上清、沉淀; 7~9-25 °C 诱导全菌、上清、沉淀; 10~12-37 °C 诱导全菌、上清、沉淀。
M-Marker; 1-Vector-PTG; 2-Vector+IPTG; 3-AsMAPK1/2-IPTG; 4~6-12-AsMAPK1/2+IPTG at 16 °C; 7~9-12-AsMAPK1/2+IPTG at 25 °C; 10~12-AsMAPK1/2+IPTG at 37 °C; For each temperature, samples are: total lysate, supernatant, and pellet, respectively.

图 8 AsMAPK1 (A) 和 AsMAPK2 (B) 蛋白表达及最佳诱导温度探究

Fig. 8 Expression and optimization of induction temperature for AsMAPK1 (A) and AsMAPK2 (B)



A~C-AsMAPK1 蛋白诱导 IPTG 终浓度分别为 0.1、0.5、1mmol/L; D~F-AsMAPK2 蛋白诱导 IPTG 终浓度分别为 0.1、0.5、1 mmol/L; 1-空载未诱导全菌; 2-空载诱导全菌; 3-AsMAPK1/2 未诱导全菌; 4~6-诱导 4h 全菌、上清、沉淀; 7~9-诱导 8h 全菌、上清、沉淀; 10~12-诱导 16 h 全菌、上清、沉淀; M-Marker。

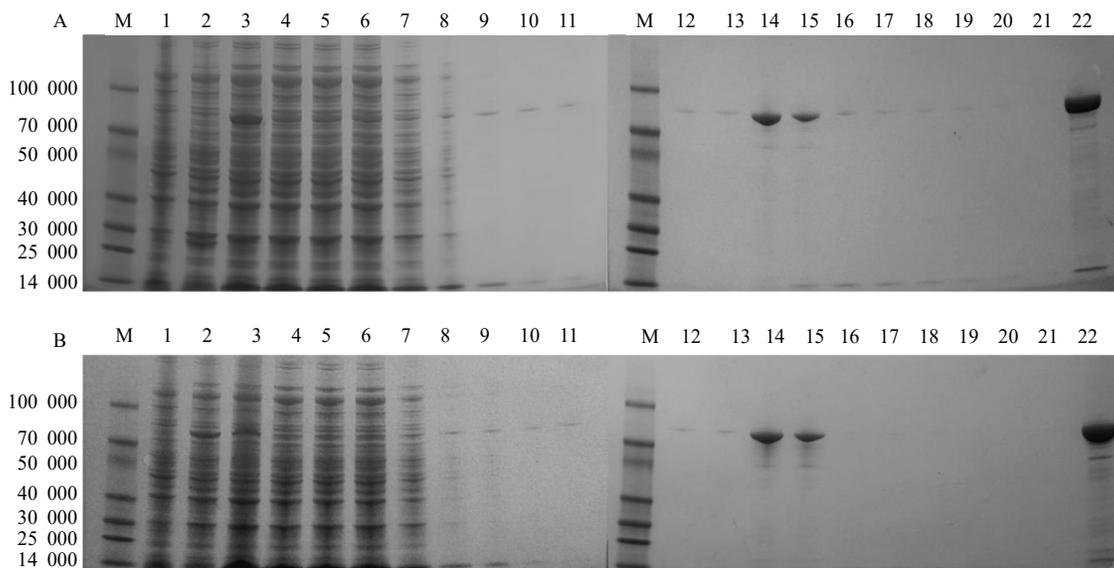
A~C-AsMAPK1 induced with 0.1, 0.5, and 1.0 mmol/L IPTG, respectively. D~F-AsMAPK2 induced with 0.1, 0.5, and 1.0 mmol/L IPTG, respectively. 1-no-load induce the whole bacteria; 2-no-load induction of whole bacteria; 3-AsMAPK1/2 did not induce the whole bacteria; 4~6-induced complete bacteria, supernatant and precipitation for 4 hours; 7~9-induced whole bacteria, supernatant and precipitation for 8 hours; 10~12-induced whole bacteria, supernatant and precipitation for 16 h; M-Marker.

