

赵印泉,张启翔. 梅花氧-甲基转移酶基因克隆与器官表达分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):22-25.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.006

梅花氧-甲基转移酶基因克隆与器官表达分析

赵印泉¹, 张启翔²

(1. 成都理工大学园林系, 四川成都 610059; 2. 北京林业大学国家花卉工程技术中心, 北京 100083)

摘要:以梅花的花朵为材料,采用 RT-PCR 与 RACE 相结合的方法,从“三轮玉蝶”梅花的花朵中克隆到 1 个全长 1 322 bp 的氧-甲基转移酶 cDNA,命名为 *PmOMT*,该基因编码 377 个氨基酸的开放性阅读框,具有植物氧-甲基转移酶基因典型的 3 个保守基序,与月季(*R. chinensis* var. *spontanea*)的甲基(异)丁香酚转移酶基因 *RcOMT1* 具有较高的同源性。构建系统发育进化树结果表明,*PmOMT* 与 *RcOMT1* 亲缘关系最近,同属 COMTs 类基因。荧光定量 PCR 分析发现,*PmOMT* 基因的相对表达量与甲基丁香酚色谱峰面积的变化趋势相似,推测该基因可能参与甲基丁香酚的生物合成。

关键词:梅花;氧-甲基转移酶;基因克隆;器官;丁子香酚

中图分类号: S685.170.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0022-04

梅花(*Prunus mume*)是我国的传统名花,具有怡人香气,释放大量包括(异)丁香酚和甲基(异)丁香酚在内的苯基/苯丙烷类芳香族化合物^[1],这些芳香族化合物是植物花香的重要组成部分,并作为信号因子引诱蛾类完成授粉^[2]。氧-甲基转移酶(*O*-methyltransferases, OMTs)是植物酚类衍生物形成过程中重要的一类酶,会将腺苷甲硫氨酸(*S*-adenosyl-l-methionine)的甲基转移到酚类化合物的羟基上,形成类黄酮化合物、木质素和花香化合物等 3 类酚类衍生物^[3-5],这些酚类衍生物在植物生长发育以及与环境的信息交流方面发挥着重要作用。本研究在前期梅花花香成分研究的基础上,以“三轮玉蝶”梅花的花朵为材料,对梅花氧-甲基转移酶全长基因进行克隆,应用荧光定量 PCR 技术分析该基因在梅花不同器官中的表达,旨在为进一步研究梅花花香基因功能及其形成的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

三轮玉蝶梅花种植于北京林业大学校园内,取梅花开花指数 2~3 级的花朵^[1]、根、茎、叶片、花瓣、雄蕊、雌蕊、花萼,用锡箔纸包好,液氮速冻,保存于 -80 ℃ 超低温冰箱,备用。RNA Easy Kit 试剂盒,购自北京盖宁公司;普通 cDNA 第一链的合成试剂盒,购自 MBI 公司;pGM-T 克隆试剂盒、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒、DNA Marker、*Escherichia coli* TOP10 感受态细胞,均购自北京天根生物公司;Go Taq Flexi DNA Polymerase、Pfu DNA Polymerase、DNase I,购自 Promega 公司;

收稿日期:2016-03-22

基金项目:国家公益性行业(林业)科研专项(编号:201004012);四川省教育厅重点项目(编号:16ZA0101);成都理工大学中青年骨干教师支撑计划。

作者简介:赵印泉(1975—),男,江西南丰人,博士,高级工程师,主要从事园林花卉研究。E-mail:zhaoyinquan@126.com。

通信作者:张启翔,博士,教授,主要从事花卉资源育种研究。E-mail:zqx@bjfu.edu.cn。

3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0、SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit,购自 TaKaRa 公司;扩增引物,由北京奥科生物公司合成;SYBR Green I 染料,Invitrogen 公司生产;分析纯级的其他试剂,均为国产。用于提取 RNA 的溶液,均用 0.1% DEPC 处理的水配制;离心管、枪头等塑料制品,均用 0.1% DEPC 浸泡过夜,高压灭菌,备用。

