



主持人:徐冉,张洪亮

橡胶树 *HbCCoAOMT* 家族基因的鉴定

张倩玉,袁红梅

(海南大学 南繁学院/三亚南繁研究院,海南 三亚 572025)

摘要: 为了进一步了解 *HbCCoAOMT* 基因在橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 生长发育和抵抗逆境中的作用,本研究通过分析巴西橡胶树的全基因组测序数据,对 *HbCCoAOMT* 家族基因进行鉴定分析,得到了40个 *HbCCoAOMT* 家族成员,探讨其在染色体上的分布、结构域特征及组织特异性。结果显示,橡胶树共有18条染色体, *HbCCoAOMT* 成员只分布于1、3、4、11、13、17、18这7条染色体上。表达模式分析发现,有12个成员在所有5个组织中均有表达; *HbCCoAOMT* 酶活检测结果表明,在橡胶树的茎中 *HbCCoAOMT* 酶活性最高。此外,从橡胶树中成功克隆获得表达丰度最高的 *HbCCoAOMT1* 基因,该基因 CDS 长 746 bp,编码 241 个氨基酸。将 *HbCCoAOMT1* 构建在原核表达载体 pET28a 上,并在大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中成功表达 *HbCCoAOMT1* 重组蛋白。分析 *HbCCoAOMT1* 启动子区域发现多种激素或胁迫相关顺式作用元件。

关键词: 巴西橡胶树; CCoAOMT; 基因家族; 蛋白表达

中图分类号: S794.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054 (2024) 06-0728-09

张倩玉,袁红梅. 橡胶树 *HbCCoAOMT* 家族基因的鉴定 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(6):728-736. doi:10.15886/j.cnki.rdsxb.20240093

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 原产于南美洲亚马逊盆地^[1],贡献了全球98%以上的天然橡胶^[2],是天然橡胶商业化生产的唯一植物。我国植胶区处于热带地区北部边缘,并不属于传统植胶区,导致我国橡胶树常受到经常受到环境因素的影响^[3]。木质素是一种复杂的天然多相芳香族聚合物^[4],存在于植物的细胞壁和维管束细胞中,在机械支撑、抵抗逆境、水分运输等方面有重要作用^[5]。当植物面临非生物胁迫时,木质素可通过提高细胞膜的流动性和稳定性来增强植物的抗逆性^[6]。咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶 (caffeoyl-coenzyme A-O-methyltransferase, CCoAOMT),是木质素生物合成途径中的关键酶^[7],在木质素合成途径中以咖啡酰辅酶 A 为底物,将 S-腺苷甲硫氨酸上的甲基基团转移到底物苯环上,形成阿魏酰辅酶 A^[8]。咖啡酰

辅酶 A-O-甲基转移酶与木质素合成过程中的其他酶相比发现较晚,1989年,分别在胡萝卜 (*Daucus carota var. sativa*) 和欧芹 (*Petroselinum crispum*) 的细胞悬浮培养中发现^[9-10],后在烟草 (*Nicotiana tabacum*)^[11]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[12]、番茄 (*Solanum lycopersicum*)^[13]、黄麻 (*Corchorus capsularis*)^[14] 等多种植物中都相继成功克隆到 CCoAOMT 基因,并发现 CCoAOMT 基因可以提高植物的抗逆性。2016年,晁金泉等^[15]从巴西橡胶树无性系‘热研7-33-97’的乳管细胞中克隆到1个木质素合成关键酶 CCoAOMT 基因的同源基因,该基因受割胶和乙烯利的诱导,是影响乳管细胞壁的物理性能和乳管细胞膨压的因素之一。

为了进一步了解 *HbCCoAOMT* 基因在生长发育和抵抗逆境中的重要作用,笔者鉴定了橡胶树

收稿日期: 2024-06-05

修回日期: 2024-06-30

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目 (321RC478);“崖州湾”菁英人才科技专项 (SCKJ-JYRC-2023-19);海南省重点研发项目 (ZDYF2022XDNY251)

第一作者: 张倩玉 (1999-),女,海南大学南繁学院(三亚南繁研究院)2021级硕士研究生。E-mail:1023884030@qq.com

通信作者: 袁红梅 (1986-),女,教授,博士生导师。研究方向:作物抗逆分子基础与遗传调控。E-mail:yuanhongmei@hainanu.edu.cn

中 *HbCCoAOMT* 家族基因成员, 并系统地分析了其在染色体上的分布、结构域特征及表达模式。从橡胶树中成功克隆到表达丰度最高的一个 *HbCCoAOMT* 基因 *HbCCoAOMT1*, 并在大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中成功表达 *HbCCoAOMT1* 重组蛋白。并在 *HbCCoAOMT1* 启动子区域发现了激素响应元件和逆境胁迫响应元件。该研究为下一步开展 *HbCCoAOMT1* 基因的功能研究奠定基础, 同时也为橡胶树抗逆境研究提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 供试的橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 为‘热研 7-33-97’的组培苗幼苗(购自中国热带农业科学院橡胶研究所), 于温室生长 3 个月后用于实验。大肠杆菌 DH5 α 、DE3 感受态, 购于上海唯地生物技术有限公司。

RNA 提取试剂盒与 RNA 反转录试剂盒购于北京天根生物有限公司, 构建载体使用的 Ready-to-Use Seamless Cloning Kit 购于 BBI 生命科学有限公司。感受态细胞、Taq 酶购买自 TOLOBIO 生物有限公司, D2000 DNA ladder、质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒等购于中科瑞泰生物科技有限公司。pMD-19T 载体购买于 Takara 生物公司, pET28a 载体为实验室留存。蛋白纯化所用试剂盒为碧云天公司 His 标签蛋白纯化试剂盒(耐变性剂型)。

