

白木香 *AsMADS12* 基因克隆、亚细胞定位与表达分析

刘兰舒^{1,2}, 梅文莉^{2,3}, 朱家红^{2,3}, 董文化², 李玉姬², 刘寿柏^{1*}, 戴好富^{2,3*}

1. 海南大学热带农林学院/热带特色林木花卉遗传与种质创新教育部重点实验室, 海南儋州 571737; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/海南省黎药资源天然产物研究与利用重点实验室/沉香国际联合研究中心, 海南海口 571101; 3. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572000

摘要: 白木香 (*Aquilaria sinensis*) 为瑞香科 (Thymelaeaceae) 沉香属 (*Aquilaria*) 植物, 在受到自然因素 (雷劈、火烧、虫蛀等) 或人为因素 (砍伤、打洞、接菌等) 胁迫下会产生沉香。MADS 转录因子在植物生长发育和逆境胁迫响应过程中发挥着重要的转录调控作用, 但其在白木香中的作用尚不清楚。为了解 MADS 在白木香受到伤害后的胁迫响应机制, 本研究基于白木香转录组数据, 绘制表达量热图, 筛选并克隆到一条表达差异较大且表达量较高的 MADS 转录因子 *AsMADS12* 基因, 对其结构域、理化性质、系统发育及蛋白二、三级结构等进行分析, 并通过实时荧光定量 (RT-qPCR) 检测 *AsMADS12* 基因在茉莉酸甲酯处理不同时间后的表达量以及通过浸染洋葱在激光共聚焦显微镜下观察 *AsMADS12* 蛋白亚细胞定位。结果显示: *AsMADS12* 具有完整的开放阅读框, 长度为 678 bp, 可编码 255 个氨基酸, 其编码蛋白的分子量为 25.28 kDa, 拥有典型的 MEF2_{like} MADS 结构域, 属于 MIKC 型转录因子; *AsMADS12* 蛋白的二级结构主要由 52.00% 的 α -螺旋、11.56% 的延伸链和 36.44% 的无规则卷曲组成; 系统进化聚类分析发现 *AsMADS12* 与甜橙 (*Citrus sinensis*) 和枳 (*Citrus trifoliata*) 的 MADS 聚于同一分支; 亚细胞定位试验显示, *AsMADS12* 蛋白定位于细胞核; 实时荧光定量结果表明, 茉莉酸甲酯处理能诱导 *AsMADS12* 基因的表达, 且在处理 24 h 时的表达量最高, 推测 *AsMADS12* 在白木香结香过程中具有潜在作用。本研究首次完成 *AsMADS12* 基因的克隆并开展初步探索, 为后续深入研究其是否参与结香过程, 以及在生物或非生物胁迫响应中的作用奠定基础, 为解析白木香结香的分子调控机制提供理论依据。

关键词: 白木香; *AsMADS12*; 生物信息学; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: S567.19 文献标志码: A

Cloning, Subcellular Localization and Expression Analysis of the Gene *AsMADS12* in *Aquilaria sinensis*

LIU Lanshu^{1,2}, MEI Wenli^{2,3}, ZHU Jiahong^{2,3}, DONG Wenhua², LI Yuji², LIU Shoubai^{1*}, DAI Haofu^{2,3*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / Key Laboratory of Genetics and Germplasm Innovation of Tropical Special Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, Danzhou, Hainan 571737, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Natural Products Research and Development of Li Folk Medicine of Hainan Province / International Joint Research Center of Agarwood, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572000, China

Abstract: *Aquilaria sinensis*, a plant belonging to the genus *Aquilaria* of the Thymelaeaceae family, can produce agarwood when exposed to natural factors (such as lightning strikes, fire, and insect bite) or artificial factors (such as cuts, holes, and inoculation of fungi). MADS is a transcription factor that plays a significant role in plant growth and development and stress response. However, its function in *A. sinensis* remains unclear. To elucidate the stress response of MADS-box genes in *A. sinensis* after injury, this study utilized transcriptomic data derived from *A. sinensis* to expres-

收稿日期 2025-08-15; 接受日期 2025-09-10

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32171747, No. 32460415); 海南省自然科学基金项目 (No. 323CXTD388)。

作者简介 刘兰舒 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学。*通信作者 (Corresponding author): 刘寿柏 (LIU Shoubai), E-mail: liushoubai@hainanu.edu.cn; 戴好富 (DAI Haofu), E-mail: daihaofu@itbb.org.cn。

sion heatmaps and screen for differentially expressed genes, leading to the identification and cloning of a MADS-box encoding gene, designated *AsMADS12*, which exhibited significant differential expression. Comprehensive analyses were subsequently conducted on the domain architecture, physicochemical properties, phylogenetic relationships, and predicted secondary and tertiary structures of *AsMADS12*. The expression dynamics of the *AsMADS12* at various time points after methyl jasmonate (MeJA) treatment were assessed via real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Furthermore, subcellular localization of the *AsMADS12* was determined by transiently expressing in onion epidermal cells (*Agrobacterium*-mediated infiltration) and observing fluorescence under a confocal laser scanning microscope. Sequence and evolutionary analyses revealed that *AsMADS12* possessed a complete open reading frame (ORF) of 678 bp, encoding a protein of 255 amino acids. The predicted molecular weight of the encoded protein was 25.28 kDa. *AsMADS12* contained a typical MEF2-like MADS domain and was classified as a MIKC-type transcription factor. The secondary structure of the protein was mainly composed of 52.00% α -helix, 11.56% extended chain, and 36.44% random coil. Phylogenetic cluster analysis revealed that *AsMADS12* was clustered in the same branch as the MADS of *Citrus sinensis* and *Citrus trifoliata*. The subcellular localization experiment showed that the *AsMADS12* protein was located in the nucleus. The real-time fluorescence quantitative results indicated that methyl jasmonate treatment could induce the expression of *AsMADS12*, and the expression level was the highest at 24 hours after treatment. It was speculated that *AsMADS12* might play a potential role in the formation of agarwood in *A. sinensis*. This study completed the cloning of the gene for the first time and conducted preliminary exploration, laying the foundation for further research on whether it participates in the formation of agarwood and its role in biotic or abiotic stress responses, thereby providing a theoretical basis for understanding the molecular regulatory mechanism of agarwood formation in *A. sinensis*.

