

DOI:10.11937/bfyy.201514023

蕙兰 *CfAOC* 基因的克隆及表达分析

周 银¹, 王松太¹, 董 坤¹, 洪华珠^{1,2}, 葛晓霞¹

(1. 武汉生物工程学院 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430415; 2. 华中师范大学 昆虫学研究所, 湖北 武汉 430079)

摘 要:以野生蕙兰为试材,利用分子手段解析 *CfAOC*(allene oxide cyclase, 丙二烯氧化物环化酶)在蕙兰花香合成途径中的作用,同时为揭示蕙兰花香合成的分子机制提供理论依据。结果表明:分别以蕙兰基因组 DNA 和 cDNA 为模板 PCR 扩增出 *CfAOC* 基因的全长序列和 CDS 序列,比较发现 *CfAOC* 基因由 3 个外显子和 2 个内含子构成,亚细胞定位预测该蛋白位于叶绿体中,氨基酸序列分析显示该基因编码的蛋白含有保守的丙二烯氧化物环化酶结构域,进化树结果也表明 *CfAOC* 与其它植物的 AOC 同源性较高,都参与茉莉酸及其衍生物的合成代谢。*CfAOC* 基因的时空特异性表达分析发现该基因在蕙兰盛花期时的花中表达量最高,暗示该基因可能与蕙兰花香合成有关。

关键词:蕙兰; AOC 基因; 茉莉酸合成途径; 表达分析

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)14-0084-06

蕙兰(*Cymbidium faberi* Rolfe)是国兰中最古老的栽培品种,有着重要的经济和观赏价值,其商品主要依赖于野生资源,由于过度开采,蕙兰的种质资源遭到了严重破坏,合理利用野生资源并开发有效的保护措施迫在眉睫^[1],目前除了开发 DNA 分子标记用于蕙兰资源的分类、育种和栽培外^[2],还有许多研究通过基因工程的手段进行改良获得新品种,对蕙兰株型、花形、花色、花香等性状进行基因功能研究^[3-6]。

国兰相比于洋兰的奇妙之处在于其花朵具有特殊香味吸引昆虫为其授粉,花香也是国兰观赏性的重要部分。20 世纪 90 年代日本 OMATA 等^[7]分析了蕙兰(dawipin)花香中挥发性复合物的成分,主要是茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)和茉莉酮酸甲酯(methyl epijasmonate)。彭红明^[8]利用气相色谱-质谱联用的方法对兰花花香挥发性成分进行定性和相对定量分析发现,茉莉酸甲酯在国兰挥发性成分中含量较高,而在蝴蝶兰、长萼兰和树兰等热带兰中未检测到。植物中茉莉酸的生物合成途径已经较为清晰,属于脂肪酸衍生物途径^[9-10]。从乙酰 CoA 开始,然后由丙二酸单酰 CoA 提供 C2 单位进行碳链延伸。生成 18 个碳的脂肪酸后,在叶绿体内由磷脂酶介导生成 α -亚麻酸,然后经过脂肪氧合

酶(LOX)、丙二烯氧化物合成酶(AOS)和丙二烯氧化物环化酶(AOC)一系列酶的催化, α -亚麻酸转变成 12-O-植物二烯酸(OPDA)。茉莉酸生物合成途径的第二阶段在过氧化物酶体中进行,当 OPDA 运输到过氧化物酶体内,在 OPDA 还原酶的催化下生成 3-O-2(2'-戊烯基)-环戊烷-1-辛酸(OPC:8),经过 3 轮 β -氧化最终生成茉莉酸(jasmonic acid, JA)^[11]。其中 AOC 的作用是将不稳定的丙二烯氧化物(12,13-环氧亚麻酸)进行结构重排,形成外消旋的 12-O-植物二烯酸。该步反应被认为是 JA 合成途径中的关键步骤,因为只有正确构象的前体物质(*cis*-(+)-12-O-OPDA)才能形成天然存在的 JA((+)-7-iso-JA)。

现有研究表明,AOC 基因的功能大多与植物的胁迫反应有关。番茄中 AOC 基因在茎、叶片和花蕾中表达比较低,而在花朵、花柄和根中表达量很高,免疫细胞化学染色分析揭示 AOC 在维管束中的表达与番茄系统素(systemin)介导的损伤反应有关^[12-13]。拟南芥中克隆获得了 4 个同源的 AOC 基因,大小从 759 bp 到 774 bp,均含有 1 个内含子,AOC 基因在拟南芥中参与了植物体的伤害应激反应^[14]。免疫印迹分析表明拟南芥大部分组织都含有 AOC 蛋白,包括所有的维管束组织和花苞,其中以叶片中含量最高。然而在花未展开前的花药和花粉中未检测到 AOC 蛋白^[15]。为了确定拟南芥中 4 个 AOC 基因是否出现功能冗余或多样化,分别将 4 个 AOC 基因的启动子启动 GUS 基因表达,结果表明 AOC1、AOC2 和 AOC3 启动子在叶片中活性较高,而 AOC4 启动子是维管束组织特异性表达的,并且只有