1.2 梅花 *PmOMT* 基因 cDNA 全长的获得

按照 RNA Easy spin kit 试剂盒的说明提取花朵总 RNA,用 DNase I 酶去除 RNA 中的痕量 DNA;用 M-MLV 反转录酶对 1 μg 总 RNA 进行反转录,获得第一链 cDNA;根据 GenBank 中检索到的仙女扇(异)甲基丁香酚(登录号:U86760)和月季花氧位甲基转移酶基因(登录号:AB086103)核苷酸和氨基酸保守序列,设计 1 对兼并引物为 OMT1:5'-STTGT-KGATGTTGGGGGCGGGCTAGG-3'和 OMT2:5'-ACAAC-WATBACYTTBCCATTTRTCVGG-3',以 cDNA 第一链作为模板进行 PCR 扩增;根据获得的保守序列,设计 3'-RACE 特异引物为 OMT3:5'-AGGGTATCAATTCGACTTGCC-3',按 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 说明书进行操作,获得 3'端序列;将保守区序列和 3'-RACE 序列进行拼接,按 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书设计 2 个特异引物为 OMT4:5'-GCTTTAGGCAGTGCTCATCGCTC-3'和 OMT5:5'-CACTCCAGGATAGGAAGGGGCAT-3',分别与试剂盒中的引物进行扩增,获得 5'端序列;所有扩增产物经回收、纯化,连接 pGM-T 载体,转化 *Escherichia coli* TOP10 感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆,送北京奥科公司进行测序。根据 3'端和 5'端拼接序列设计 2 条特异引物为 OMT6:5'-GAACGTAAACATAGACAGTCCA-3'和 OMT7:5'-AGTGTG-TAAGTTTTTCATATGCCT-3',PCR 扩增、克隆、测序,获得梅花氧-甲基转移酶基因 cDNA 全长编码序列。将测序得到的核苷酸序列和推导的氨基酸序列分别在 NCBI 上用 Blast 软件进行同源性检索,序列拼接、分析和同源性比较用 DNAMAN 软件完成;采用 Mega 4.0 软件构建植物 OMTs 类似基因蛋白的分子系统进化树。

1.3 荧光定量 PCR 表达分析

通过 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 软件获得与 *OMTs* 基因的相似序列,在基因的编码序列中跨内含子设计 2 条 *OMTs* 基因特异引物分别为 *OMT8*:5' - TTCCCTC-CCGGATTGAG - 3' 和 *OMT9*:5' - TCGACTTGCCCCATGTT-GTA - 3', 目标片段为 294 bp; 以 *GAPDH* 作为内参基因设计引物 *GAPDH* gsp1:5' - ACCACAGTCCATGCCATCAC - 3 和 *GAPDH* gsp2:5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTA - 3', 目标片段为 440 bp。对 PCR 扩增产物凝胶检测和测序,进一步验证引物设计的特异性,同时根据 C_T 值绘制标准曲线。总量为 20 μ L 的荧光 PCR 反应体系为: H_2O 12.1 μ L; 10 pmol/L 上游引物 0.2 μ L, 10 pmol/L 下游引物 0.2 μ L; 20 \times SYBR 染料 0.5 μ L; 2.5 mmol/L dNTP 0.4 μ L; 25 mmol/L $MgCl_2$ 2.4 μ L; 10 \times buffer 2.0 μ L, 5 U/ μ L *Taq* 酶 0.2 μ L, 模板 2.0 μ L。利用 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System 荧光定量 PCR 仪进行扩增,反应程序为: 95 $^{\circ}C$ 120 s, 1 个循环; 95 $^{\circ}C$ 10 s, 57 $^{\circ}C$ 10 s, 72 $^{\circ}C$ 45 s, 40 个循环, 72 $^{\circ}C$ 读取荧光值; 循环

结束, 60 $^{\circ}C$ 保温 60 s, 进行熔解曲线分析, 检测每份样品的 *OMTs* 基因和内参基因 C_T 值。每份样品重复 3 次。根据标准曲线计算定量结果平均值、校正值、标准差, 使用 Microsoft Excel 2007 软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 梅花 *PmOMT* 基因 cDNA 全长的获得及序列分析