图 9 AsMAPK1 和 AsMAPK2 蛋白最适诱导时间及 IPTG 浓度探究

Fig. 9 Optimization of induction time and IPTG concentration for expression of AsMAPK1 and AsMAPK2

过程中各组分的检测情况如图 10 所示,裂解上清与柱填料结合后,流穿液中有少量未结合蛋白(泳道 5、6)。经过洗涤(泳道 7~13)后,大部分杂蛋白被有效去除。最后用含 10 mmol/L GSH 的缓

冲液洗脱,获得了高纯度的目的蛋白(泳道 14~21)。结果显示,洗脱并超滤浓缩后得到的蛋白产物在预期大小处呈明显清晰条带,表明纯化效果良好。



M-Marker; 1-未诱导全菌; 2-诱导全菌; 3-诱导后上清; 4-诱导后沉淀; 5、6-上柱后流穿液; 7~13-洗涤液; 14~21-洗脱液; 22-超滤后产物。
1-uninduced total lysate; 2-induced total lysate; 3-Soluble fraction (supernatant); 4-insoluble fraction (pellet); 5, 6-Column flow-through; 7-13-Wash fractions; 14-21-elution fractions; 22-concentrated purified protein (after ultrafiltration).

图 10 AsMAPK1 (A) 及 AsMAPK2 (B) 蛋白纯化

Fig. 10 Purification of AsMAPK1 (A) and AsMAPK2 (B)

3.4 亚细胞定位

为了确定 MAPK 蛋白定位在哪个细胞器发挥功能,构建了 pSYB03-EGFP-MAPK 亚细胞定位载体。结果如图 11 所示,对照空载体 pSYB03-EGFP 转化的原生质体中,EGFP 荧光信号均匀分布于整个细胞,包括细胞核和细胞质。在转染了 pSYB03-EGFP-MAPK 的实验组原生质体中,观察到 GFP 通道下,AsMAPK1-EGFP 和 AsMAPK2-EGFP 融合蛋白的绿色荧光信号同时存在于细胞核和细胞质区域,且未与叶绿素自发荧光共定位,排除了其定位于叶绿体的可能性。说明细胞质和细胞核是 AsMAPK1 和 AsMAPK2 发挥功能的亚细胞器,这也契合植物中 MAPK 作为信号转导枢纽的核心特性:在静息时主要位于细胞质,在被上游信号激活后转位到细胞核磷酸化转录因子调控基因表达,完成功能后再返回细胞质。

3.5 激酶活性分析

Phos-tagTM SDS-PAGE 能够对磷酸化蛋白具有高分离度。如图 12 所示,对于 AsMAPK1 (1~3 泳道),在仅包含 AsMAPK1 和 MBP 的完整反应体系

中(第 1 泳道),观察到一个强烈的、迁移滞后的 MBP 磷酸化信号条带(标为“p-MBP”)。该条带的出现表明 MBP 发生了磷酸化。为了验证该信号的特异性,设置了 2 个关键对照组。首先,在反应体系中加入 λ 磷酸酶(第 2 泳道)。正如预期的那样,磷酸酶的加入完全消除了 p-MBP 信号,这表明 Phos-tag 胶所检测到的迁移滞后确实是由 MBP 的磷酸化所引起,而非其他形式的修饰或假象。其次,为了排除实验中所使用的 GST-MAPK 蛋白中存在的 GST 蛋白标签所带来的影响,使用空载的 GST 蛋白进行了平行实验(第 7~9 泳道)。在该对照组中,未检测到任何 MBP 磷酸化信号。这一结果确证了观察到的激酶活性完全来源于 AsMAPK 本身,而非共纯化的杂质激酶或 GST 标签。此外,作为阴性对照的 MBP 底物自身(第 10 泳道)也未显示任何磷酸化信号,排除了 MBP 自身磷酸化的可能性。AsMAPK2(泳道 4~6)同上。综上所述,这些数据明确证明了纯化的 AsMAPK1 及 AsMAPK2 在体外均具有高效的激酶活性,能够直接磷酸化 MBP 底物。