第一作者简介:周银(1983-),女,博士,讲师,研究方向为植物分子生物学。E-mail:ripple0931@hotmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31201611)。

收稿日期:2015-01-22

AOC3 和 AOC4 启动子在根中有活性, AOC1 和 AOC4 启动子在花发育过程中有部分特异性, 说明在拟南芥中茉莉酸的合成有着精细的时空调控机制^[16]。大麦(*Hordeum vulgare* L.) 中的 AOC 基因只有 1 个拷贝, 定位于 6H 染色体上, 该基因在根、盾片节和叶基部的表达量最高, 与相应部位茉莉酸酯类物质的高含量呈正相关。HvAOC 在大肠杆菌中超表达后分析发现, 提取物中只检测到 *cis*-(+)-12-O-OPDA, 这是合成 JA 前体物质的正确构象, 而对照组中有 50% 的 *cis*-(+)-12-O-OPDA 和 50% 的 *cis*-(-)-12-O-OPDA^[17], 由于 AOC 基因是茉莉酸甲酯合成途径中唯一一个与 JA 前体物质构象有关的催化酶, 其作用至关重要, 而有关 AOC 基因在花香合成中的具体功能少有报道, 这也与茉莉酸甲酯作为花香成分的研究不够深入有关。

茉莉酸甲酯代谢途径在模式植物中研究颇多, 但是作为蕙兰花香的主要成分, 茉莉酸甲酯的合成和调控并没有进行深入的报道。探索 CfAOC 基因在 MeJA 合成途径中的作用, 可为研究蕙兰的花香合成以及兰花性状改良提供理论基础。现利用分子克隆、生物信息学分析、半定量 RT-PCR 等方法对 CfAOC 基因的结构和功能、细胞学定位、时空特异性表达等进行分析, 以期为进一步研究 CfAOC 基因参与蕙兰的花香合成奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试野生蕙兰(*C. faberi*) 于 2014 年 3 月采集于湖北宜昌当阳山地树阴下, 现种植在武汉生物工程学院植物园内。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 由于蕙兰野生苗的叶片纤维和多糖含量较高, 很大程度上影响了基因组 DNA 提取的产量和质量, 因此该试验采用不同的提取方法进行比较, 以获得较高质量的基因组 DNA, 包括: ICTAB 提取液研磨法、IICTAB 液氮研磨法和 III SDS 高盐低渗法。其中 I 和 II 的提取液为 2×CTAB 提取液(100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1.4 mmol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 2%(m/v) CTAB, 0.1%(v/v)β-巯基乙醇), III 的提取液为 SDS 提取液(0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0), 0.5 mol/L NaCl, 0.05 mol/L EDTA, 0.1%(v/v)β-巯基乙醇, 2%(m/v) PVP, 10%(m/v) SDS)。称取叶片 0.5 g, 剪碎, 放入预先冷冻的研钵中, I 方法中加入少量的石英砂, 在通风橱中将 CTAB 提取液倒入研钵中研磨, 直至成绿白色的液体, 转入离心管中。II 和 III 方法中加入液氮研磨直至呈绿白色粉末, 转入离心管中, 分别加入 CTAB 提取液和 SDS 提取液, 混匀, 水浴 65℃, 30 min。I 和 II 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, III 中加入预冷的 5 mol/L KAc, 冰上放置 30 min, 12 000 r/min,

离心 10 min, 取上清, 加入等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1), 上下颠倒混匀约 50 次。12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和等体积的异丙醇, -20℃ 沉淀 30 min。12 000 r/min 离心 10 min, 去上清加 75% 乙醇洗涤, 晾干。加入适量的 RNase 酶和 ddH₂O 溶解, 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度法检测 DNA 的质量 将 ICTAB 提取液研磨法、IICTAB 液氮研磨法和 III SDS 高盐低渗法 3 种方法提取的蕙兰基因组 DNA 同等稀释 50 倍后, 取 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳。0.8% 的琼脂糖凝胶, 130 V 电泳 45 min, EB 染液中浸泡 5~10 min, 凝胶成像系统检测 DNA 的纯度和降解情况。紫外分光光度法测定 260 nm 及 280 nm 波长下样品的吸光值, 测定时以双蒸水或者 TE 缓冲液为空白对照。