结果表明, 以梅花的花朵 cDNA 为模板, *OMT1*、*OMT2* 为引物进行 PCR 扩增, 获得 1 个 300 bp 大小的片段, 经 Blast 比对, 该片段与其他植物 *OMTs* 基因有较高的同源性; 3' - RACE 获得含 Poly (A) 尾大小为 581 bp 的 3' 端序列, 5' - RACE 获得 1 个 829 bp 的 5' 端序列; 用 DNAMAN 软件进行拼接, 设计 1 对特异引物 PCR 扩增, 最终获得 1 条长为 1 322 bp 的基因全长 cDNA 序列, GenBank 登录号为 GU339212, 命名为 *PmOMT*, 该基因完整的开放阅读框长 1 134 bp, 编码 377 个氨基酸 (图 1), 5' 端非编码区长 23 bp, 3' 端非编码区长 165 bp。

```

1      GGAACGTAACATAGACAGTCCAATGGATTCTTCATTGGAGAGAAAAAGCCATCCCAAAATAATCATGCTG
1      M D S S L E R K S H P K I N H A E
73     AGCCTGAGGATGAAATTACAAAGGAAGAGGAAGAAGAAAGCTTCTGCTATGCCATGCAGCTGGTGGGTCTT
18     P E D E I T K E E E E S F C Y A M Q L V G S S
145    CTGCGCTGTCCATGTCTCTGCAATCAGCAATTAAGCTTGGGGTTTTTGACATCATGCCAGAGAGGGTCCAG
42     A L S M S L Q S A I K L G V F D I I A R E G P D
217    ATGCCAAGCTCTCTCTGCTGTCATTGCAGCCAAGATTGGCACAAGAACCCTGAGGCACCAATGATGGTGG
66     A K L S S S S I A A K I G T K N P E A P M M V D
289    ATAGAATCCTCAGGCTCCTCACCAGCCACTCTGTTCTTAATTGCTCTGCTGTTGCTGCTAATGGTGGGCTG
90     R I L R L L T S H S V L N C S A V A A N G G S D
361    ATTTTCAGAGGTCTACAGCCTTGGCCCTGTGCTAAGTACTTTGTGAGTGATGAAGAAGGTGGTCTTTGG
114    F Q R V Y S L G P V S K Y F V S D E E G G S L G
433    GCCCCTCGACTGACACTGATTCAAGACAAGGTCTTCATGAAAGCTGGTCTCAACTGAAAGATGCAGTTGTTG
138    P S M T L I Q D K V F M E S W S Q L K D A V V E
505    AAGGAGGAATTCATTAAACAGGGTCCATGGCATGCACGCCTTTGAGTATCCAGGTTTGGACCCAGGTTTA
162    G G I P F N R V H G M H A F E Y P G L D P R F N
577    ATCAAGTGTTCAACACAGCAATGTTAAACACACCACCATTGTCATCAAGAACTTCTTCATATCTACAAGG
186    Q V F N T A M F N H T T I V I K K L L H I Y K G
649    GTCTTGGAAGACAAGAACCTCACACACTTGTGTGATGTTGGTGGTGGTGGTGGAGTGACCCTTAATCTGATCA
210    L E D K N L T Q L V D V G G G L K D A V V E
721    CATCTAGATATCAACATATAAAGGGTATCAATTCGACTTGCCCCATGTTGTAATCATGCCCTTCCTATC
234    S R Y Q H I K G I N F D L P H V V N H A P S Y P
793    CTGGAGTGGAACATGTTGGAGGAGACATGTTGCTAGTGTTCGAAGTGGTATGCCATTTTATGAAGTGGA
258    G V E H V G G D M F A S V P S G D A I F M K W I
865    TACTTCATGATTGGAGCGATGAGCACTGCCTAAAGCTGTTGAAGAATGTTACAAAGCTATCCAGACAATG
282    L H D W S D E H C L K L L K N C Y K A I P D N G
937    GAAAAGTGATTGTTGTGAAGCACTTCTCCAGCTATGCCAGAGACTAGCACTGCTACGAAAACCACTTCCC
306    K V I V V E A L L P A M P E T S T A T K T T S Q
1009   AACTTGATGTGGTGATGATGACTCAAAATCCGGGAGGGAAGGAGAGGAGTGAACAAGAATTCATGGCTCTGG
330    L D V V M M T Q N P G G K E R S E Q E F M A L A
1081   CAACTGGTGTGATTAGTGGCATCAGATGAATGTTTGTCTGTAACCTTTGGGGTTATGGAGTCTCTTTA
354    T G A G F S G I R Y E C F V C N F W E F F K
1153   AGTAACCAAGGCATATGAAAACCTACACACTAAAATGAAGGAGTTAAGTCTCCAAGCTAATAAAAGATTGG
377    *
1225   CAAATGTTCTTATCTATAAGCAATAAAATATTGAAGACTCAGAGTACTGCACATAAAGTCTGCAGATTATT
1297   TTACTCTGTGGAACAAAAA