1.2 橡胶树 CCoAOMT 基因家族成员鉴定 在 National Genomics Data Center (NGDC, <https://ngdc.cncb.ac.cn/>) 下载橡胶树‘热研 8-79’基因组数据 PRJCA004986, 并在 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 网站下载 CCoAOMT 保守结构域的隐马尔科夫模型 (Hidden Markov Model, HMM) 文件 PF01596, 利用 HMMER 3.0 软件 hmmersearch 功能, 在橡胶树基因组内搜索阈值 $P < 1e^{-10}$ 的序列, 得到 *HbCCoAOMT* 基因家族的候选成员。将候选成员的

序列通过在线网站 SMART (<https://smart.embl.de/>) 进行保守结构域分析, 进一步验证得到橡胶树 *HbCCoAOMT* 基因家族成员。

1.3 橡胶树 CCoAOMT 基因家族成员理化性质分析及染色体定位 利用 TBtools 将橡胶树的染色体信息从橡胶树基因组注释文件中提取出来, 并将 *HbCCoAOMT* 基因家族成员在染色体上的物理位置信息整理成表, 利用在线工具 MapGene2Chromosome v2 (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/) 将基因定位到对应染色体上进行可视化展示。将 *HbCCoAOMT* 基因家族成员基因序列上传至 ExPASy 在线软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行预测蛋白的分子量与等电点。通过在线网站 Cello (<http://cello.life.nctu.edu.tw/cgi/main.cgi>) 预测其亚细胞定位位置。

1.4 橡胶树 CCoAOMT 基因家族成员保守结构域、基因结构和基序分析 通过 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 数据库确定 *HbCCoAOMT* 基因的保守结构域。使用 TBtools 软件确定 *HbCCoAOMT* 基因家族基因结构(内含子-外显子)。使用 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 网站预测 *HbCCoAOMT* 基因家族的基序(motif), 得到的结果使用 TBtools 软件进行可视化。

1.5 基因的克隆与载体构建 利用 Primer5 软件设计基因引物、DNAMAN 软件分析蛋白组成、亲疏水性分析和进行序列对比。根据 *HbCCoAOMT* 序列设计引物(表 1)进行 PCR 扩增, 其反应体系均为 20 μ L (模板 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 2 \times PCR Taq Mixture 10 μ L, dd H₂O 12.8 μ L), PCR 反应条件为: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 52 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 33 个循环。PCR 产物回收纯化后, 连接到 pMD19-T 载体上, 构建重组质粒转化到 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆并进行测序。

表 1 本研究引物序列

Tab. 1 Primer sequences in the study

引物名称 Primer	序列 Primer sequence(5'-3')
HbCCoAOMT-F	CGGGATCCATGGCATCCAACAATGAAC
HbCCoAOMT-R	CGGGATCCCTTGATCCGACGGCAGA
pET28a-HbCCoAOMT-F	AGCAAATGGGTGCGGAATGGCATCCAACAATGAAC
pET28a-HbCCoAOMT-R	CGGAGCTCGAATTCGGACTTGATCCGACGGCAGA

1.6 HbCCoAOMT 总酶活的检测 HbCCoAOMT 酶活的测定使用博研生物的植物咖啡酰辅酶 A-O-转移酶(CCoAOMT)elisa 试剂盒。通过底物的显色反应,来计算样品中 HbCCoAOMT 活性。取 3 月龄的橡胶树的根、茎、叶和树皮,加入 PBS 缓冲液提取用于测定的粗酶液。

1.7 橡胶树 CCoAOMT 原核表达与纯化 将 *HbCCoAOMT1* 通过同源重组法构建到 pET28a(+) 载体上(总体积为 10 μ L、2 \times Seamless Cloning Master Mix 5 μ L、线性化载体 1 μ L、带有同源臂的基因片段 4 μ L,PCR 仪中 50 $^{\circ}$ C 反应 20 min)并转入大肠杆菌 DE3 感受态中,菌液加入不同浓度的 IPTG(0.01、0.1、0.5、1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),分别在 28 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 诱导 12 h。将原核表达得到的带有 6 \times His-tag 的 HbCCoAOMT1 融合蛋白使用 His 标签蛋白纯化试剂盒进行纯化。

2 结果与分析

2.1 橡胶树 CCoAOMT 基因生物信息学分析

2.1.1 橡胶树 CCoAOMT 家族基因的鉴定及染色体定位 CCoAOMT 已经在多种植物中被克隆和分析,并发现 CCoAOMT 有超家族现象,但在橡胶树中 CCoAOMT 家族还没有被鉴定和分析,为了了解 *HbCCoAOMT* 家族成员的情况,笔者下载 CCoAOMT 的保守结构域文件并利用 HMMER 3.0

软件的 hmmersearch 功能对基因组文件进行搜索,将阈值 $P < 1e^{-10}$ 的序列作为 *HbCCoAOMT* 可能存在的成员。通过对候选成员进行结构域分析,共得到 40 个橡胶树 *HbCCoAOMT* 家族成员。按照染色体顺序,将其依次命名为 *HbCCoAOMT1* 至 *HbCCoAOMT40*。染色体定位结果显示,橡胶树共有 18 条染色体,*HbCCoAOMT* 成员只分布于 1、3、4、11、13、17、18 这 7 条染色体上,其中 *HbCCoAOMT* 在 4 号染色体上成员最多,共有 8 个 CCoAOMT 家族基因,在 1 号和 13 号染色体上最少,各只有 1 个 CCoAOMT 家族基因。*HbCCoAOMT* 家族的氨基酸长度介于 119 aa 和 645 aa 之间,大部分成员长度集中在 100 aa 至 350 aa 之间,理论等电点最低为 5.01,最高为 10.07,大多集中于 5.00 ~ 7.00 之间。大多数 *HbCCoAOMT* 家族成员定位主要在细胞质中。