1.2.3 蕙兰总 RNA 的提取及逆转录 称取蕙兰叶片、根、花(花苞期、盛花期和凋零期)各 0.5 g, 用液氮速冻研磨, 趁液氮尚未挥发完之前, 将粉末转移到 2 个 1.5 mL 的离心管中, 加入 1 mL Trizol, 剧烈晃动混匀 5 min。加入 210 μL 氯仿, 30℃ 孵育 2~3 min。4℃ 离心 10 000 r/min, 15 min。将上清液转入 1.5 mL 离心管中, 加入与上清液等体积的高盐 DEPC 水: 异丙醇(1: 1), 15~30℃ 孵育 10 min。4℃ 离心 10 000 r/min, 15 min。小心移去上清, 防止沉淀丢失。加入 1 mL 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次, 4℃ 离心 10 000 r/min, 10 min。小心将上清移除干净, 超净台上控干酒精。加入 15 μL 无 RNA 酶的 ddH₂O, 65℃ 水浴溶解 10 min。按照 PrimeScript 说明书合成 cDNA 第一条链(Takara), 试验步骤如表 1 所示。

表 1 逆转录的反应体系及操作步骤

Table 1 Reaction system and procedures for reverse transcript

逆转录体系 Reaction system	体积 Volume/μL
RNA	3.0
dNTP(2.5 mM each)	2.0
Oligo dT(10 μM)	2.0
RNase-free ddH ₂ O	3.0
65℃, 8 min, on ice 5 min	
Reverse transcriptase	0.5
5×Reverse transcriptase buffer	4.0
RNase inhibitor	0.5
RNase-free ddH ₂ O	5.0
42℃, 2 h; 72℃, 10 min	

1.2.4 PCR 扩增 CfAOC 基因 分别以蕙兰基因组 DNA 和蕙兰盛花期 cDNA 为模板扩增 CfAOC 基因序列。引物对为 AOC-F/R(上海生工合成), 见表 2。PCR 扩增体系: 模板(×20)1 μL, Taq 酶 0.2 μL, 10×Buffer 2 μL, dNTP 2 μL, 上游引物(10 mM)0.5 μL, 下游引物(10 mM)0.5 μL, 加入 ddH₂O 补平到 20 μL。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 57℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 1 min(35 个循环), 最后 72℃ 延伸 10 min。

PCR产物电泳检测,回收产物,连接T-载体(Takara),16℃,3 h。转化至大肠杆菌中,挑选阳性克隆送测序(上海生工)。

1.2.5 *CfAOC* 生物信息学分析 用 ExPASy 网站的 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质的分子量和等电点;Target P1.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)、ProtComp (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomp1&group=programs&subgroup=proloc>)和 CELLO v. 2.5(<http://cello.life.nctu.edu.tw>)预测 *CfAOC* 蛋白的亚细胞定位;采用 NCBI 数据库中的 CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)分析 AOC 氨基酸序列的保守结构域;在 NCBI(美国国家生物技术信息中心,National Center of Biotechnology Information)数据库中,比对得到 17 条完整的 AOC 蛋白序列,利用 DNAMAN 软件构建物种间 AOC 蛋白的系统进化树。

1.2.6 半定量 RT-PCR 分别以蕙兰根、叶、花(花苞期、盛花期和凋零期)的 cDNA 为模板扩增 *CfAOC* 基因,引物对为 AOC-F/R,以 β -actin 基因为内参,引物对为 Actin-F/R,见表 2。PCR 扩增体系同 1.2.4。*CfAOC* 基因的 PCR 扩增程序:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,57℃复性 30 s,72℃延伸 30 s(32 个循环),最后 72℃延伸 10 min。 β -actin 基因的 PCR 扩增程序:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,55℃复性 30 s,72℃延伸 30 s(24 个循环),最后 72℃延伸 5 min。琼脂糖凝胶电泳检测结果。

表 2 PCR 扩增的引物序列

Table 2 Primer sequences for PCR amplification

名称	引物序列
Name	Primer sequences
AOC-F	5'-ATGGCAGCTCTGCTTTTCCCTC-3'
AOC-R	5'-TGGTATAGTGTTCAGTGGCGGT-3'
Actin-F	5'-TTTATGAGGTTATGCGCTTC-3'
Actin-R	5'-AACTACTGCAGAACGGGAAT-3'