Keywords: *Aquilaria sinensis*; *AsMADS12*; bioinformatics; subcellular localization; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.12.005

沉香是瑞香科 (Thymelaeaceae) 沉香属 (*Aquilaria*) 或拟沉香属 (*Gyrinops*) 植物在受到自然因素 (雷劈、风折、虫蛀等) 或人为因素 (砍伤、打洞、接菌等) 的影响下产生的含树脂的芯材^[1]。白木香 [*Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng] 又名土沉香, 是我国药典法定的沉香唯一基原植物, 广泛分布于我国广东、广西、海南、云南等南部地区^[2-3]。沉香是重要的传统药用资源, 其应用历史可追溯至多国传统医学体系, 在中国、印度、日本及东南亚的医学典籍中均有详实记录^[4-5], 该药材具有调理气机、缓解疼痛、温中和胃、抑制呕吐等功效, 适用于胸腹胀痛、咳喘、风湿痹痛、高热不退、肾气亏虚等多种证候^[2]。沉香的核心化学组成为倍半萜类和 2-(2-苯乙基)色酮类化合物, 现代药理学研究揭示沉香既能调节中枢神经功能^[6], 具有抗癌、抗氧化、抗抑郁、抑菌及镇静催眠等作用, 临床上可用于支气管疾病、胃病、冠心病和睡眠障碍等治疗, 同时对糖尿病、阿尔茨海默症等复杂疾病亦有潜在治疗价值^[2, 7-10]。由于沉香兼具药用和经济双重价值, 导致沉香属植物长期遭受过度采伐, 致使其野生种群面临灭绝风险, 现已被收录于《濒危野生动植物种国际贸易公约》附录 II 名录^[11]。因此, 解决沉香资源短缺问题的关键在于全面解析白木香的产香机制、创新结香

技术以及提高产香率, 从而缓解对野生资源的依赖并促进可持续利用。

作为真核生物进化过程中高度保守的转录调控家族, MADS-box 基因家族成员在植物、动物及真菌三大类群中普遍存在, 广泛参与植物生长发育, 且在应对非生物胁迫和调节植物次生代谢产物的合成中发挥重要作用^[12]。研究表明, MADS-box 家族基因可参与调控干旱胁迫、温度胁迫、盐胁迫以及其他非生物胁迫反应^[13]。如番茄 (*Solanum lycopersicum*) MADS-box 家族基因 *SlMADS48* 可与干旱相关基因启动子区结合, 进而响应干旱胁迫^[14]; 小麦 (*Triticum aestivum*) 中多个 MADS-box 家族基因表达与高温诱导有关, 尤其在高温下 *TaMADS26* 的过表达可以提高小麦的耐受性^[15]; 在盐胁迫下过表达水稻 (*Oryza sativa*) *OsMADS25* 能提高水稻种子的发芽率^[16]。此外, MADS-box 家族基因还被证实参与调控植物次生代谢产物的生物合成途径。在油菜种子发育与油脂合成阶段, *AGL11* 呈现一定表达特征^[17], 而云南移 [木衣] (*Docynia delavayi* (Franch.) Schneid) 的 *DdMADS42* 基因表达趋势与其相似, 基于前期研究, 王溪唯等^[18]推测 *DdMADS42* 可能参与油脂的合成。基于上述调控机制, 本研究推测 MADS-box 家族基因可能同样介导了白木香在

受到物理损伤或生物胁迫后的应激响应过程,这种调控作用可能影响沉香次生代谢产物的合成与积累。

本研究基于本课题组已有的白木香转录组数据,结合生物信息学分析,克隆并鉴定 *AsMADS12* 基因,对该基因编码蛋白的理化性质、进化关系、结构特征、亚细胞定位等进行分析,并通过 qPCR 检测其在茉莉酸甲酯处理下的表达趋势,为后续探究 *AsMADS12* 是否参与沉香形成过程,及其在生物与非生物胁迫响应中的作用提供理论基础,有助于解析白木香结香的分子调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料种植于中国热带农业科学院植物园。对白木香茎干进行划伤后用茉莉酸甲酯溶液沾湿棉花进行包裹处理,在处理 0、3、6、24、72、120 h 后采集处理样品进行液氮速冻并研磨成粉,保存于 -80°C 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成 取保存于 -80°C 冰箱的白木香叶片样品,置于液氮中冷冻磨样,提取总 RNA,并通过凝胶电泳检测 RNA 质量,选出清晰、无降解且长度相符的 RNA,测定其浓度,然后使用反转录试剂盒将白木香 RNA 反转录为 cDNA,产物保存于 -80°C 超低温冰箱。

1.2.2 基因的筛选与克隆 结香剂处理能够激活白木香茎干次生代谢物合成并促进沉香的形成。本课题组前期研究中已对白木香茎干进行结香剂处理,并对处理 0、3、6、9 d 后的白木香茎干进行采样,经转录组测序得到白木香转录组数据^[19]。根据白木香转录组数据库筛出候选 MADS-box 基因,设计引物(表 1),以白木香叶片 cDNA 为模板,采用高保真酶进行 PCR 扩增,其产物进行电泳分离纯化,并以 DNA marker V 作为分子量参照比对。切取目标大小单一明亮条带,使用胶回收试剂盒进行凝胶回收纯化,纯化后的 DNA 片段于 16°C 进行载体(pMD-19T)连接,连接后产物全部转入 *E.coli* DH5 α 中,筛选阳性克隆鉴定,提取质粒并送公司测序验证,将测序正确的质粒于 -20°C 保存。