2.1.2 基因家族成员保守结构域、基因结构和基序分析 如图 2 所示,*HbCCoAOMT* 家族成员的外显子数目在 3 ~ 10 个之间,*HbCCoAOMT34* 所含有的外显子最多(10 个),*HbCCoAOMT7*、*HbCCoAOMT13*、*HbCCoAOMT20*、*HbCCoAOMT35* 四个成员只有 3 个外显子。不同 *HbCCoAOMT* 之间在保守基序和基因结构上的差异可能是影响其亚细胞定位和功能的重要原因。

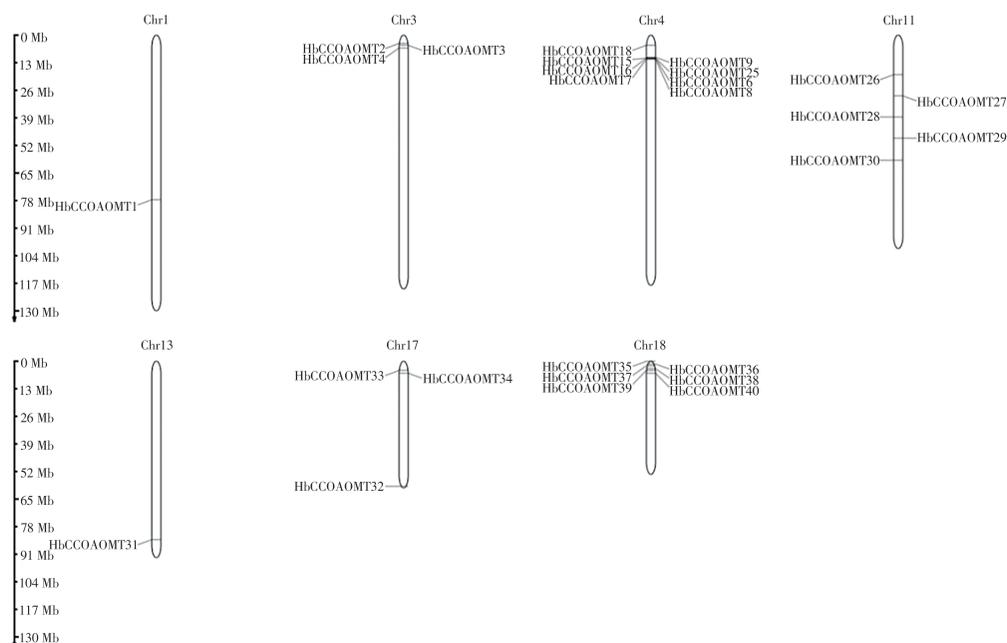


图1 *HbCCoAOMT* 家族成员染色体定位分布情况

Fig. 1 Chromosome localization and distribution of *HbCCoAOMT* family members

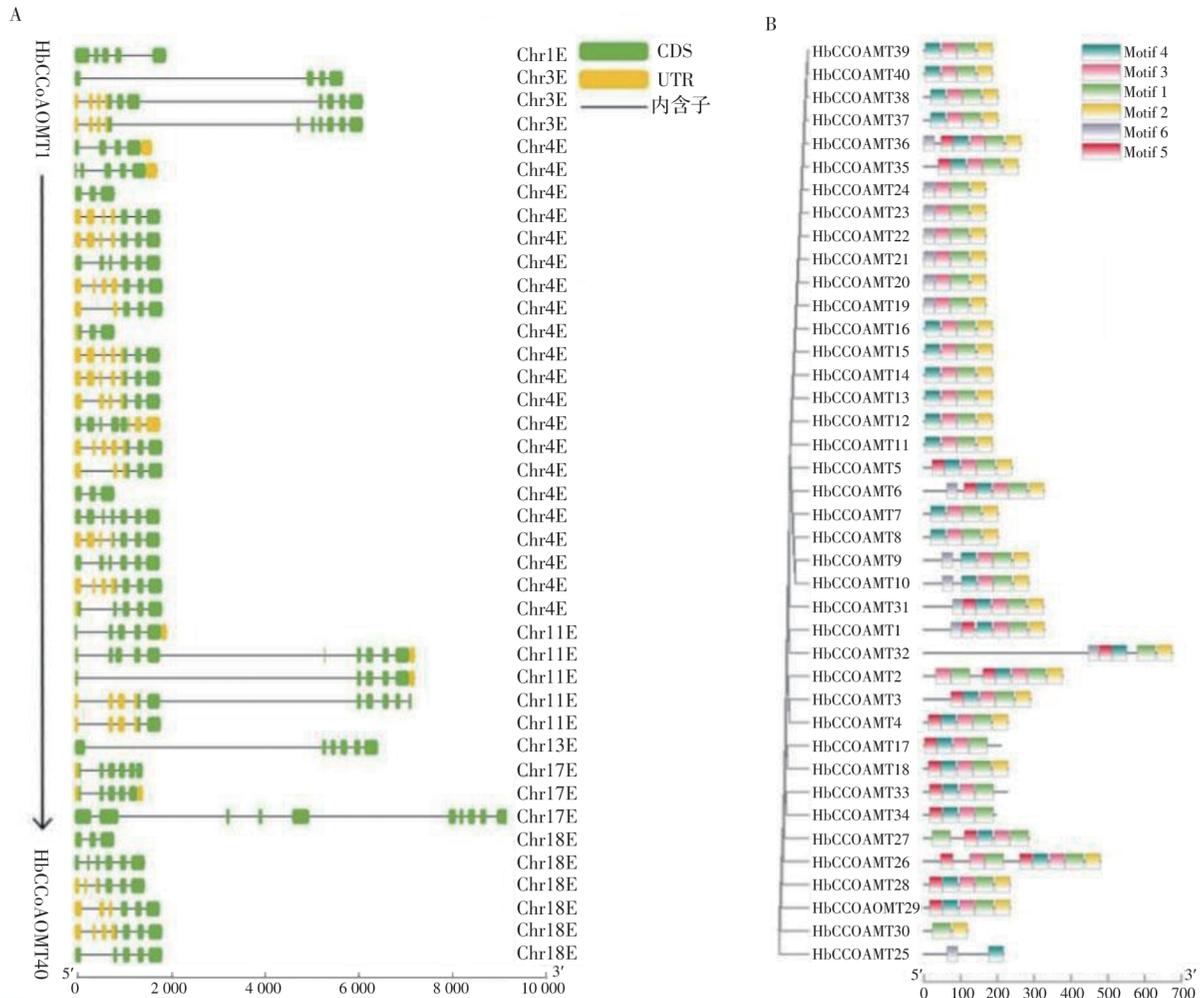


图 2 *HbCCoAOMT* 家族基因结构和基序分析

A: *HbCCoAOMT* 家族成员序列信息 B: *HbCCoAOMT* 家族成员结构域信息。

Fig. 2 Gene structure and motif analysis of *HbCCoAOMT* family

A: Information of *HbCCoAOMT*s members sequence; B: Domain information of *HbCCoAOMT* family.

将 *HbCCoAOMT* 家族蛋白序列输入到 MEME 网站上进行在线分析, 并利用 TBtools 将其与进化树结合和美化。共预测到 6 个 *HbCCoAOMT* 家族基因 motif (表 2): *HbCCoAOMT25*、*HbCCoAOMT30* 中含有的 motif 数最少只有 2 个。

除 *HbCCoAOMT25* 外, 所有基因序列中都含有 motif1、motif2。motif3 也存在于除 *HbCCoAOMT25*、*HbCCoAOMT30* 外的每一个序列中。因此, 推测 *HbCCoAOMT* 家族的成员具有相似的生物学功能。

表 2 橡胶树 *HbCCoAOMT* 家族基因保守基序