```

*代表终止密码子

图1 梅花 *PmOMT* 基因的 cDNA 序列开放阅读框及推导的氨基酸序列

2.2 *PmOMT* 编码氨基酸的同源性分析

由图 2 可见, *PmOMT* 基因编码的氨基酸序列与其他物种的氧 - 甲基转移酶具有较高的同源性, 其中, 与催化形成甲基 (异) 丁香酚的月季花氧 - 甲基转移酶基因 *RcOMT1*、*RcOMT3* 同源性分别为 67.6%、67.8%; *PmOMT* 具有植物 *OMTs* 典型

的 3 个保守基序。

2.3 *PmOMT* 蛋白系统进化树的构建

由图 3 可见, *OMT* 基因编码的氨基酸序列明显分为 2 个类群, *COMTs* 是氧 - 甲基转移酶蛋白序列, *OMTs* 是类黄酮蛋白序列; *PmOMT* 与 *RcOMT1* 遗传距离相对最近, 同属氧 - 甲

基转移酶基因类。

2.4 *PmOMT* 在梅花不同组织中的特异性表达

以 *GAPDH* 基因作为内参照,采用荧光定量 PCR 方法对梅花不同组织中 *PmOMT* 的表达进行检测。由图 4 可见,

PmOMT 基因在所有组织均有表达,相对表达量由高到低依次为雄蕊、花瓣、雌蕊、萼片、叶片、茎、根,生殖器官组织的 *PmOMT* 基因相对表达量高于营养器官组织。