1.2.3 生物信息学分析 本研究采用多平台联用对 *AsMADS12* 蛋白进行全面的生物信息学分析。利用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 数据库的工具鉴定保守功能域;使用 MEGA X64 软件进行 *AsMADS12* 与其他物种同源蛋白的多序列比对;借助 NPS@服务器的 GOR4(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)二级结构预测模块解析分子量及等电点等基础理化参数;运用 TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)在线软件算法推定跨膜螺旋拓扑结构;采用 SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)在线软件系统识别分泌信号肽序列;基于 NetPhos-3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)平台预测潜在磷酸化修饰位点;最终依托 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)同源建模服务器构建三级结构。

1.2.4 重组质粒构建 基于前期目的基因克隆所得引物,根据 NC 克隆试剂盒加入 NC 接头(表 1)进行引物合成。以 *AsMADS12* 基因克隆质粒为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经电泳分离验证,以 DNA Maker V 作为参照,选择出单一明亮且大小相符的条带,进行胶回收,将胶回收产物与载体 pNC-Green-SubN 进行连接转化,筛选阳性克隆测序,提取质粒于 -20°C 保存备用。

1.2.5 *AsMADS12* 亚细胞定位 将连接载体 pNC-Green-SubN 的重组质粒 pNC-Green-SubN-*AsMADS12* 转入 *A. tumefaciens* GV3101 (pSoup-p19)中培养,挑选菌落进行 PCR 鉴定阳性菌株并扩大培养。将扩大培养得到的菌液进行重悬后浸染洋葱细胞,28 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 2 d 后加入 DAPI 荧光染料,用激光共聚焦显微镜进行观察,拍照记录。

1.2.6 *AsMADS12* 基因表达分析 基于 *AsMADS12* 基因序列,借助 Integrated DNA Technologies IDT 平台(idtdna.com)在线设计其 RT-qPCR 引物(表 1),以茉莉酸甲酯(MeJA)处理不同时间(0、3、6、24、72、120 h)的白木香叶片 cDNA 样品为模板,以白木香 *GADPH* 为内参基因^[20-21],使用 MX3005P 实时荧光定量 PCR 仪检测 *AsMADS12* 基因表达量。试验进行 3 次独立重复,并采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对表达量分析。

2 结果与分析

2.1 *AsMADS12* 基因筛选与克隆

根据表达量使用 TBtools 进行分析,得到 13 个 *AsMADS* 基因的 FPKM 值(图 1)。通过热图比

表 1 引物序列信息
Tab. 1 Primers sequence information

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
AsMADS12-F	ATGGCGAGAGAGAAGATTAAGATTAAG
AsMADS12-R	CTACACGAGAGCTAGCGCTAAT
AsMADS12-NCF	AGTGGTCTCTGTCCAGTCCT ATGGCGAGAGAGAAGATTAAGATTAAG
AsMADS12-NCR	GGTCTCAGCAGACCACAAGT CTACACGAGAGCTAGCGCTAAT
AsMADS-qF	ATGGGATGGACATAGAGGATTG
AsMADS-qR	CGAGTTGGCTTATCTCCTTCTT
AsGADPH-F	CTGGTATGGCATTCCGTGTA
AsGADPH-R	AACCACATCCTCTTCGGTGTA

较发现, *AsMADS12* 基因在受到结香剂诱导后的第 6 天与其他时间相比有所提高, 且表达量较高。以白木香叶片总 RNA 经反转录合成的 cDNA 为模板, 采用基因特异性引物 *AsMADS12*-F/R (10 μmol/L) 进行 PCR 扩增, 得到一条与 *AsMADS12* 基因片段大致相符且长度约为 600 bp 的条带 (图 2)。对 PCR 产物进行胶回收, 载体构建转化后进行测序。测序结果显示, *AsMADS12* 基因序列长度为 678 bp。

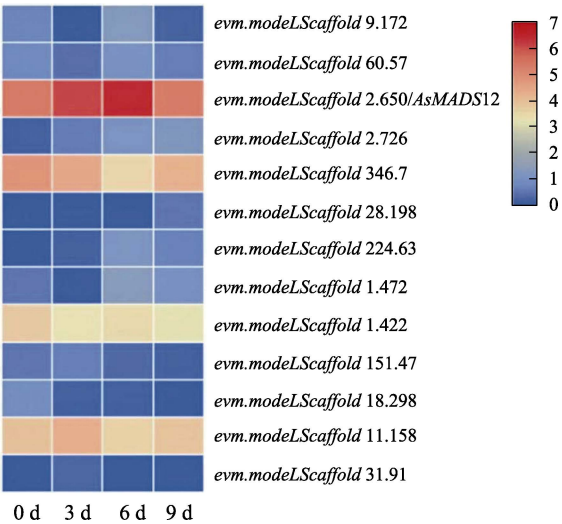


图 1 *AsMADS* 基因的 FPKM 值
Fig. 1 FPKM of *AsMADS*

2.2 *AsMADS12* 生物信息学分析

AsMADS12 蛋白分子式为 C₁₀₈₇H₁₈₁₁N₃₁₃O₃₅₀S₁₃, 相对分子量约为 25.28 kDa, 该蛋白含天冬氨酸与谷氨酸负电荷总数为 35 个, 精氨酸和赖氨酸正电荷总数为 37 个; pI 值为 8.33, 脂脂肪指数为 82.36, 不稳定指数为 44.25。亲水性系数为