Tab. 2 Sequence information of *HbCCoAOMT*s motifs

名称 Motif	序列 Sequence
Motif1	KYHGTDFDFIVDADKDNLYLNHYKRTIELVKVGGGLIGYDNTLWNGSVAAPP
Motif2	KYVRFYLDYVLEFNKAIAADPRVEICQLPVGDGITLCRRIS
Motif3	MDINRENYELGLPVIEKAGVAHKIDFREGPALPVLQDLIQD
Motif4	ADEGQFLSMLLKLINAKNTMEIGVYTGYSLLATALALPDDG
Motif5	QYILETSVYPREPEPLKELREATANHPWNIMTTS
Motif6	MPRTLWEQNTLGLTHQLPLLLLFLMMARY

2.1.3 橡胶树CCoAOMT家族基因表达模式分析与总酶活的检测

组织特异性分析结果(图3)显示,所有基因均至少在1个组织中表达,另有11个基因在所有组织中均表达。*HbCCoAOMT*基因的表达模式具有明显的组织部位特异性,*HbCCoAOMT*家族基因大部分在树皮和雄花中表达量较高,在叶片中表达量较低。40个*HbCCoAOMT*基因中有14个(*HbCCoAOMT1-6*、*HbCCoAOMT25-30*、*HbCCoAOMT32*)在雄蕊中表达最高,而其他16个(*HbCCoAOMT7-24*、*HbCCoAOMT31*、*HbCCoAOMT33-40*)在树皮内层中表达最高。为了检测橡胶树各组织

中CCoAOMT酶活情况,笔者利用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测了橡胶树根、茎、叶和树皮中的CCoAOMT酶活。结果显示(图4):CCoAOMT酶活在茎中活力最高,在根、叶、树皮中较少,这可能是由于CCoAOMT家族成员多在树皮内层表达有关。树皮内层含有输导组织和木质化组织细胞壁,木质素是植物次生细胞壁的重要组分,而CCoAOMT作为木质素合成途径中的关键酶,可以推测在树皮内层大量表达的CCoAOMT家族成员,通过调控植物次生细胞壁中木质素的合成,进而影响植物组织的机械强度和隔水性。