2 结果与分析

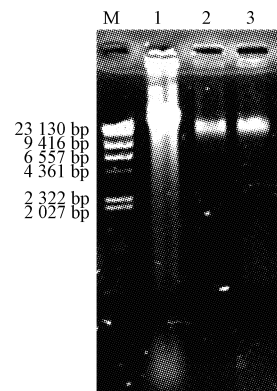
2.1 蕙兰基因组 DNA 提取的检测结果

由图 1 可知,基因组 DNA 经 ND-1000 紫外分光光度计检测结果(用等体积的蒸馏水作空白对照),3 种方法提取的基因组 DNA 的 A_{260}/A_{280} 依次分别为 1.83、1.88 和 1.91,说明 SDS 高盐低渗法在蕙兰叶片基因组 DNA 提取的过程中优于 CTAB 提取法。

2.2 *CfAOC* 全长克隆与序列分析

提取蕙兰盛花期花中的总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测后结果如图 2a 所示。以蕙兰盛花期花的 cDNA 为模板,扩增得到 *CfAOC* 基因的 ORF,长度为 771 bp(图 2b),编码 256 个氨基酸,理论分子量为 28.2 kD,等电点为 8.4。以蕙兰基因组 DNA 为模板,扩增得到 *CfAOC* 基因的全长序列,大小为 927 bp(图 2c)。通过

与 *CfAOC* 基因的 ORF 比较发现,该基因由 3 个外显子和 2 个内含子构成,内含子大小分别为 94 bp 和 62 bp,基因结构示意图如图 2d 所示。

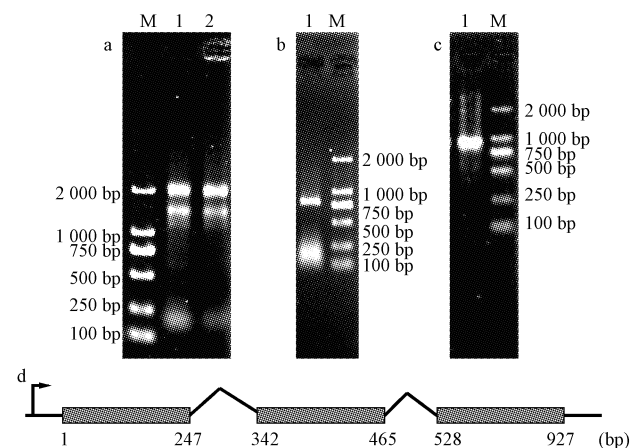


注:M, λ DNA/*Hind*III Marker;1. CTAB 提取液研磨法;2. CTAB 液氮研磨法;3. SDS 高盐低渗法。

Note:M, λ DNA/*Hind*III Marker;1. CTAB method with extraction solution grind;2. CTAB method with liquid nitrogen grind;3. high-salt hypotonic method with SDS.

图 1 3 种方法提取蕙兰基因组 DNA 电泳结果

Fig. 1 Gel electrophoresis of genomic DNA isolated from *Cymbidium faberi* leaf with three methods



注:a. 蕙兰总 RNA 的提取。M,DL 2 000 DNA Marker;1,叶;2,花;b. *CfAOC* 基因的 CDS 序列电泳图。1,PCR 扩增 *CfAOC* 基因的 CDS 区;M,DL 2 000 DNA Marker;c. *CfAOC* 基因的全长序列电泳图。1,PCR 扩增 *CfAOC* 基因的全长序列;M,DL 2 000 DNA Marker;d. *CfAOC* 基因结构示意图,由 3 个外显子和 2 个内含子构成。

Note:a. The total RNA of *C. faberi*. M,DL 2 000 DNA Marker;1,leaf;2,flower;b. PCR amplification of CDS region of *CfAOC*. 1,CDS region of *CfAOC*;M,DL 2 000 DNA Marker;c. PCR amplification of full-length of *CfAOC*. 1,genomic sequence of *CfAOC*;M,DL 2 000 DNA Marker;d. Structural diagram of *CfAOC* gene,comprised of 3 exons truncated with 2 introns.

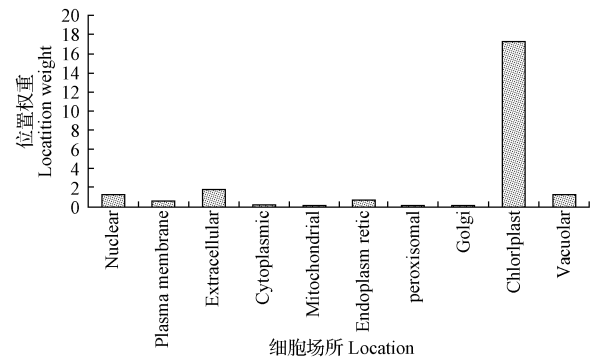
图 2 蕙兰 *CfAOC* 基因 PCR 扩增结果及结构简图

Fig. 2 The PCR amplification product and gene structure of *CfAOC* gene in *C. faberi*