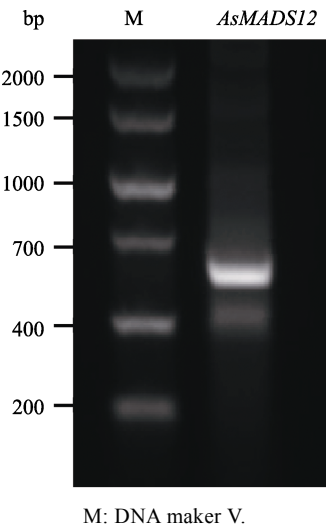


图 2 *AsMADS12* 基因克隆
Fig. 2 Cloning of *AsMADS12*

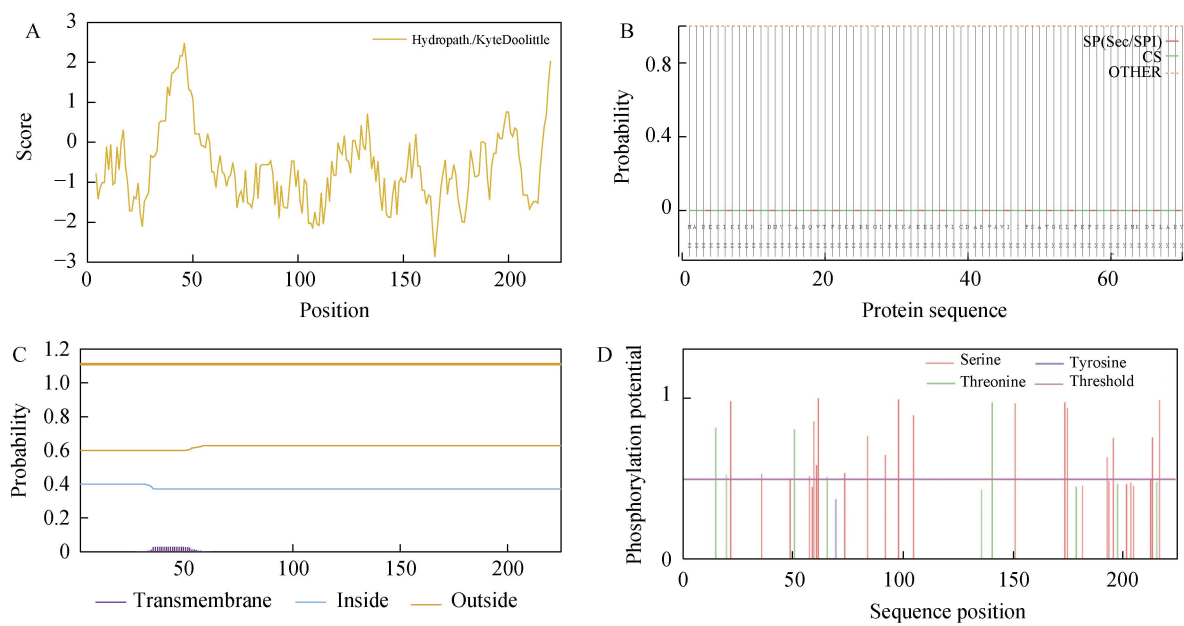
-0.578, 多肽链存在明显亲水区域, 预测为稳定亲水性蛋白 (图 3A)。经 SignalP 5.0 软件预测, 该蛋白无信号肽剪切位点, 属非分泌型蛋白 (图 3B)。TMHMM server V2.0 软件分析显示 *AsMADS12* 蛋白无跨膜区, 属胞外蛋白 (图 3C)。NetPhos 3.1 软件预测结果显示该蛋白存在酪氨酸、苏氨酸及丝氨酸磷酸化位点 (图 3D)。

2.3 *AsMADS12* 蛋白结构预测

AsMADS12 蛋白的二、三级结构预测以及保守结构域分析显示, *AsMADS12* 蛋白二级结构由 α-螺旋 (52.00%)、延伸链 (11.56%) 和无规则卷曲 (36.44%) 组成 (图 4A)。基于 AlphaFold Protein Structure Database 构建的三级结构模型 (图 4B) 表明, 其构象主要由 α-螺旋和无规则卷曲构成, 该预测与二级结构结果相同。*AsMADS12* 具有典型的 MADS 结构域特征, 即 MEF2_like MADS 保守域 (图 4C)。

2.4 序列比对及系统进化树分析

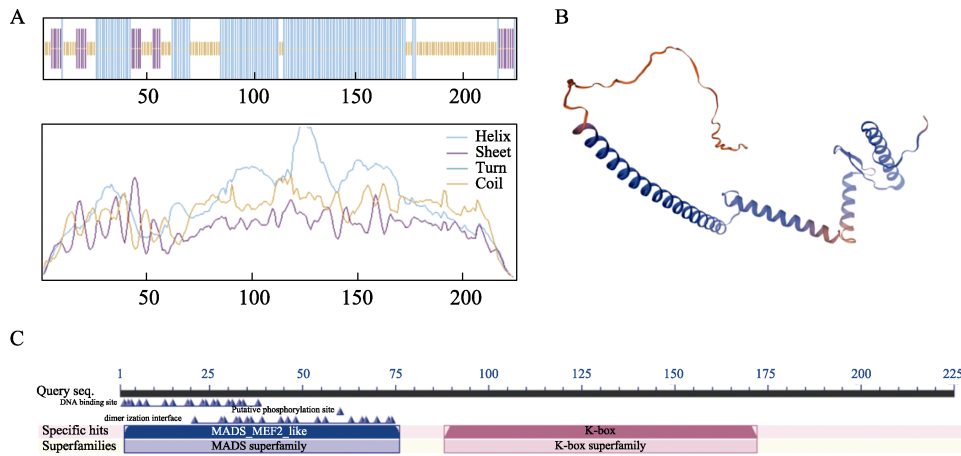
将 *AsMADS12* 与甜橙 (*Citrus sinensis*)、枳 (*Citrus trifoliata*)、芒果 (*Mangifera indica*)、莴苣 (*Lactuca sativa*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*)、柑橘 (*Citrus x clementina*)、白桦 (*Betula platyphylla*)、玉米 (*Zea mays*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、水稻 (*Oryza sativa*)、辣椒 (*Capsicum annuum*) 等 11 种植物的 MADS 蛋白序列比对发现, *AsMADS12* 与不同植物的 MADS 蛋白具有相同的特征保守结构域 (图 5)。构建 *AsMADS12* 与其他高同源性植物 MADS 蛋白的系统进化树, 发现 *AsMADS12* 与甜橙的 *CsMADS* 和枳的