| | | |
|-------------------------|---|-----|
| <i>C. breweri</i> COMT | MGSTGNAETQLTPTHVSD EE ANLFAMQ LA SA | 31 |
| <i>C. breweri</i> IEMT | MGSTGNAEI QII PTHSSD EE ANLFAMQ LA SA | 31 |
| <i>R. chinesis</i> OMT1 | MASPLEIEIFGCP SI HVD AK RK... EE ESFHHAVQ IM LS | 37 |
| <i>R. chinesis</i> OMT2 | MGSTG...ETQMTPTQVSD EE ANLFAMQ LA SA | 29 |
| <i>P. mune</i> OMT | MDSSLERKSHPKINHA EP ED ET TK EEEE ESFCYAMQ IV GS | 40 |
| <i>C. breweri</i> COMT | SVL PM VLKAA IE LDVLEIMAK SI PHGSGAY IS PAET IA AQ L | 71 |
| <i>C. breweri</i> IEMT | AVL PM ALKAA IE LDVLEIMAKSVPPSG...YISPAET IA AQ L | 69 |
| <i>R. chinesis</i> OMT1 | SVL PM SMQ LA ID LG LDVIAKA...GTD AK LSALD IA AK I | 74 |
| <i>R. chinesis</i> OMT2 | SVL PM VLKAA IE LDLLEIMAKA...GPGAF LS PND IA SQ L | 66 |
| <i>P. mune</i> OMT | SALSMS LS QSAIK LG VFD II ARE...GPD AK LS SS G IA AK I | 77 |
| <i>C. breweri</i> COMT | FTTN PD AFV ML DRVLRLLIASYSVVTCSLREL PD GKVE...RL | 110 |
| <i>C. breweri</i> IEMT | FTTN PD AFV ML DRVLRLLIASYSVVTYTLREL PS GKVE...RL | 108 |
| <i>R. chinesis</i> OMT1 | GTKN PD AFV TL DRILRL LT AHSVLS CS VVTG...QRL | 108 |
| <i>R. chinesis</i> OMT2 | FTKN PD AFV ML DRVLRLLIASYSILTYSLR TL PDGKVE...RL | 105 |
| <i>P. mune</i> OMT | GTKN PD AF MM VDRILRL LT SHSVLNCSAVAANGSD GF QRV | 117 |
| <i>C. breweri</i> COMT | YGLA FV CKFLT KN EDGVSLA PL CLMNQ DK VL ME SWY YL KD | 150 |
| <i>C. breweri</i> IEMT | YGLA FV CKFLT KN EDGVSLA PL LLTAT DK VLL EP WF YL KD | 148 |
| <i>R. chinesis</i> OMT1 | YSLTA VSK H FT SE DC ASLSPVMASIQANV MNS WSQ VK D | 148 |
| <i>R. chinesis</i> OMT2 | YGLG FV CKFLT KN EDGV SIA ALCLMNQ DK VL VE SWY HL KD | 145 |
| <i>P. mune</i> OMT | YSLG FV SKYFVSD EE GGSLG PS MTLIQ DK V ME SW SQ LDK | 157 |
| <i>C. breweri</i> COMT | AILDGGIPFNKAYG MT A FE YHGT DP RFNKVFN RG MSD H ST | 190 |
| <i>C. breweri</i> IEMT | AILEGGIPFNKAYG MN E FD YHGT DH RFNKVFN KG MSS N ST | 188 |
| <i>R. chinesis</i> OMT1 | AIVEGGIPFNRVH GK H FE YAD SD RFN QV FN SG MVNL TT | 188 |
| <i>R. chinesis</i> OMT2 | AVLDGGIPFNKAYG MT A FD YHGT DP RFNKVFN KG MAD H ST | 185 |
| <i>P. mune</i> OMT | AVVEGGIPFNRVH GM H AF EY PG L DP RFN QV NTAMFN HT TI | 197 |
| <i>C. breweri</i> COMT | ITMKKIFEMYTG FE A...LNTIVDVGGGTGAVLSMIVAKY P | 228 |
| <i>C. breweri</i> IEMT | ITMKKILEMYNG FE G...LTTIVDVGGGTGAVASMI VA KY P | 226 |
| <i>R. chinesis</i> OMT1 | LVMRRILD SY QG FE H...LTQVVDVGGGLGVALGLITSRY P | 226 |
| <i>R. chinesis</i> OMT2 | ITMKKILETYK GE G...LTSIVDVGGGTGAVVMIVSKY P | 223 |
| <i>P. mune</i> OMT | IVIKKLLHIYK GL EDKNLTQLVDVGGGLGVTLNLITSRY Q | 237 |
| 保守基序 I | | |
| <i>C. breweri</i> COMT | SIKGINE DL PHVIEDAP IY PGVEHVG GD MEVSV PK GDAIF | 268 |
| <i>C. breweri</i> IEMT | SINAIN ED LPHVIQDAPAFSGVEHLGGDM FD GV PK GDAIF | 266 |
| <i>R. chinesis</i> OMT1 | HIKGVN ED LPHVIKHAPHYFGVQHVGGDM FS NP SG GDAIF | 266 |
| <i>R. chinesis</i> OMT2 | SIKGINE DL PHVIEDAPQYFGVQHVGGDM FS V PK GDAIF | 263 |
| <i>P. mune</i> OMT | HIKGINE DL PHVVNHAPSYPGVEHVG GD MEASV PS GDAIF | 277 |
| 保守基序 II | | |
| <i>C. breweri</i> COMT | MKWICH D WSDEHCLK EL LKN QY AALPEHGKVI VA ECIL EL LS | 308 |
| <i>C. breweri</i> IEMT | IKWICH D WSDEHCLK EL LKN QY AALPDHGKVI VA EYIL PP S | 306 |
| <i>R. chinesis</i> OMT1 | MKNILH D WMDEQCTK EL LKNWY TA IPDNGKVI VV EALV SV E | 306 |
| <i>R. chinesis</i> OMT2 | MKWICH D WSDEHCLK EL LKN QY AALPDNGKVI L GECIL PV A | 303 |
| <i>P. mune</i> OMT | MKWILH D WSDEHCLK EL LKN QY KATPDNGKVI VV EALL PP AM | 317 |
| 保守基序 III | | |