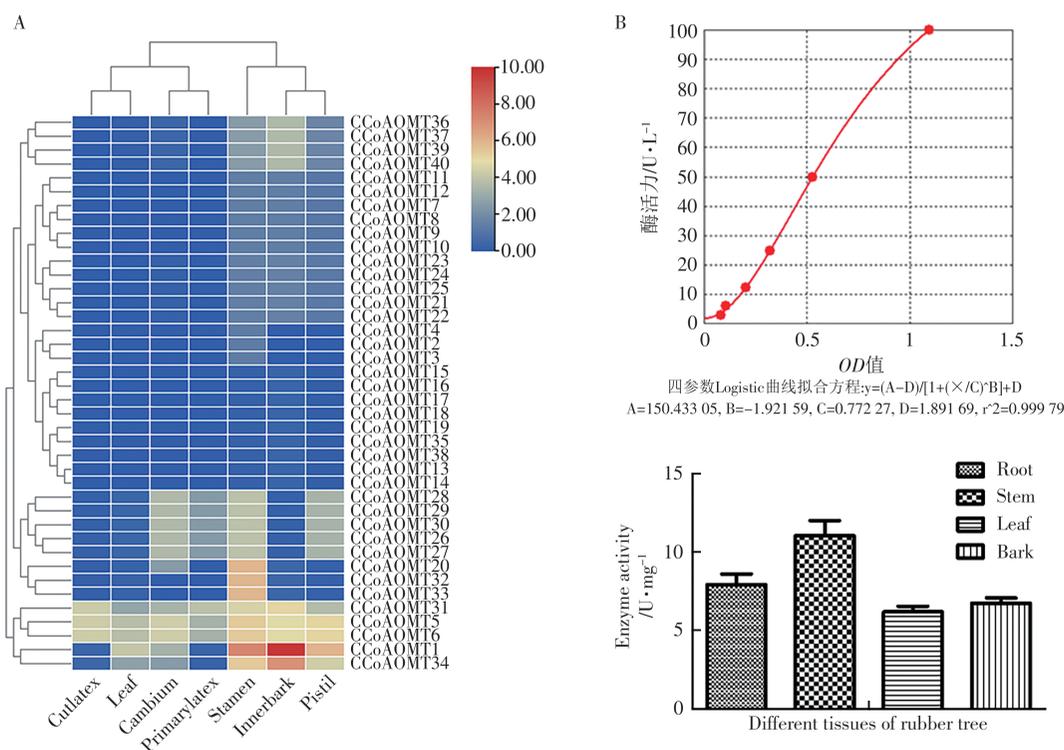


图3 *HbCCoAOMT*家族基因表达模式分析与总酶活的检测

A: *HbCCoAOMT*家族在不同组织中的表达情况; B: 不同组织中CCoAOMT总酶活。

Fig. 3 Analysis of gene expression pattern of *HbCCoAOMT* family and detection of total enzyme activity

A: Expression of *HbCCoAOMTs* in different tissues; B: Activity of *HbCCoAOMT* in different tissues.

2.2 *HbCCoAOMT1*的功能分析

2.2.1 *HbCCoAOMT1*的克隆与生物信息学分析

为了进一步探究*HbCCoAOMT*家族基因的功能,笔者克隆了表达丰度最高的*HbCCoAOMT1*,利用DNAMAN软件设计引物,以橡胶树叶片cDNA为模板得到了一条长为741bp的片段,与目的条带大小符合。将获得的基因片段纯化回收并连接到pMD-19T载体上,送至擎科生物公司进行测序。测序结果在NCBI网站上进行BLAST比对,获得了与

目标基因序列完全一致的基因片段。使用DNAMAN将*HbCCoAOMT1*氨基酸序列与其他物种中的CCoAOMT氨基酸序列进行比对,CCoAOMT家族内存在8种不同的保守序列元件^[15],而其中所包含的3种为植物甲基化原件中所共有原件,其余5个为CCoAOMT所特有,A(LVKVGGGLIG)、B(VAPPDAPLRKY)、C(ALAVDPRIEICM)、D(TSVYPREPEPMKELRELT)、E(KLINAKNTMEIGVYTGYSLLATA)、F(PVIQKAGVAHKIEF)、G(DFIFVDAD

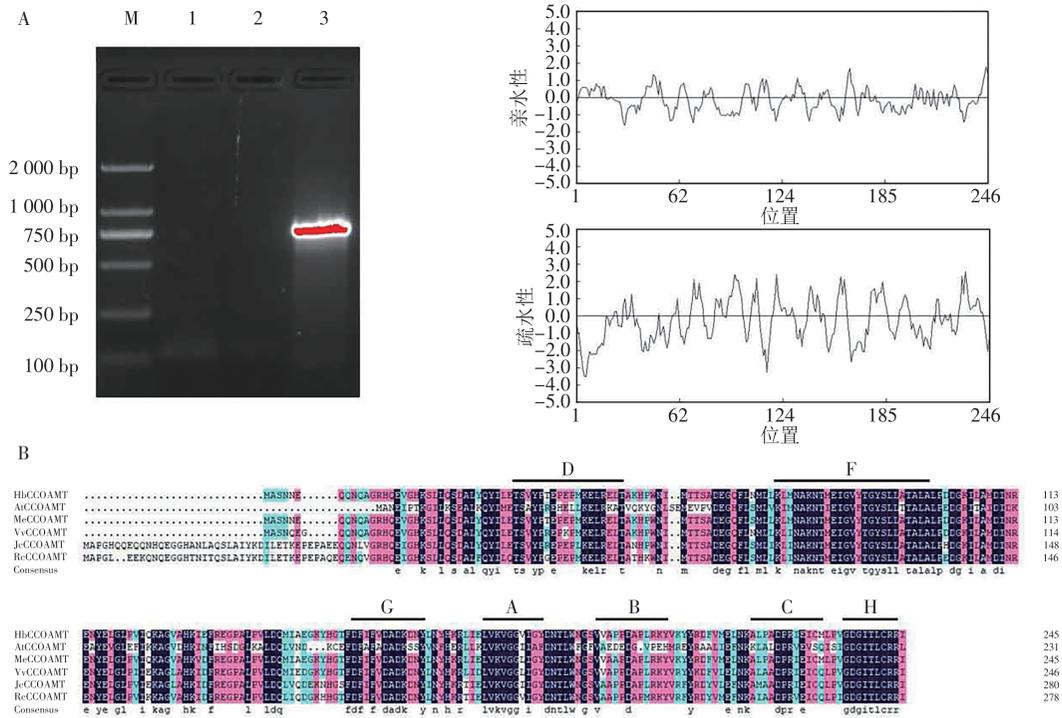


图 4 *HbCCoAOMT1* 基因的扩增与分析

A: 电泳检测 *HbCCoAOMT1*; B: *HbCCoAOMT1* 与其他物种中 *CCoAOMT* 的氨基酸序列比对; C: *HbCCoAOMT1* 的亲水性和疏水性分析。