A: AsMADS12 蛋白亲疏水性; B: AsMADS12 信号肽; C: AsMADS12 蛋白跨膜结构; D: AsMADS12 磷酸化位点。
A: AsMADS12 hydrophilic/hydrophobic prediction; B: AsMADS12 signal peptide;
C: AsMADS12 transmembrane structure; D: AsMADS12 phosphoric acid site.

图 3 AsMADS12 蛋白生物信息学分析

Fig. 3 Bioinformatics analysis of AsMADS12 protein



A: AsMADS12 蛋白的二级结构, 蓝色: α -螺旋, 红色: 延伸链, 紫色: 无规则卷曲;
B: AsMADS12 蛋白的三级结构; C: AsMADS12 蛋白的结构域。

A: Secondary structure of AsMADS12 protein, blue: alpha helix, red: extended strand, purple: random coil;
B: Tertiary structure of AsMADS12 protein; C: Domain of AsMADS12 protein.

图 4 AsMADS12 蛋白结构预测

Fig. 4 Structure prediction of AsMADS12 protein

CtMADS 聚于同一分支 (图 6)。

2.5 AsMADS12 亚细胞定位分析

激光共聚焦荧光显微镜分析结果 (图 7) 显示, 在对照组中, 菌液浸染洋葱表皮后在细胞核、细胞壁中均出现了荧光, 而在试验组中仅有细胞核部位出现绿色荧光, 染色后细胞核的蓝色荧光重合表现为浅蓝绿色荧光。由此可见 AsMADS12 定位于细胞核, 且该结果与 WoLF PSORT 软件预

测结果相符。

2.6 AsMADS12 表达量分析

为验证 AsMADS12 基因在白木香结香过程中的表达量变化, 本研究用茉莉酸甲酯对白木香茎秆进行不同时间处理, 并通过实时荧光定量 PCR 检测处理后的 AsMADS12 基因表达量, 发现经茉莉酸甲酯处理后的 AsMADS12 基因表达量均有所提高, 且在 24 h 的表达量最高 (图 8)。

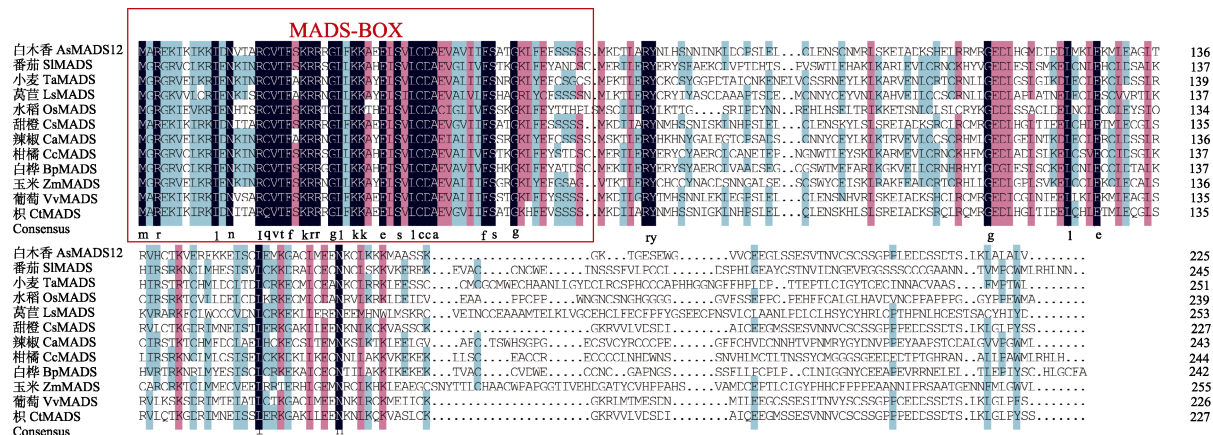


图 5 *AsMADS12* 氨基酸同源序列比对

Fig. 5 Amino acid homologous sequence alignment of *AsMADS12*

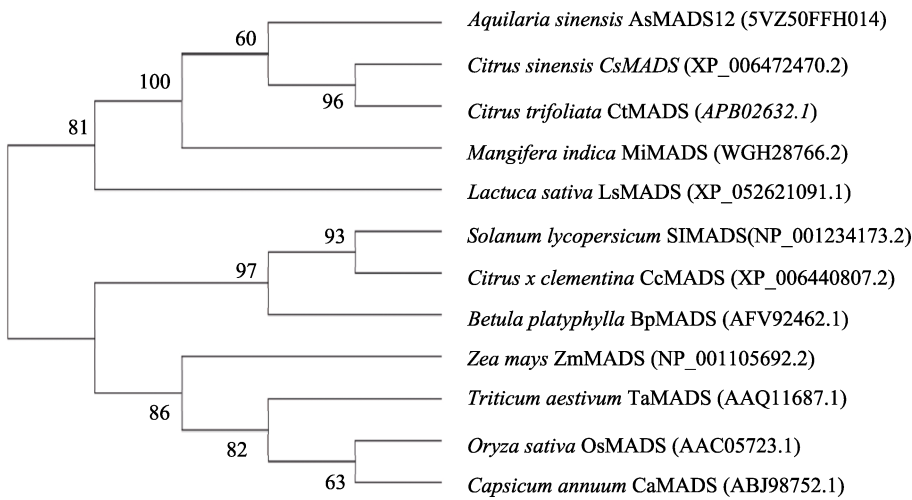


图 6 *AsMADS12* 与其他植物 MADS 氨基酸序列系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of *AsMADS12* and MADS amino acid sequences of other plant