CfAOC 序列经 Target 1.1、ProtComp 和 CELLO v. 2.5 分析后表明,该蛋白存在于叶绿体中(图 3)。NCBI 中 CDD 程序对 AOC 蛋白序列分析显示该蛋白序列第 78 个氨基酸至第 228 个氨基酸之间的结构域属于丙二烯氧化物环化酶家族。DNAMAN 对 NCBI 中公布的 17 条 AOC 蛋白序列进行比对和构建进化树,比对结果如图 4 所示,根据比对结果构建的进化树如图 5 所示,结果显示蕙兰和建兰(*Cymbidium ensifolium*)中的 AOC 具有 98% 的同源性,与其亲缘关系较近的是同属于单子叶植物的水稻(*Oryza sativa*) (73%)、玉米(*Zea mays*) (73%)、大麦(*Hordeum vulgare*) (73%) 和小麦(*Triticum aestivum*) (72%)。

2.3 *CfAOC* 基因的时空特异性表达分析

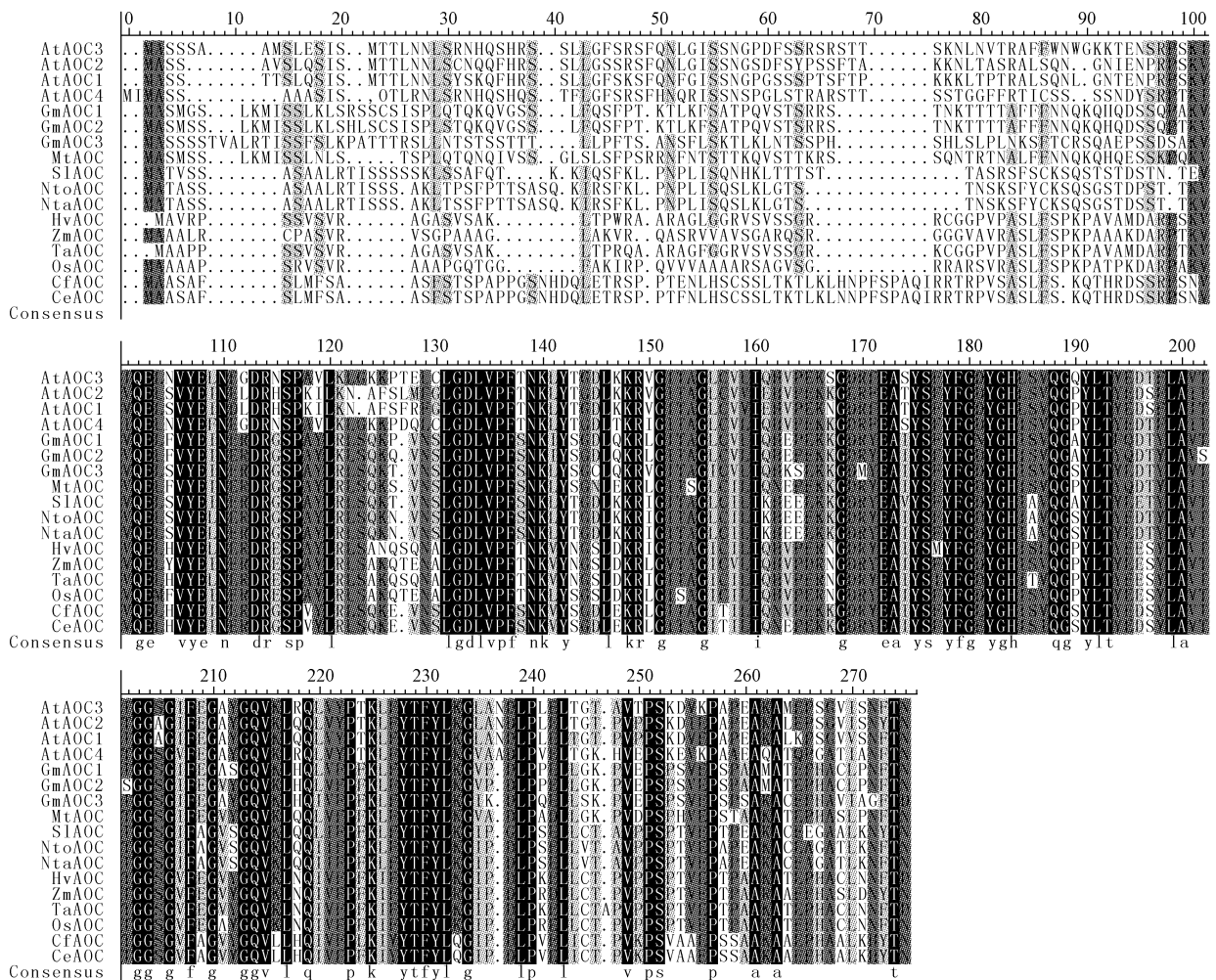
以蕙兰 *β actin* 基因为内参,在蕙兰根、叶和 3 个时期的花中通过 RT-PCR 检测 *CfAOC* 基因的表达量,结果如图 6 所示,显示 *CfAOC* 基因在盛花期的花中表达量最高,说明该基因的表达可能与盛花期花香成分的合成有关。