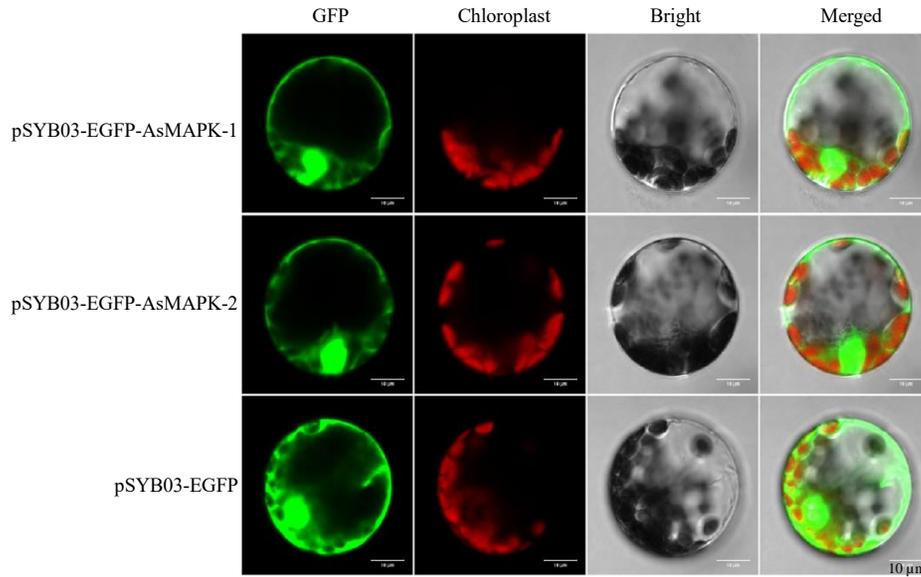


图 11 AsMAPK1-GFP 和 AsMAPK2-GFP 重组蛋白亚细胞定位

Fig. 11 Subcellular localization of AsMAPK1-GFP and AsMAPK2-GFP recombinant proteins

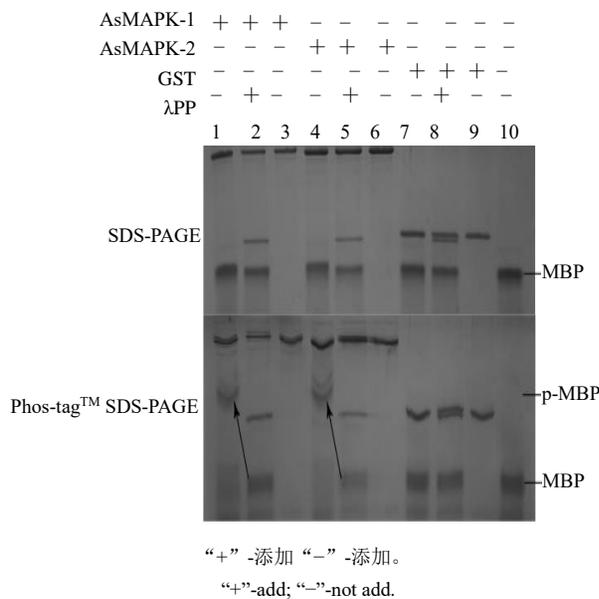


图 12 AsMAPK1 和 AsMAPK2 的激酶活性验证

Fig. 12 Validation of kinase activity of AsMAPK1 and AsMAPK2

4 讨论

MAPK 是参与植物响应胁迫、调控生长发育的重要蛋白激酶，但在白木香中的研究尚属空白。本研究从白木香中克隆了 2 个与沉香倍半萜合成关键转录因子 WRKY44^[23]互作的 MAPK 基因，暂命名为 *AsMAPK1* 和 *AsMAPK2*，并对其进行了系统的生物信息学、诱导表达及激酶活性分析。

根据系统进化关系、激活环的序列和生物学功能，拟南芥中的 20 个 *AtMAPK* 基因被分为 A、B、C、D 4 个主要组别^[10]。其中，A 组和 B 组是研究