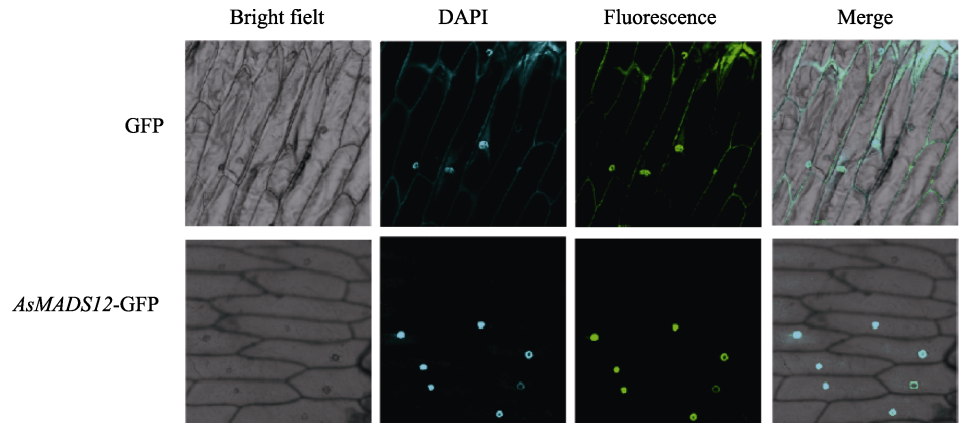


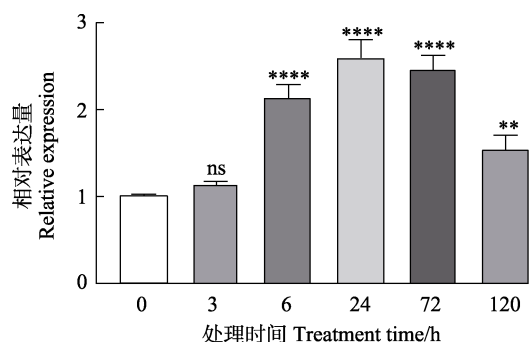
图 7 *AsMADS12* 亚细胞定位

Fig. 7 Subcellular localisation of *AsMADS12*

3 讨论

白木香中的次生代谢产物主要以倍半萜和 2-(2-苯乙基)色酮为主，是白木香胁迫响应的产

物，也是沉香的主要化学成分^[7, 22]。已有报道 MAD-box 家族基因在萜类的生物合成中也发挥重要作用，如 LI 等^[23]通过对灵芝 (*Ganoderma*



ns 表示无显著差异, **和****分别表示在 0.01 和 0.0001 水平差异极显著。

ns indicates no significant difference, ** and **** indicate extremely significant difference at the 0.01 and 0.0001 probability levels, respectively.

图 8 *AsMADS12* 在茉莉酸甲酯处理下的表达分析

Fig. 8 Expression level of *AsMADS12* under Ethylene releaser treatments

lucidum) 中 *GIMADS1* 的沉默引起灵芝酸的降低来证明该基因参与调控灵芝酸的合成; LU 等^[24]证明了柑橘 (*Citrus reticulata* Blanco) 中的 *CrMADS5* 可通过直接激活类胡萝卜素生成基因的转录来正向调控果实中的类胡萝卜素生物合成, 此外, 还发现 *CrMADS5* 可以与 *CrMADS6* 蛋白相互作用, 并讨论了 *CrMADS5*-*CrMADS6* 在果实成熟和类胡萝卜素积累之间的作用。同样, 在番茄 (*Solanum lycopersicum*) 中的研究表明, 通过 RNAi 技术干扰表达 *SICMB1* 基因后, 可显著抑制类胡萝卜素合成关键基因 *PSY1* 和 *PDS* 的表达水平, 进而降低果实内类胡萝卜素的积累量^[25]。本研究发现经茉莉酸甲酯处理后的白木香 *AsMADS12* 基因表达量明显上升且在 24 h 达到最高。有研究表明热休克处理诱导白木香悬浮细胞中茉莉酸 (JA) 合成相关基因的表达显著上调, 伴随细胞内 JA 含量的增加, 倍半萜的含量增加, 说明内源 JA 信号在白木香倍半萜合成中发挥关键作用, 可调控植物生长发育及其次级代谢产物的合成^[26-27]。结合上述研究, 推测 *AsMADS12* 可能通过响应茉莉酸信号, 参与白木香的胁迫响应, 对倍半萜或色酮等次生代谢产物的形成具有调控作用。

关于转录因子参与调控白木香次生代谢产物的合成已有报道。*AsZFP9* 能直接结合激活倍半萜合成途径中的关键基因 *AsHMGR1* 和 *AsTPS1* 的启动子, 促进倍半萜的合成^[28]; *AsMYC2* 通过茉莉酸信号通路控制 *ASS1* 表达且参与调控倍半萜生物合成, 而 *AsWRKY44* 作为一个负调控因子抑制 *ASS1* 的表达^[29-30]; *AsERF1* 能在干旱、盐等胁迫条