Fig. 4 Amplification and analysis of *HbCCoAOMT1* gene

A: Electrophoresis detection of *HbCCoAOMT1*; B: Amino acid sequence comparison between *HbCCoAOMT1* and *CCoAOMT* in other species; C: Hydrophilic and hydrophobic analysis of *HbCCoAOMT1*.

KDNY) 和 H(GDGITLCRR)。如图 B 所示, *HbCCoAOMT1* 也具有上述 8 个保守序列元件。

2.2.2 *HbCCoAOMT1* 的蛋白表达与纯化 为了进一步探究 *HbCCoAOMT1* 蛋白的功能, 设置了不同的诱导温度、IPTG 浓度对 *HbCCoAOMT1* 蛋白进

行原核表达。结果如图 7 所示, 所设的 4 个 IPTG 浓度在 28 °C 和 37 °C, 均能诱导表达出 *HbCCoAOMT1* 蛋白。以 28 °C、0.01 mmol·L⁻¹ IPTG 作为表达 *HbCCoAOMT1* 蛋白的诱导条件, 大量诱导蛋白后在超声波下进行破碎并进行纯化, 可以得到条带单一

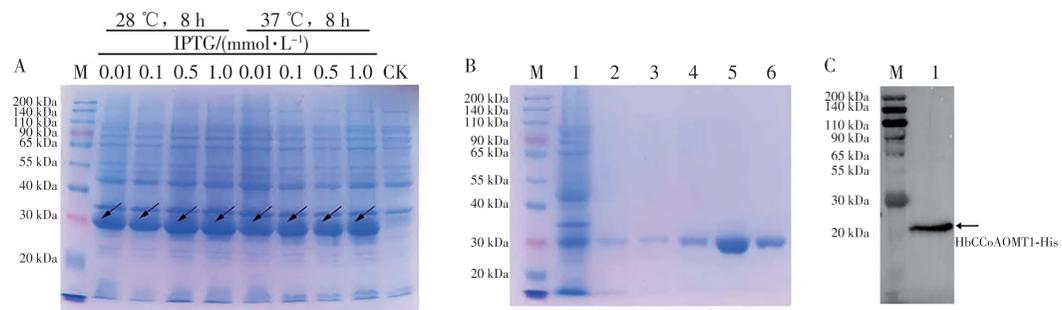


图 5 *HbCCoAOMT1* 的原核表达

A: SDS-PAGE 检验 *HbCCoAOMT1* 的表达; B: 可溶性 *HbCCoAOMT1* 重组蛋白的纯化; M: Protein marker; 1: 经 IPTG 诱导的细菌裂解液上清; 2~6: 50、100、150、200、250 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱液所得蛋白; C: Western blot 检验 *HbCCoAOMT1* 重组蛋白。

Fig. 5 Prokaryotic expression of *HbCCoAOMT1*

A: SDS-PAGE assay of *HbCCoAOMT1*; B: Purification of soluble *HbCCoAOMT1* recombinant protein; M: Protein marker; 1: Supernatant of bacterial lysis solution induced with IPTG; 2~6: Proteins extracted with the solution eluted with 50, 100, 150, 200, 250 mmol·L⁻¹ of imidazole, respectively; C: Western blot assay of *HbCCoAOMT1* recombinant protein.

的蛋白,使用 His-tag 单克隆抗体通过 Western blot 可以检测到单一的杂交条带,证明所得到蛋白确为 HbCCoAOMT1-His 融合蛋白,可以进行后续实验。

2.2.3 HbCCoAOMT1 的启动子分析 启动子顺式元件与基因功能密切相关,本研究提取 *HbCCoAOMT1* 起始密码子前 2 000 bp 作为 *HbCCoAOMT1* 的启动子进行分析,将数据上传至 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/>

<http://plantcare/html/>) 进行结合元件预测。*HbCCoAOMT1* 基因的启动子顺式作用元件包含有光响应元件 (Box 4、GT1-motif、TCT-motif、LAMP-element、MRE), 激素响应元件 (生长素 AuxRR-core, 茉莉酸甲酯 MYC、CGTCA-motif 和 TGACG-motif, 乙烯响应元件 ERE, 脱落酸响应元件 AAGAA-motif 等, 逆境胁迫响应元件 (干旱 MBS、TC-rich repeats, 抗氧化反应元件 STRE、ARE 和 GC-motif, 机械伤害反应元件 WUN-motif)。