注: Nuclear, 细胞核; Plasma membrane, 细胞质膜; Extracellular, 细胞外; Cytoplasmic, 细胞质基质; Mitochondrial, 线粒体; Endoplasmic retic, 内质网; Peroxisomal, 过氧化物酶体; Golgi, 高尔基体; Chloroplast, 叶绿体; Vacuolar, 液泡。

图 3 ProtComp 预测 *CfAOC* 的亚细胞定位

Fig. 3 The predicted subcellular localization of *CfAOC* by ProtComp



注: At, 拟南芥; Gm, 大豆; Mt, 苜蓿; Sl, 番茄; Nto, 绒毛烟草; Nta, 普通烟草; Hv, 大麦; Zm, 玉米; Ta, 小麦; Os, 水稻; Cf, 蕙兰; Ce, 建兰。下同。

Note: At, *Arabidopsis thaliana*; Gm, *Glycine max*; Mt, *Medicago truncatula*; Sl, *Solanum lycopersicum*; Nto, *Nicotiana tomentosiformis*; Nta, *Nicotiana tabacum*; Hv, *Hordeum vulgare*; Zm, *Zea mays*; Ta, *Triticum aestivum*; Os, *Oryza sativa*; Cf, *Cymbidium faberi*; Ce, *Cymbidium ensifolium*. The same below.

图 4 *CfAOC* 与其它物种中 AOC 氨基酸序列比对

Fig. 4 Amino acid alignment of predicted *CfAOC* protein sequence with AOC sequence of other species

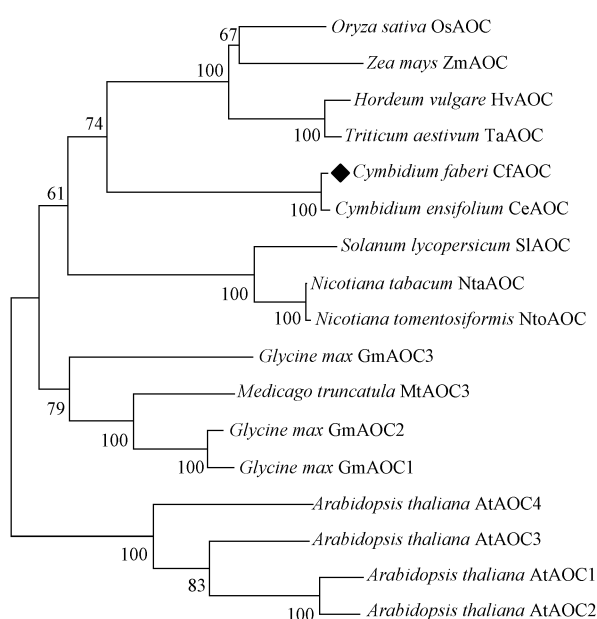
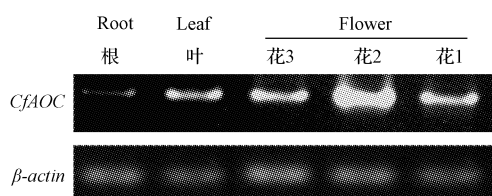


图 5 *CfAOC* 与其它物种中 AOC 蛋白
系统进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic relationships of *CfAOC* and
AOC proteins in other species



注:花 1,花苞期;花 2,盛花期;花 3,凋零期。

Note: Flower 1, flower bud stage; flower 2, blooming stage; flower 3, withered stage.

图 6 半定量 RT-PCR 分析蕙兰 *CfAOC* 基因的
时空特异性表达

Fig. 6 The spatial-temporal specific expression analysis of
CfAOC gene by semi-quantitative RT-PCR

3 讨论

该研究选取宜昌野生蕙兰为试验材料,PCR 扩增得到 *CfAOC* 基因的 CDS 序列和基因组 DNA 序列,比较发现 *CfAOC* 基因由 3 个外显子和 2 个内含子构成,氨基酸结构域分析表明 AOC 蛋白的保守结构域属于丙二烯氧化物环化酶家族,亚细胞定位预测其位于叶绿体内。进化树分析表明,*CfAOC* 基因推导的氨基酸序列与建兰中的 AOC 基因具有最大的相似度,并且与一些单子叶植物的亲缘关系较近。