件下被诱导表达并且能够激活 *AsTPS1* 的表达^[31]。此外, *AsPKS* 作为 2-(2-苯乙基)色酮合成过程中的关键基因, 转录因子 *AsNAC*、*AsbZIP*、*AsMYB* 均对 *AsPKS* 有不同的调控作用^[32-34]。然而关于转录因子 *MADS*-box 家族基因在白木香次生代谢产物合成中的作用尚未报道, 本研究首次对白木香中 *MADS*-box 家族基因进行分析, 推断其响应茉莉酸甲酯的胁迫, 并且参与白木香次生代谢产物的合成。这为将来探究该基因是否能够调控白木香的生物合成过程提供理论支撑, 有助于解析沉香形成的机制, 并为选育易结香的优质白木香品种奠定基础。然而, 当前研究尚缺少充分的试验数据支撑, 因此后续计划采用酵母单杂交技术、双荧光素酶报告基因检测等方法, 深入验证该基因对白木香次生代谢生物合成的调控作用。

参考文献

- [1] 王昊, 丁旭坡, 曾军, 朱家红, 董文化, 陈惠琴, 黄圣卓, 李薇, 梅文莉, 戴好富. 沉香种质资源、品质评价与形成机制研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2024, 54(10): 1885-1906.
WANG H, DING X P, ZENG J, ZHU J H, DONG W H, CHEN H Q, HUANG S Z, LI W, MEI W L, DAI H F. Advancements in agarwood germplasm resources, quality evaluation, and formation mechanism[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2024, 54(10): 1885-1906. (in Chinese)
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020. (in Chinese)
- [3] 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.
LI L H, SHOU H Y, MA Q W. Distribution of *Aquilaria sinensis* (Thymelaeaceae)[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(17): 9254-9256. (in Chinese)
- [4] 田静, 刘秀彬, 王振国. 沉香药性和功效源流考证[J]. 中药材, 2020, 43(6): 1493-1498.
TIAN J, LIU X B, WANG Z G. Research on the historical development of the medicinal properties and effects of *Aquilaria sinensis*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2020, 43(6): 1493-1498. (in Chinese)
- [5] 王剑, 梅全喜. 试论李时珍对沉香的研究和运用及其现代价值[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(5): 1242-1248.
WANG J, MEI Q X. A discussion on Li Shizhen's research and application of agarwood and its modern value[J].

- Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2021, 32(5): 1242-1248. (in Chinese)
- [6] 熊礼燕, 姬国玺, 林励, 汪科元. 沉香镇痛有效部位及其物质基础研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(8): 1842-1844. XIONG L Y, JI G X, LIN L, WANG K Y. Study on analgesic effective parts and active substance of *Aquilaria sinensis* (Lour.) gilg[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2014, 25(8): 1842-1844. (in Chinese)
- [7] LI W, CHEN H Q, WAG H, MEI W L, DAI H F. Natural products in agarwood and *Aquilaria* plants: chemistry, biological activities and biosynthesis[J]. Natural Product Reports, 2021, 38(3): 528-565.
- [8] 朱慧娜, 苏志诚, 林达淮, 李煌, 朱晨龙. 沉香药理作用概述及研究进展[J]. 基层中医药, 2024, 3(8): 70-79. ZHU H N, SU Z C, LIN D H, LI H, ZHU C L. Pharmacological action and modern research progress in agarwood[J]. Basic Traditional Chinese Medicine, 2024, 3(8): 70-79. (in Chinese)
- [9] FADZIL M A M, ABU SEMAN N, ABD RASHE A. The potential therapeutic use of agarwood for diabetes: a scoping review[J]. Pharmaceuticals, 2024, 17(11): 1548.
- [10] MA N Y, HU X, KARAKO K, SONG P P, TANG W, XIA Y. Agarwood as a potential therapeutic for alzheimer's disease: mechanistic insights and target identification[J]. Drug Discoveries & Therapeutics, 2025, 18(6): 375-386.
- [11] 戴好富, 梅文莉. 沉香实用栽培和人工结香技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015. DAI H F, MEI W L. Technology of agarwood trees cultivation and agarwood artificial formation[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015. (in Chinese)
- [12] ALVAREZ-BUYLLA E R, PELAZ S, LILJEGREN S J, GOLD S E, BURGEFF C, DITTA G S, RIBAS DE POUPLANA L, MARTÍNEZ-CASTILLA L, YANOFISKY M. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(10): 5328-5333.
- [13] 田诗, 金钊, 刘亚杰, 王雪松, 张军保, 刘丽杰. MADS-box 转录因子家族基因对植物非生物胁迫的响应研究进展[J]. 高师理科学刊, 2025, 45(3): 80-85. TIAN S, JIN C, LIU Y J, WANG X S, ZHANG J B, LIU L J. Research progress on MADS-box transcription factor family in response to abiotic stress in plants[J]. Journal of Science of Teachers College and University, 2025, 45(3): 80-85. (in Chinese).
- [14] 程欣. 番茄 SIMADS48 基因的功能研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2021. CHENG X. Functional study of the SIMADS48 gene in tomato[D]. Chongqing: Chongqing University, 2021. (in Chinese)
- nese)
- [15] 张雪梅. 小麦根发育基因 *TaRAA1* 和 *TaMADS26* 的鉴定和功能初步分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2022. ZHANG X M. Identification and preliminary functional analysis of root development genes *TaRAA1* and *TaMADS26* in wheat[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [16] 巫明明, 曾维, 翟荣荣, 叶靖, 朱国富, 俞法明, 张小明, 叶胜海. 水稻耐盐分子机制与育种研究进展[J]. 中国水稻科学, 2022, 36(6): 551-561. WU M M, ZENG W, ZHAI R R, YE J, ZHU G F, YU F M, ZHANG X M, YE S H. Research progress in molecular mechanism and breeding status of salt tolerance in rice[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2022, 36(6): 551-561. (in Chinese)
- [17] 熊书, 李彦杰, 周大祥. 油菜 MADS-box 家族基因 *AGL11* 的克隆、表达及转化油菜的研究[J]. 西南农业学报, 2017, 30(10): 2174-2178. XIONG S, LI Y J, ZHOU D X. Cloning, expression and transformation of the MADS-box family gene *AGL11* in rapeseed[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2017, 30(10): 2174-2178. (in Chinese)
- [18] 王溪唯, 陈璨, 王大玮. 云南柃[木衣]MADS-box 基因家族鉴定与表达分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2897-2913. WANG X W, CHEN C, WANG D W. Identification and expression analysis of MADS-box gene family in *Docynia delavayi* (Franch.) Schneid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2897-2913. (in Chinese)
- [19] LI R S, ZHU J H, GUO D, LI H L, WANG Y, DING X P, MEI W L, CHEN Z B, DAI H F, PENG S Q. Genome-wide identification and expression analysis of terpene synthase gene family in *Aquilaria sinensis*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 164: 185-194.
- [20] 刘娟, 徐艳红, 杨勇, 梁良, 韩晓敏, 高志晖, 张争, 杨云, 魏建和. 白木香乙酰乙酰基辅酶 A 硫解酶基因(*AsAACT*)的克隆与表达分析[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(6): 972-980. LIU J, XU Y H, YANG Y, LIANG L, HAN X M, GAO Z H, ZHANG Z, YANG Y, WEI J H. Cloning and expression analysis of the acetyl-CoA C-acetyl transferase (*AsAACT*) of *Aquilaria sinensis*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2014, 39(6): 972-980. (in Chinese)
- [21] 何欣. 白木香倍半萜合成酶基因的克隆表达与酶学性质[D]. 广州: 广东药学院, 2015. HE X. Cloning, expression and enzymology character of sesquiterpene synthase gene from *Aquilaria sinensis*[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2015.

