

• 药材与资源 •

菘蓝中咖啡酸氧甲基转移酶 *IiCOMT* 的克隆与表达分析

张国宁¹, 李元玉¹, 马雪祺³, 李姝诺¹, 陈万生^{1,2*}, 肖莹^{1*}

1. 上海中医药大学 中药研究所中药资源与生物技术中心, 上海 201203

2. 第二军医大学附属长征医院 药学部, 上海 200003

3. 上海中医药大学 中药炮制教研室, 上海 201203

摘要:目的 克隆菘蓝 *Isatis indigotica* 中咖啡酸氧甲基转移酶(*I. indigotica* fortune caffeic acid *O*-methyltransferase, *IiCOMT*) 编码基因, 并进行生物信息学及表达分析。方法 采用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆菘蓝 *IiCOMT* 的全长 cDNA, 进而通过 PCR 获得其基因组 DNA 序列。通过 qRT-PCR 检测 *IiCOMT* 在四倍体菘蓝和二倍体菘蓝各器官以及不同胁迫条件下的表达情况。结果 *IiCOMT* 全长 cDNA 为 1376 bp (GenBank 登录号 DQ115905), 包含 1 个 1092 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码 363 个氨基酸残基, 其对应的 DNA 序列含有 3 个内含子, 4 个外显子。*IiCOMT* 基因在 2 种倍性菘蓝的根茎叶均有表达, 且四倍体菘蓝中的表达均高于二倍体。胁迫因素盐处理 (NaCl)、冷处理 (4 °C)、水杨酸 (salicylic acid, SA)、茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA)、赤霉素 (gibberellic acid, GA3) 和脱落酸 (abscisic acid, ABA) 均能诱导 *IiCOMT* 表达水平上调。结论 *IiCOMT* 的克隆及表达分析, 为进一步阐明与咖啡酸氧甲基转移酶相关的四倍体菘蓝优良性状形成的分子机制奠定了基础。

关键词: 菘蓝; 咖啡酸氧甲基转移酶; 基因克隆; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)01-0214-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.01.024

Cloning and expression analysis of caffeic acid *O*-methyltransferase in *Isatis indigotica* (*IiCOMT*)

ZHANG Guo-ning¹, LI Yuan-yu¹, MA Xue-qi³, LI Shu-nuo¹, CHEN Wan-sheng^{1,2}, XIAO Ying¹

1. Research and Development Center of Chinese Medicine Resources and Biotechnology, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Department of Pharmacy, Shanghai Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

3. Department of TCM Processing, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To clone the caffeic acid *O*-methyltransferase (*IiCOMT*) coding gene from *Isatis indigotica*, and perform its bioinformatics and expression analysis. **Methods** The full-length cDNA of *IiCOMT* was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE), and its genomic DNA sequence was obtained by PCR. qRT-PCR was used to detect the expression of *IiCOMT* in tetraploid and diploid *I. indigotica* organs and under different stress conditions. **Results** The full-length cDNA of *IiCOMT* was 1376 bp (GenBank accession number: DQ115905) in length with an open reading frame (ORF) of 1092 bp, encoding a polypeptide of 363 amino acid residues, and its corresponding DNA sequence contained three introns and four exons. *IiCOMT* gene was expressed in the roots, stems and leaves of the two kinds of *I. indigotica*, and the expression level in the tetraploid *I. indigotica* was higher than that of diploid. Salt (NaCl), cold (4 °C), salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA), gibberellic acid (GA3) and abscisic acid (ABA) treatments could all induce the up-regulation of *IiCOMT* expression. **Conclusion** The investigation of gene cloning and expression analysis of *IiCOMT* laid a foundation for further elucidating the molecular mechanism underlying the superiority of tetraploid *I. indigotica* related to caffeic acid *O*-methyltransferase.

Key words: *Isatis indigotica* Fort.; caffeic acid *O*-methyltransferase; gene cloning; bioinformatics; expression analysis

收稿日期: 2021-06-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81874335); 国家自然科学基金资助项目 (31872665); 上海市青年科技启明星计划 (18QB1402700); 上海中医药大学项目 (A1-GY20-306-02-08)

作者简介: 张国宁 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然产物生物合成与代谢调控。E-mail: 1351877424@qq.com

*通信作者: 肖莹, 教授, 研究方向为天然产物生物合成。E-mail: xiaoyingtcm@shutcm.edu.cn

陈万生, 教授, 研究方向为基于药效物质的中药品质调控。E-mail: chenwansheng@shutcm.edu.cn

染色体加倍是植物进化过程中一个普遍的现象,也是促进植物优异性状形成的重要动力,如抗旱、抗虫、器官巨型等。这些性状可使多倍体植物更好地适应生态环境的变化并增加其在农业应用方面的机会^[1]。

菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 是一种在中国被广泛使用的中药材原植物,与模式植物拟南芥同属十字花科,其根入药为板蓝根,叶入药为大青叶,具有清热解毒、凉血消斑、利咽止痛的功效^[2]。本课题组前期通过多倍体育种,筛选获得了高产、高抗且抗病毒活性高的四倍体菘蓝优良品系^[3]。化学成分研究显示,以落叶松脂素为代表的木脂素类成分是板蓝根发挥抗病毒功效的活性物质基础,其在四倍体菘蓝中的含量显著高于二倍体亲本。然而,需要指出的是即使在四倍体板蓝根中,抗病毒活性成分落叶松脂素及落叶松脂素苷的含量仍然较低,分别仅为 47.14、84.67 $\mu\text{g/g}$ ^[4]。本课题组前期利用拟南芥全基因组寡核苷酸芯片对二倍体和四倍体菘蓝的全基因组基因表达进行比较研究,发现木脂素单体生物合成途径的一些基因在四倍体中的表达明显高于二倍体,包括咖啡酰氧甲基转移酶 (caffeic acid *O*-methyltransferase, *COMT*)、咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶 (caffeoyl-CoA *O*-methyltransferases, CCoAOMT) 和苯丙氨酸裂解酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL)^[5]。基于以上推测,这些酶在四倍体菘蓝中的高表达可能使得特定木脂素单体合成增加,进而影响到以之为合成中间原料的落叶松脂素及其苷的生物合成,这很可能是四倍体菘蓝抗病毒活性高的原因。因此,四倍体菘蓝中高表达的木脂素生物合成途径基因的获得及表达特征的评价可作为研究四倍体菘蓝抗病毒活性高的遗传基础的重要切入点。

COMT 是较早发现的参与木质素单体生物合成的关键酶,可以催化咖啡酸 (caffeic acid)、咖啡醛 (caffealdehyde)、咖啡醇 (caffeyl alcohol)、5-羟基松柏醛 (5-hydroxyconiferaldehyde) 和 5-羟基松柏醇 (5-hydroxyconiferyl alcohol) 的氧甲基化反应^[6-11]。自从 1991 年 Bugos 等^[12]首次从杨树中克隆出 *COMT* 基因,目前已有众多 *COMT* 基因从植物中克隆获得,包括拟南芥、小麦、高粱、苜蓿、甘蔗等^[13]。在杨树、烟草、苜蓿、玉米等植物中的研究均表明,抑制表达 *COMT* 时,木质素含量显著降低,且影响不同类型木质素单体在木质素总量中的比例^[14-17]。由于 *COMT* 能催化咖啡醇直接生成 G 型

木质素单体松柏醇 (coniferyl alcohol), 该化合物正是菘蓝中抗病毒活性成分落叶松脂素生物合成的重要前体^[11], 因此推测 *COMT* 的表达水平对菘蓝落叶松脂素的含量积累至关重要。

鉴于 *COMT* 对落叶松脂素生物合成的关键作用,且基因芯片的结果也显示四倍体菘蓝中 *COMT* 的表达水平显著高于二倍体亲本,是二倍体的 3.7 倍^[5],提示该基因的高表达与四倍体菘蓝中落叶松脂素的高积累密切相关。因此,本实验对菘蓝 *COMT* (*IiCOMT*) 进行了基因克隆和表达特征研究,以期通过分子育种提高落叶松脂素等抗病毒活性成分的含量,培育高品质菘蓝品系奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

二倍体和四倍体菘蓝种子采集自海军军医大学药学院植物园,由第二军医大学乔传卓教授提供并鉴定为菘蓝 *I. indigotica* Fort.。

1.2 试剂

DH5 α 感受态细胞和 Taq Plus DNA 聚合酶购自申能博彩生物工程公司,克隆载体 pMD-18T、One Step RNA PCR Kit 试剂盒、LA Taq 酶、DNA 分子量标准 DL-2000 均购自 TaKaRa 公司(日本),RNA 提取所用 TRIzol 试剂和 DNA 提取所用 CTAB 试剂购自 GIBCO 公司(美国),SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒购自 CLONTECH 公司(日本),限制性内切酶购自 New England 公司(美国),小量胶回收试剂盒和小量质粒抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司,NovoScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (E041-01A) 和 NovoScript[®] SYBR One-Step qRT-PCR Kit 试剂盒 (E092-01A) 购自上海近岸蛋白质科技有限公司。引物合成由上海生工生物工程公司完成。