图2 梅花及其他物种 OMTs 氨基酸序列分析

3 结论与讨论

从梅花的花朵中克隆得到的 *PmOMT* 基因具有植物 OMTs 基因典型的 3 个保守基序,与大多数植物的 OMTs 基因具有较高的同源性,其中,与同属蔷薇科的月季花甲基(异)丁香酚氧-甲基转移酶 *RcOMT1* 和未知功能的 *RcOMT3* 基因

同源性相对最高。将 *PmOMT* 与部分已知功能的植物 OMTs 作氨基酸序列分子进化树发现,*PmOMT* 属于咖啡酸氧-甲基转移酶(COMTs)1类,且在选取的梅花组织中均有表达。有研究表明,COMTs 亚家族基因对苯环上含有 2 个邻位羟基的底物具有优先催化的特性,香草兰(*Vanilla planifolia*) COMTs 基因优先以 3,4-二羟基-苯甲醛为底物形成香草

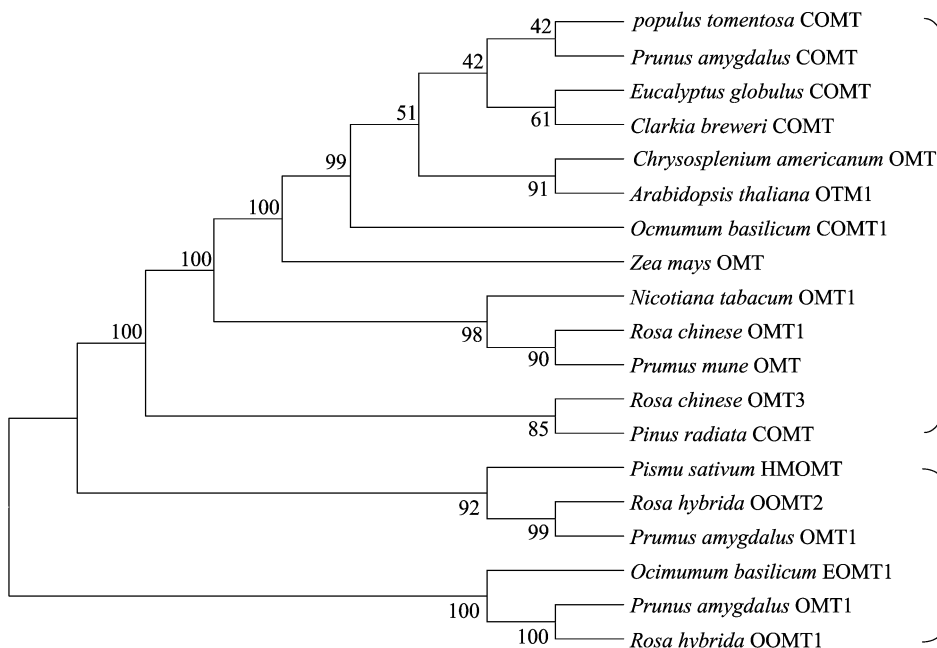


图3 三轮玉蝶梅 *PmOMT* 基因编码氨基酸与其他植物 OMTs 氨基酸分子系统进化树

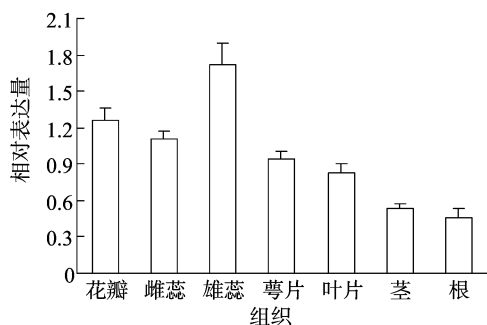


图4 三轮玉蝶梅不同器官组织 *PmOMT* 基因的相对表达量

醛^[6],以 3,4-二羟基-5-甲氧基苯甲醛为底物形成丁香醛^[7],这种特性在金腰属 (*Chrysosplenium americanum*)、杨树 (*Populus deltoids*)、月季花、草莓 (*Fragaria × ananassa*) 等植物^[8-11]上都有表现。

梅花 *PmOMT* 基因参照月季花 *RcOMT1* 基因采用同源克隆法克隆,与 *RcOMT1* 具有最高的同源性和亲缘关系,且 *PmOMT* 基因在三轮玉蝶梅生殖器官的表达量高于营养器官。(异)丁香酚和甲基(异)丁香酚都是梅花的花香产物,(异)丁香酚在苯基上含有 2 个邻位羟基,鉴于 *COMTs* 亚家族基因对苯环上含有 2 个邻位羟基的底物具有优先催化的特性,因此初步认为 *PmOMT* 基因属于 *COMTs* 基因,但是否能直接决定花香的形成仍须进一步探究。

参考文献:

- [1] 赵印泉,潘会堂,张启翔,等. 梅花花朵香气成分时空动态变化的研究[J]. 北京林业大学学报,2010,32(4):201-206.
- [2] Shukla R,Prasad V. Population fluctuations of the oriental fruit fly, *dacus dorsalis hendel*, in relation to hosts and abiotic factors[J]. Trop Pest Manage,1985,31(4):273-275.
- [3] Christensen A B,Gregersen P L,Olsen C E,et al. A flavonoid 7 -

O - methyltransferase is expressed in barley leaves in response to pathogen attack[J]. Plant Molecular Biology,1998,36(2):219-227.

- [4] Maury S,Geoffroy P,Legrand M. Tobacco *O* - methyltransferases involved in phenylpropanoid metabolism: the different caffeoyl - coenzyme A/5 - hydroxyferuloyl - coenzyme A 3/5 - *O* - methyltransferase and caffeic acid/5 - hydroxyferulic acid 3/5 - *O* - methyltransferase classes have distinct substrate specificities and expression patterns[J]. Plant Physiology,1999,121(1):215-223.