- (in Chinese)
- [22] 黄俊卿, 魏建和, 张争, 杨云, 刘洋洋, 孟慧, 张兴丽, 张金莲. 沉香结香方法的历史记载、现代研究及通体结香技术[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(3): 302-306.
- HUANG J Q, WEI J H, ZHANG Z, YANG Y, LIU Y Y, MENG H, ZHANG X L, ZHANG J L. Historical records and modern research on the method of agarwood forming incense and the technology of full-body fragrance formation[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 38(3): 302-306. (in Chinese).
- [23] LI M, ZHANG S Y, CHEN B Z, BAI X R, LI Y F, YANG J, WANG W, LI C T, LI Y, LI Z. The MADS-box transcription factor GIMADS1 regulates secondary metabolism in *Ganoderma lucidum*[J]. Mycologia, 2021, 113(1): 12-19.
- [24] LU S, YE L L, ZHU K J, ZHANG Y, ZHANG M W, XU Q, DENG X X. A fruit ripening-associated transcription factor CsMADS5 positively regulates carotenoid biosynthesis in citrus[J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(8): 3028-3043.
- [25] ZHANG J L, HU Z L, YAO Q Y, GUO X H, NGUYEN V, LI F F, CHEN G P. A tomato MADS-box protein, SICMB1, regulates ethylene biosynthesis and carotenoid accumulation during fruit ripening[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 3413.
- [26] 廖永翠. 茉莉酸信号途径参与调控沉香倍半萜生物合成的分子机制研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2015.
- LIAO Y C. Research on the molecular mechanism of jasmonic acid signaling pathway involved in regulating the biosynthesis of sesquiterpenoids in agarwood[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2015. (in Chinese)
- [27] XU Y H, LIAO Y C, ZHANG Z, LIU J, SUN P W, GAO Z H, SUI C, WEI J H. Jasmonic acid is a crucial signal transducer in heat shock induced sesquiterpene formation in *Aquilaria sinensis*[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 21843.
- [28] LI Y J, GUO D, WANG H, WANG Y, PENG S Q, DAI H F, MEI W L, ZHU J H. Comprehensive investigation of the C2H2-type zinc finger protein transcription factor family in *Aquilaria sinensis* reveals the involvement of AsZFP9 in sesquiterpene biosynthesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 318: 145119.
- [29] XU Y H, LIAO Y C, LV F F, ZHANG Z, SUN P W, GAO Z H, HU K P, SUI C, WEI J H. Transcription factor AsMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of ASS1 of regulating sesquiterpene biosynthesis in *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg[J]. Plant and Cell Physiology, 2017, 58: 1924-1933.
- [30] SUN P W, XU Y H, YU C C, LV F F, TANG X L, GAO Z H, ZHANG Z, WANG H, LIU Y, WEI J H. WRKY44 represses expression of the wound-induced sesquiterpene biosynthetic gene ASS1 in *Aquilaria sinensis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71: 1128-1138.
- [31] LI T Z, ZHENG Y Z, RONG Y Q, WANG X F, TU P F. Gene cloning, subcellular localization and expression analysis of the *AsERF1* gene from *Aquilaria sinensis*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2020, 55: 1957-1964.
- [32] YANG Z, MEI W L, WANG H, ZENG J, DAI H F, DING X P. Comprehensive analysis of NAC transcription factors reveals their evolution in malvales and functional characterization of AsNAC019 and AsNAC098 in *Aquilaria sinensis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24: 17384.
- [33] ZHANG H, DING X P, WANG H, CHEN H Q, DONG W H, ZHU J H, WANG J, PENG S J, DAI H F, MEI W L. Systematic evolution of bZIP transcription factors in Malvales and functional exploration of AsbZIP14 and AsbZIP41 in *Aquilaria sinensis*[J]. Plant Metabolism and Chemodiversity, 2023, 14: 1243323.
- [34] YANG Y, ZHU J H, WANG H, GUO D, WANG Y, MEI W L, PENG S Q, DAI H F. Systematic investigation of the R2R3-MYB gene family in *Aquilaria sinensis* reveals a transcriptional repressor AsMYB054 involved in 2-(2-phenylethyl) chromone biosynthesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 244: 125302.