2 方法

2.1 样品的处理

将 2 种种子用水浸泡至出芽后,移至 1:1 的泥炭土和珍珠岩中培养,幼苗生长在 25 $^{\circ}\text{C}$ 光照 [120 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]16 h、18 $^{\circ}\text{C}$ 暗环境 8 h 的控温室中,自来水浇灌。收集生长 2 个月的 2 种倍性菘蓝幼苗的根、茎和叶,用于 RNA 和 DNA 的提取。

2.2 菘蓝核酸的提取以及 RACE cDNA 的获得

取四倍体菘蓝幼苗,按照 CTAB 法以及 TRIzol 法操作说明分别提取菘蓝 DNA 及 RNA。按 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 的操

作程序获得菘蓝 3'-ready 和 5'-ready RACE cDNA, 并分装保存于-20 °C冰箱备用。

2.3 *IiCOMT* 基因全长 cDNA 及对应的基因组序列的获得

以 3'-ready 和 5'-ready RACE cDNA 为模板, 由 *COMT* 特异引物 COMT3'GSP1 和 COMT5'GSP1 进行 PCR, 下游引物为 UPM (Universal Primer A Mix, Clontech 公司, 日本); 以 PCR 产物为模板, 由 *COMT* 特异引物 COMT3'GSP2 和 COMT5'GSP2 进行巢式 PCR, 下游引物为 NUP (Nested Universal

Primer A, Clontech, 日本); 测序结果比对拼接后, 设计 *COMT* 全长引物 COMTF-S 和 COMTF-AS, 分别以菘蓝 cDNA 和 DNA 为模板利用 LA Taq 酶进行 PCR 获得 *IiCOMT* 全长 cDNA 及对应的基因组序列。为了考察二倍体中 *IiCOMT* 基因序列是否与四倍体一致, 以 COMTF-S 和 COMTF-AS 为引物, 二倍体菘蓝 RNA 为模板, RT-PCR 扩增得到了二倍体菘蓝 *COMT* 的 cDNA 序列。电泳回收目的条带克隆到 pMD18-T 载体 (TaKaRa 公司, 日本) 上, 送测序。PCR 实验中所用的引物序列见表 1。

表 1 *IiCOMT* 基因克隆和表达分析所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in gene cloning and expression analyses of *IiCOMT*

用途	引物名称	引物序列 (5'→3')
3'-READY RACE 第 1 轮扩增	COMT3'GSP1	GTGTTCCATTGCTGCTCTTTGTC
	UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATC AACGCAGAGT
3'-READY RACE 第 2 轮扩增	NUP	CTAATACGACTCACTATAGGGC
	COMT3'GSP2	TGGGATTCCATTCAACAAGGCTTATG
5'-READY RACE 第 1 轮扩增	UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATC AACGCAGAGT
	COMT5'GSP1	GCCTCGAGTTCTTTCGCAGTCCGTTT
5'-READY RACE 第 2 轮扩增	COMT5'GSP2	ATGGAGTGCTTGTGGTCAAGAGGC
	NUP	CTAATACGACTCACTATAGGGC
四倍体菘蓝 <i>IiCOMT</i> 基因 CDNA 全长扩增	COMTF-S	AGCAACTGAAAATGGGCTCAACGGTG
	COMTF-AS	GTTTATGTTTTATTCATCACTAAGGGA
二倍体菘蓝 <i>IiCOMT</i> 基因 CDNA 全长扩增	同上	AGCAACTGAAAATGGGCTCAACGGTG
	<i>IiCOMT</i> 基因组 DNA 序列扩增	同上
<i>COMT</i> QRT-PCR	qRT-F	TCATGAAGTGGATATGCCATGC
	qRT-R	CCAACATAATGCAATCAACATGGA
ACTIN QRT-PCR	actin-F	ATCCTCCGTTCTTGACCTTGCT
	actin-R	TTTCCCGTTCTGCTGTTGTG