该试验比较了 3 种春兰基因组 DNA 的提取方法,均可以有效提取出 DNA,但是 DNA 的质量和产量各异,其中高盐低渗提取法的产量最高。高盐低渗法中为了克服酚类物质和糖类物质对 DNA 质量的影响,加入

2% 的 PVP 和 β -巯基乙醇共同除去酚类物质^[18],高浓度的醋酸钾有效除去糖类的同时,低 pH 值的醋酸钾溶液也是有效的蛋白质沉淀剂^[19]。

AOC 蛋白作为茉莉酸代谢途径中一个重要的催化酶,在许多植物中都展开了深入研究,如番茄^[13]、拟南芥^[14]、马铃薯^[20]、水稻^[21]、小麦^[22]等,AOC 基因主要参与了茉莉酸及其衍生物的合成代谢,与植物的损伤应激反应、器官的形态建成、花的发育以及开花时间有关,而少有与花香合成途径相关的研究。将番茄中的 AOC 基因组成型超表达之后发现,茉莉酸酯类物质(jasmonates)和合成茉莉酸的一些中间产物(octadecanoids)均在花中而不是叶中累积^[23]。茉莉酸及其衍生物的合成途径的第一阶段发生在叶绿体中,亚麻酸经过一系列酶(LOX、AOS、AOC)催化之后生成叶绿体内的终产物 12-O-植物二烯酸(OPDA)^[24],第二阶段 OPDA 被转运到过氧化物酶体中进行 β -氧化生成茉莉酸,而对于 OPDA 从叶绿体转运到过氧化物酶体的机制还有待深入研究阐明。该研究中克隆得到的 *CfAOC* 基因氨基酸序列分析其 N 端有一段保守的叶绿体信号肽,亚细胞定位预测 *CfAOC* 位于叶绿体中,与之前的研究相吻合^[11]。

通过 NCBI 中 Blast 获得 *CfAOC* 的同源序列共 17 条,DNAMAN 软件比对之后构建进化树发现,所有的植物中 AOC 蛋白均包含一段由约 150 个氨基酸构成的保守的丙二烯氧化物环化酶结构域,同一物种内的 AOC 同源性最高,如:AtAOC1、AtAOC2、AtAOC3 和 AtAOC4;亲缘关系较近的物种间的 AOC 在系统进化树中聚在一起,如茄科的番茄(*Solanum lycopersicum*)和烟草(*Nicotiana*);豆科的苜蓿(*Medicago truncatula*)和大豆(*Glycine max*);禾本科的小麦、大麦、玉米和水稻;兰科的蕙兰和建兰。而同属于单子叶植物的禾本科和兰科在进化树中聚在一起。

AOC 基因在不同物种中的表达模式各异,有些在叶中表达量最高,有些在花中表达量最高,可见不同物种中茉莉酸酯类物质的合成调控方式各不相同,尤其是在单子叶植物和双子叶植物之间茉莉酸合成途径的调控存在着明显的不同^[17],该试验中 *CfAOC* 基因的时空表达分析结果表明,该基因在蕙兰盛花期时的花中表达量最高,在根和叶中表达量较低,而盛花期也是花香释放最浓郁的时期,故推测该基因可能参与到蕙兰花香合成代谢过程中,并对花香成分茉莉酸甲酯的合成起着重要作用,而该基因的调控模式以及与其它相关因素的互作,还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 黄暖爱,黄绵佳. 兰科植物保育研究概况[J]. 亚热带植物科学, 2007, 36(4): 72-76.
- [2] 马丽娅,孙晓琴,贾文杰,等. 春兰 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化