最深入、功能最为核心的 2 个组，均能参与植物的免疫和非生物胁迫应答，并在植物的生长发育中发挥重要作用。通过系统进化分析，可知 *AsMAPK1* 与拟南芥中的 *AtMPK3/6* 聚为一支，属于 A 组 MAPK，而 *AsMAPK2* 则与 *AtMPK13* 归为一支同属于 B 组。在拟南芥中，已证实 *AtMPK3/6* 通路被广泛报道参与病原菌应答、活性氧产生及激素信号转导^[25-28]，暗示 *AsMAPK1* 在白木香中可能也具有相似的功能；对于 *AtMAPK13* 目前研究相对较少，主要集中在植物生长发育方面如侧根形成的研究^[29-30]。亚细胞定位结果表明，*AsMAPK1-GFP* 和 *AsMAPK2-GFP* 在细胞质和细胞核中均有分布。目前已有大量研究发现许多 MAPK 都存在细胞质和细胞核中的定位^[31-35]，表明了该基因特别的核质穿梭调节方式，这种动态的核质穿梭是其将胞外信号高效传递至细胞核以启动转录调控的关键机制。体外激酶实验成功检测到 *AsMAPK1* 和 *AsMAPK2* 重组蛋白的自磷酸化活性及对通用底物 MBP 的磷酸化能力，这从生化水平直接证实了二者是具有功能的蛋白激酶。综上所述，本研究鉴定 *AsMAPK1* 和 *AsMAPK2*，尽管同属 MAPK 家族，但在序列、进化地位及表达上均存在一定差异，但它们都具有激酶活性。这些特性差异提示二者在白木香体内可能承担着不同的信号传导职责。

白木香最独特的生物学过程是其在受到各种伤害后（如凿洞、打钉、接菌、火焰等）诱导沉香的形成。已知 MAPK 通路是植物损伤和病原应答的

核心信号模块。因此,值得思考的是,AsMAPK1和AsMAPK2是否参与了沉香形成的早期信号事件?它们是否通过调控萜类合成关键转录因子活性或酶基因的表达来影响沉香树脂的合成?需要指出的是,本研究主要是在体外对AsMAPK1/2的激酶活性进行了验证,缺乏对这2个基因在白木香中所发挥功能的确切研究。后续研究将包括:在白木香体内检测AsMAPK1/2在损伤、MeJA处理或病原菌侵染下的表达模式;进一步通过互作验证及体内外磷酸化实验对这2个激酶与转录因子WRKY44进行激酶底物验证,明确该磷酸化在参与沉香倍半萜合成中所扮演的“角色”,最终构建完整的沉香形成分子调控机制网络。这些工作将为了解MAPK信号通路在珍稀药用植物次生代谢调控中的作用开辟新的视角。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李林海, 寿海洋, 马清温. 土沉香(瑞香科)的地理分布研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(17): 9254-9256.
- [2] 张争, 杨云, 魏建和, 等. 白木香结香机制研究进展及其防御反应诱导结香假说[J]. 中草药, 2010, 41(1): 156-159.
- [3] Li W, Chen H Q, Wang H, et al. Natural products in agarwood and *Aquilaria* plants: Chemistry, biological activities and biosynthesis [J]. *Nat Prod Rep*, 2021, 38(3): 528-565.
- [4] Wang S, Yu Z X, Wang C H, et al. Chemical constituents and pharmacological activity of agarwood and *Aquilaria* plants [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 342.
- [5] 雷胃熙, 吴泽青, 林励, 等. 生物诱导法所产不同部位沉香挥发油成分分析[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(1): 106-113.
- [6] 林峰, 戴好富, 王辉, 等. 两批接菌法所产沉香挥发油化学成分的气相色谱-质谱联用分析[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(8): 1901-1902.
- [7] Liu Y Y, Chen H Q, Yang Y, et al. Whole-tree agarwood-inducing technique: An efficient novel technique for producing high-quality agarwood in cultivated *Aquilaria sinensis* trees [J]. *Molecules*, 2013, 18(3): 3086-3106.
- [8] Jiang M, Zhang Y Z, Li P, et al. Mitogen-activated protein kinase and substrate identification in plant growth and development [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2744.
- [9] Xu J, Zhang S Q. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development [J]. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(1): 56-64.
- [10] Zhang M M, Zhang S Q. Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling [J]. *J Integr Plant Biol*, 2022, 64(2): 301-341.
- [11] Mao G H, Meng X Z, Liu Y D, et al. Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(4): 1639-1653.
- [12] Meng X Z, Xu J, He Y X, et al. Phosphorylation of an ERF transcription factor by *Arabidopsis* MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(3): 1126-1142.
- [13] Kishi-Kaboshi M, Seo S, Takahashi A, et al. The MAMP-responsive MYB transcription factors MYB30, MYB55 and MYB110 activate the HCAA synthesis pathway and enhance immunity in rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(5): 903-915.
- [14] Zhang D, Jiang S, Pan J, et al. The overexpression of a maize mitogen-activated protein kinase gene (ZmMPK5) confers salt stress tolerance and induces defence responses in tobacco [J]. *Plant Biol*, 2014, 16(3): 558-570.
- [15] Long L, Gao W, Xu L, et al. GbMPK3, a mitogen-activated protein kinase from cotton, enhances drought and oxidative stress tolerance in tobacco [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2014, 116(2): 153-162.
- [16] Wu J, Liang X Y, Lin M, et al. Comprehensive analysis of MAPK gene family in *Populus trichocarpa* and physiological characterization of PtMAPK3-1 in response to MeJA induction [J]. *Physiol Plant*, 2023, 175(1): e13869.
- [17] Hann C T, Ramage S F, Negi H, et al. Dephosphorylation of the MAP kinases MPK6 and MPK3 fine-tunes responses to wounding and herbivory in *Arabidopsis* [J]. *Plant Sci*, 2024, 339: 111962.
- [18] Zhou J G, Mu Q, Wang X Y, et al. Multilayered synergistic regulation of phytoalexin biosynthesis by ethylene, jasmonate, and MAPK signaling pathways in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2022, 34(8): 3066-3087.
- [19] Qu R J, Wang S W, Wang X X, et al. The jasmonate-responsive SmMPK3-SmWRKY33 module positively regulates tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Plant Biotechnol J*, 2026, 24(2): 384-401.
- [20] Xu Y H, Zhang Z, Wang M X, 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.
- [21] Sun P W, Xu Y H, Yu C C, et al. AsWRKY44 represses the wound-induced sesquiterpene biosynthetic gene *ASS1* expression in *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg [J]. *J Exp*