- [5] Dudareva N,Murfit L M,Mann C J,et al. Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers [J]. Plant Cell,2000,12(6):949-961.
- [6] Pak F E,Gropper S,Dai W D,et al. Characterization of a multifunctional methyltransferase from the orchid *Vanilla planifolia* [J]. Plant Cell Reports,2004,22(12):959-966.
- [7] Kota P,Guo D J,Zubieta C,et al. *O* - Methylation of benzaldehyde derivatives by "lignin specific" caffeic acid 3 - *O* - methyltransferase [J]. Phytochemistry,2004,65(7):837-846.
- [8] Gauthier A,Gulick P J,Ibrahim R K. Characterization of two cDNA clones which encode *O* - methyltransferases for the methylation of both flavonoid and phenylpropanoid compounds [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,1998,351(2):243-249.
- [9] Kim B G,Lee Y J,Park Y,et al. Caffeic acid *O* - methyltransferase from *Populus deltoides*: functional expression and characterization [J]. Journal of Plant Biology,2006,49(1):55-60.
- [10] Wein M,Lavid N,Lunkenbein S,et al. Isolation,cloning and expression of a multifunctional *O* - methyltransferase capable of forming 2,5 - dimethyl - 4 - methoxy - 3(2H) - furanone,one of the key aroma compounds in strawberry fruits [J]. The Plant Journal,2002,31(6):755-765.
- [11] Wu S Q,Watanabe N,Mita S,et al. Two *O* - methyltransferases isolated from flower petals of *Rosa chinensis* var. *spontanea* involved in scent biosynthesis [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2003,96(2):119-128.