- [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(34): 14192-14194.
- [3] THIRUVENGADAM M, YANG C. Ectopic expression of two MADS box genes from orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) and lily (*Lilium longiflorum*) alters flower transition and formation in *Eustoma grandiflorum* [J]. Plant Cell Rep, 2009, 28(10): 1463-1473.
- [4] CHANDLER S F, BRUGLIERA F. Genetic modification in floriculture [J]. Biotechnol Lett, 2011, 33(2): 207-214.
- [5] THIRUVENGADAM M, CHUNG I, YANG C. Overexpression of *Oncidium* MADS box (*OMADS1*) gene promotes early flowering in transgenic orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) [J]. Acta Physiol Plant, 2012, 34(4): 1295-1302.
- [6] HOSSAIN M, MUSHAROF, KANT R, et al. The Application of Biotechnology to Orchids [J]. Crit Rev Plant Sci, 2013, 32(2): 69-139.
- [7] OMATA A, NAKAMURA S, YOMOGIDA K, et al. Volatile components of TO-YO-RAN flowers (*Cymbidium faberi* and *Cymbidium virens*) [J]. Agric Biol Chem, 1990, 54(4): 1029-1033.
- [8] 彭红明. 中国兰花挥发及特征花香成分研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院. 2009.
- [9] TURNER J G, ELLIS C, DEVOTO A. The jasmonate signal pathway [J]. Plant Cell, 2002, 14: 153-164.
- [10] PAUW B, MEMELINK J. Jasmonate-responsive gene expression [J]. J Plant Growth Regul, 2005, 23(3): 200-210.
- [11] ZHANG H, MEMELINK J. Regulation of secondary metabolism by jasmonate hormones [M]. Plant-derived Natural Products, 2009: 181-194.
- [12] HAUSE B, STENZEL I, MIERSCH O, et al. Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers-allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles [J]. Plant J, 2000, 24(1): 113-126.
- [13] STENZEL I, HAUSE B, MAUCHER H, et al. Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato-amplification in wound signaling [J]. Plant J, 2003a, 33(3): 577-589.
- [14] STENZEL I, HAUSE B, MIERSCH O, et al. Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 2003b, 51(6): 895-911.
- [15] BETTINA H, IRENE S, OTTO M, et al. Occurrence of the allene oxide cyclase in different organs and tissues of *Arabidopsis thaliana* [J]. Phytochemistry, 2003, 64(5): 971-980.
- [16] IRENE S, OTTO M, CAROLIN D, 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.
- [17] HELMUT M, IRENE S, OTTO M, et al. The allene oxide cyclase of barley (*Hordeum vulgare* L.)—cloning and organ-specific expression [J]. Phytochemistry, 2004, 65(7): 801-811.
- [18] 蒋细旺, 包满珠, 李智崎, 等. 菊花 DNA 提纯方法的优化 [J]. 江汉大学学报, 2002, 19(3): 42-44.
- [19] 郝朝运, 刘鹏, 郭卫东, 等. 忍冬科部分植物 DNA 提取方法的研究 [J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2006, 2(1): 92-98.
- [20] CENZANO A, ABDALA G, HAUSE B. Cytochemical immuno-localization of allene oxide cyclase, a jasmonic acid biosynthetic enzyme, in developing potato stolons [J]. J Plant Physiol, 2007, 164(11): 1449-1456.
- [21] RIEMANN M, HAGA K, SHIMIZU T, et al. Identification of rice *Allene Oxide Cyclase* mutants and the function of jasmonate for defence against *Magnaporthe oryzae* [J]. Plant J, 2013, 74(2): 226-238.
- [22] ZHAO Y, DONG W, ZHANG N, et al. A wheat allene oxide cyclase gene enhances salinity tolerance via jasmonate signaling [J]. Plant Physiol, 2014, 164(2): 1068-1076.
- [23] MIERSCH O, WEICHERT H, STENZEL I, et al. Constitutive overexpression of allene oxide cyclase in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv Lukullus) elevates levels of some jasmonates and octadecanoids in flower organs but not in leaves [J]. Phytochemistry, 2004, 65(7): 847-856.
- [24] KOMBRINK E. Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths [J]. Planta, 2012, 236(5): 1351-1366.

Cloning and Expression Analysis of Allene Oxide Cyclase Gene (*CfAOC*) in *Cymbidium faberi*

ZHOU Yin¹, WANG Songtai¹, DONG Kun¹, HONG Huazhu^{1,2}, GE Xiaoxia¹

(1. School of Life Science and Biotechnology, Wuhan Bioengineering University, Wuhan, Hubei 430415; 2. Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079)

Abstract: Taking *Cymbidium faberi* as material, focus on one of the most crucial enzymes, *CfAOC*, which participates in the biosynthesis of methyl jasmonate, the main component of the flower fragrance in *C. faberi*. The paper was to provide theoretical basis for the identification of molecular mechanism in the flower fragrance biosynthesis in *C. faberi*. The results showed the full-length and CDS sequences of *CfAOC* were obtained using PCR amplification with gDNA and cDNA of *C. faberi* as templates, respectively. The sequencing results demonstrated that *CfAOC* had 3 exons truncated with 2 introns. *CfAOC* was predicted to be located in chloroplast by subcellular localization, with a conserved amino acid region of allene oxide cyclase domain. The phylogenetic tree proved that *CfAOC* was homologous to AOC in the other plants as well, involved in the jasmonates biosynthesis. The spatial temporal specific expression analysis revealed that higher transcript levels of *CfAOC* were in flower at blooming stage, which suggested that *CfAOC* could be related with the flower scent biosynthesis in *C. faberi*.

Keywords: *Cymbidium faberi*; Allene oxide cyclase gene (*CfAOC*); jasmonate biosynthesis; expression analysis