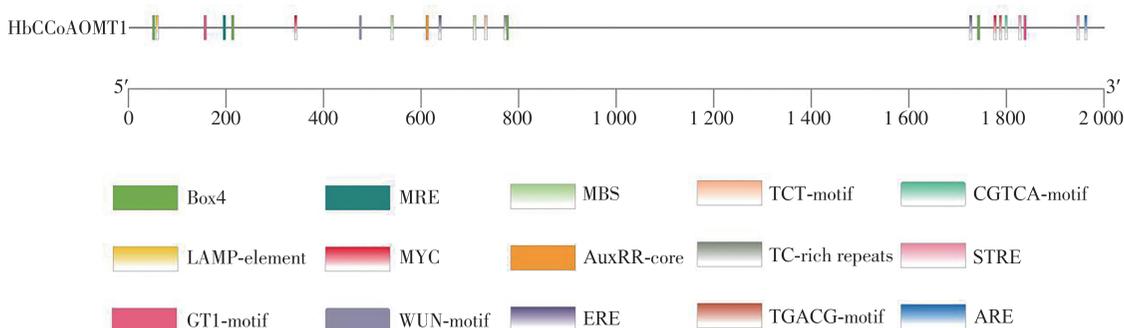


图6 *HbCCoAOMT1* 基因启动子区域的顺式作用元件预测

Fig. 6 Prediction of *cis*-acting element in the promoter region of *HbCCoAOMT1* genes

3 讨论

咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶 (*CCoAOMT*) 是一种具有完整 AdoMet MTases 结构域蛋白,催化咖啡酰辅酶 A (caffeoyl-CoA) 生成阿魏酰辅酶 A (feruloyl-CoA),在木质素生物合成中发挥重要作用^[16]。

本研究对橡胶树全基因组数据库进行检索,共鉴定出了 40 个 *HbCCoAOMT* 家族基因。数量与紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)^[17] (44 个)、葡萄 (*Vitis vinifera*)^[18] (38 个) 相近,但远多于拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) (24 个)、茶树 (*Camellia sinensis*)^[19] (10 个) 等植物。可能是因为这可能与橡胶树与蓖麻分离后又独立经历过 1 次全基因组复制事件有关^[20]。在橡胶树 3、4、17 和 18 号等 4 条染色体上共发现有 *HbCCoAOMT* 基因的串联重复事件,说明片段重复事件可能是 *HbCCoAOMT* 基因家族成员进化的主要原因,推测蛋白质功能在不同物种中发生了更细化的分化,使生物体能够适应不同的环境条件。

鉴定出的 40 个 *CCoAOMT* 家族基因表现出高度的序列保守性。同源性高的成员通常具有相似的外显子数和保守的蛋白基序,基因结构分析表

明,*HbCCoAOMT* 基因最少由 3 个外显子和 2 个内含子组成,在氨基酸序列、基因结构和保守基序方面表现出高度的相似性,理论等电点也大多相近。*HbCCoAOMT* 蛋白结构分析表明, Motif1 和 Motif2 出现在 *HbCCoAOMT* 蛋白中的频率最高,不同亚组 *HbCCoAOMT* 蛋白保守基序有差异,同一亚组内有更多相似的基序,这些基因内部的差异可能会影响它们的功能。这表明 *HbCCoAOMT* 基因在功能上既有相似性又有差异性,突出了它们在调节植物生长发育中的协同作用。

对 40 个 *HbCCoAOMT* 家族基因的组织特异性表达模式进行分析,发现具有明显的组织部位特异性, *CCoAOMT* 家族基因成员在大部分在树皮和雄花中表达量较高,这可能和其行使不同功能有关。木质素是所有维管植物细胞内细胞壁所必需的组分,大多存在于植物的木质部,可以增强植物细胞壁的疏水性,促进植物组织、器官的发育, *HbCCoAOMT* 作为木质素合成途径的关键酶,笔者推测在树皮内层表达量最高的 *HbCCoAOMT* 家族基因成员,在抗击外来侵袭、抵御病害袭击、维持正常生长等方面发挥着重要作用^[9]。而在雄蕊中表达量最高的 *HbCCoAOMT* 家族基因成员,笔者推测

是在花粉发育过程中起到作用,这与在拟南芥中的报道相一致^[21]。

在分析 *HbCCoAMT1* 启动子序列的过程中,预测到了 WRKY、MYB 等转录因子的结合位点,这些转录因子广泛参与植物的生长发育和响应生物/非生物胁迫。与此同时,本研究鉴定到多个激素响应相关元件,如乙烯响应元件 ERE、茉莉酸响应元件 MYC 和 CGTCA-motif、脱落酸响应元件 AAGAA-motif、赤霉素响应元件 GARE-motif 等。这些激素相应元件和转录因子的结合位点都暗示了 *HbCCoAMT1* 在遭遇逆境胁迫时受到激素调控,并且在橡胶树逆境胁迫响应中同样扮演重要角色。