- Bot, 2019: erz469.
- [22] Xu Y H, Lv F F, Sun P W, *et al.* Cloning and functional analysis of the promoter of the sesquiterpene synthase gene *ASS1* in *Aquilaria sinensis* [J]. *Biologia Plant*, 2021, 65: 60-67.
- [23] 刘娟, 韩晓敏, 梁良, 等. 濒危南药白木香悬浮细胞体系的建立 [J]. *药学学报*, 2014, 49(8): 1194-1199.
- [24] Yoo S D, Cho Y H, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(7): 1565-1572.
- [25] Zhang S, Klessig D F. MAPK cascades in plant defense signaling [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(11): 520-527.
- [26] Bigeard J, Colcombet J, Hirt H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI) [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(4): 521-539.
- [27] Frei dit Frey N, Garcia A V, Bigeard J, *et al.* Functional analysis of *Arabidopsis* immune-related MAPKs uncovers a role for MPK3 as negative regulator of inducible defences [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(6): R87.
- [28] Pitzschke A, Datta S, Persak H. Salt stress in *Arabidopsis*: Lipid transfer protein AZI1 and its control by mitogen-activated protein kinase MPK3 [J]. *Mol Plant*, 2014, 7(4): 722-738.
- [29] Melikant B, Giuliani C, Halbmayr-Watzina S, *et al.* The *Arabidopsis thaliana* MEK AtMKK6 activates the MAP kinase AtMPK13 [J]. *FEBS Lett*, 2004, 576(1/2): 5-8.
- [30] Zeng Q N, Sritubtim S, Ellis B E. AtMKK6 and AtMPK13 are required for lateral root formation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Signal Behav*, 2011, 6(10): 1436-1439.
- [31] Ligterink W, Kroj T, zur Nieden U, *et al.* Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants [J]. *Science*, 1997, 276(5321): 2054-2057.
- [32] Carrasco J L, Castelló M J, Naumann K, *et al.* *Arabidopsis* protein phosphatase DBP1 nucleates a protein network with a role in regulating plant defense [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90734.
- [33] Wang J X, Ding H D, Zhang A Y, *et al.* A novel mitogen-activated protein kinase gene in maize (*Zea mays*), ZmMPK3, is involved in response to diverse environmental cues [J]. *J Integr Plant Biol*, 2010, 52(5): 442-452.
- [34] Liang W W, Yang B, Yu B J, *et al.* Identification and analysis of *MKK* and *MPK* gene families in canola (*Brassica napus* L.) [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 392.
- [35] Liu J Z, Horstman H D, Braun E, *et al.* Soybean homologs of MPK4 negatively regulate defense responses and positively regulate growth and development [J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(3): 1363-1378.

[责任编辑 时圣明]