总之,通过对橡胶树 *CCoAOMT* 基因家族进行鉴定,本研究共获得 40 个橡胶树 *CCoAOMT* 基因家族成员。通过对橡胶树 *CCoAOMT* 基因在不同组织部位表达的特异性分析,发现橡胶树 *CCoAOMT* 基因主要在雄蕊和树皮内层表达。和部分橡胶树 *CCoAOMT* 基因的高表达相对应,树皮内层酶活性也显著高于其他组织,这说明这一部分 *CCoAOMT* 基因可能与增强植物机械强度相关。以上结果为进一步研究橡胶树 *CCoAOMT* 基因的生物学功能、调控橡胶树生长发育与逆境响应的分子机制奠定了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] OGHENEKOME U O. Natural rubber, *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg, germplasm collection in the Amazon Basin, Brazil: a retrospective[J]. Economic Botany, 2004, 58(4): 544–555.
- [2] CHAO J, WU S, SHI M, et al. Genomic insight into domestication of rubber tree[J]. Nature communications, 2023, 14(1): 4651.
- [3] LIU H, HE Q, HU Y, et al. Genome-wide identification and expression profile analysis of the phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Hevea brasiliensis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(9): 5052.
- [4] LIU Q, LUO L, ZHENG L. Lignins: biosynthesis and biological functions in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(2): 335.
- [5] HONGO S, SATO K, YOKOYAMA R, et al. Demethylesterification of the primary wall by PECTIN METHYLESTERASE35 provides mechanical support to the *Arabidopsis* stem[J]. The Plant Cell, 2012, 24(6): 2624–2634.
- [6] VANHOLME R, DEMEDTS B, MORREEL K, et al. Lignin biosynthesis and structure[J]. Plant Physiology, 2010, 153(3): 895–905.
- [7] KAHIE M A, WANG Y, FANG P, et al. Evolution and expression analysis of the caffeoyl-CoA3-O-methyltransferase (CCoAOMT) gene family in jute (*Corchorus L.*)[J]. BMC Genomics, 2023, 24(1): 204.
- [8] HUA Z Q, SHI L, TAI W, et al. Expression analysis of *Oryza sativa* CCoAOMT gene[J]. Chin Sci Bull, 2004, 14: 1390–1394.
- [9] 单超然, 陈晓慧, 丁云飞, 等. 水曲柳 FmCCoAOMT 基因在木质素合成及非生物胁迫中的功能分析[J]. 植物研究, 2023, 43(5): 768–778.
- [10] KUHNL T K U, HELLER W. Elicitor induced S-adenosyl-L-methionine: caffeoyl-CoA3-O-methyltransferase from carrot cell suspension cultures[J]. Plant Sci, 1989, 60 (1): 21–25.
- [11] PAKUSCH A, KNEUSEL R, MATERN U. S-adenosyl-L-methionine: trans-caffeoyl-coenzyme A3-O-methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension cultures[J]. Arch-BiochemBiophys, 1989, 271 (2): 488–494.
- [12] MARTZ F, MAURY S, PINÇON G, et al. cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-CoA3-O-methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme[J]. Plant Molecular Biology, 1998, 36(3): 427–437.
- [13] RAES J, ROHDE A, CHRISTENSEN J H, et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2003, 133(3): 1051–1071.
- [14] MIAO L, SHOU S, ZHU Z, et al. Isolation of a novel tomato caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase gene following infection with the bacterium *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Phytopathology, 2008, 156(10): 588–596.
- [15] 晁金泉, 陈月昇, 杨署光, 等. 巴西橡胶树 *HbCCoAOMT* 基因克隆及其表达分析[J]. 热带作物学报, 2016, 37(12): 2338–2344.
- [16] ZHANG G, ZHANG Y, XU J, et al. The CCoAOMT1 gene from jute (*Corchorus capsularis L.*) is involved in lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. Gene, 2014, 546(2): 398–402.
- [17] GIORDANO D, PROVENZANO S, FERRANDINO A, et al. Characterization of a multifunctional caffeoyl-CoA O-methyltransferase activated in grape berries upon drought stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry: PPB, 2016, 101: 23–32.
- [18] LIU S J, HUANG Y H, HE C J, et al. Cloning, bioinformatics and transcriptional analysis of caffeoyl-coenzyme A3-O-methyltransferase in switchgrass under abiotic stress[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(3): 636–649.
- [19] ZHAO D, LUAN Y, SHI W, et al. A *Paeonia ostii* caffeoyl-CoA O-methyltransferase confers drought stress tolerance by promoting lignin synthesis and ROS scavenging[J]. Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology, 2021, 303: 110765.
- [20] 丁霄, 曹彩荣, 李朋波, 等. 植物木质素的合成与调控研究进展[J]. 山西农业科学, 2016, 44(9): 1406–1411.

- [21] LAI Z, WANG J, FU Y, et al. Revealing the role of CCoAOMT1: fine-tuning bHLH transcription factors for optimal anther development[J]. *Science China Life Sciences*, 2024, 67(3): 565–578.

Genome-wide analysis of *HbCCoAOMT* gene family in rubber tree

ZHANG Qianyu, YUAN Hongmei

(School of Breeding and Multiplication /Sanya Institute of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China)

Abstract: To further understand the role of the *HbCCoAOMT* gene in the growth, development, and stress resistance of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*), the *HbCCoAOMT* family genes were identified and analyzed by examining the whole genome sequencing data of *H. brasiliensis*. A total of 40 members of the *HbCCoAOMT* family were identified, and their distribution on chromosomes, domain characteristics, and tissue expression profiles were analyzed. The results revealed that *HbCCoAOMT* members were only distributed in 7 chromosomes: 1, 3, 4, 11, 13, 17, and 18 out of the 18 chromosomes in rubber trees. Expression pattern analysis indicated that 12 members were expressed in all the five tissues. The *HbCCoAOMT* enzyme activity assay showed the enzyme activity was highest in the stems of *H. brasiliensis*. Moreover, *HbCCoAOMT1*, which had the highest expression abundance, was successfully cloned from *H. brasiliensis*. The CDS length of *HbCCoAOMT1* is 746 bp, encoding 241 amino acids. *HbCCoAOMT1* was inserted into the prokaryotic expression vector pET28a, and the recombinant *HbCCoAOMT1* protein was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Analysis of the *HbCCoAOMT1* promoter region showed that *HbCCoAOMT1* contains various hormone- and stress-related *cis*-acting elements.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; CCoAOMT; gene family; prokaryotic expression

(责任编辑:潘学峰)