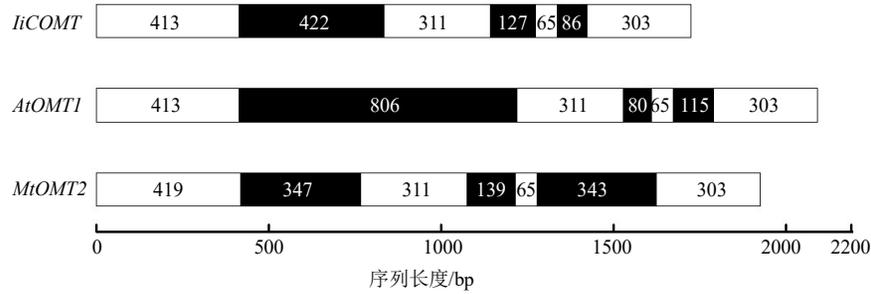
2.4 菘蓝 *COMT* 基因的生物信息学分析

使用 Vector NT I Suite 8.0 软件和 BlastP 2.2.3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行序列比对, 使用网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 ORF Finder 完成 ORF 的查找和核苷酸的翻译。使用 <http://www.expasy.org> 网站提供的相关生物信息学分析软件进行蛋白质基本性质的分析。多重比对中所用 *COMTs* 包括拟南芥 *AtOMT1* (*Arabidopsis thaliana* caffeic acid *O*-methyltransferases, GeneBank 登录号: AT5G54160)、蒺藜苜蓿 *MtOMT2* (*Medicago truncatula* caffeic acid *O*-methyltransferases, GeneBank 登录号 ABE85155)、颤杨 *PtOMT1* (*Populus*

tremuloides caffeic acid *O*-methyltransferases, GeneBank 登录号 Q00763) 和月季 *RcOMT2* (*Rosa chinensis* caffeic acid *O*-methyltransferases, GeneBank 登录号 AB086104)。

2.5 *IiCOMT* 基因的器官及胁迫表达分析

采用 TRIzol 法提取二倍体和四倍体菘蓝的根、茎和叶, 以及各种胁迫处理后的四倍体菘蓝叶片的 RNA。处理方法如下: 将四倍体菘蓝幼苗置于 4 °C 冰箱 32 h 进行冷处理; 将 250 mmol/L NaCl、500 μmol/L 茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA)、100 μmol/L 赤霉素 (gibberellin A₃, GA₃)、100 μmol/L 脱落酸 (abscisic acid, ABA)、1 mmol/L 唾液酸 (sialic



外显子用白色方框表示，内含子用黑色方框表示

The exons are represented as boxes without background and the introns filled with grey background

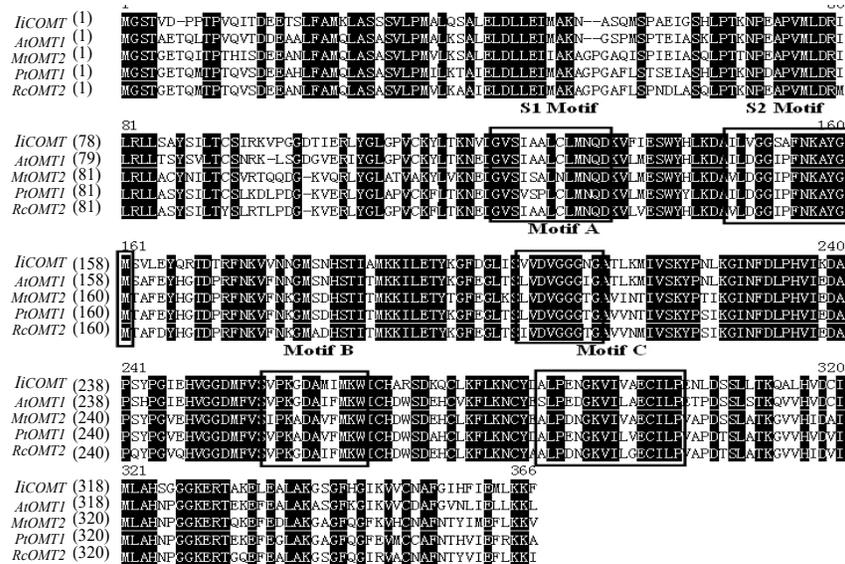
图3 *liCOMT* 及其他 *COMT* 基因编码区对应的基因组序列组成

Fig. 3 Genomic organization of *liCOMT* and other *COMT* genes

3.2 *liCOMT* 蛋白的特征分析

基于 ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)和 Vector NTI Suite 8.0 的预测和分析, *liCOMT* 的等电点 (pI) 为 7.58, 相对分子质量约为 39 480。同源比对发现 *liCOMT* 与其他植物的 *COMTs* 有很高的相似性, 与拟南芥、月季 *Rosa chinensis* Jacq.、颤杨 *Populus tremuloides* Michx. 和蒺藜苜蓿的同源性依次为 79%、71%、71%、70%。在 *liCOMT* 中存在 3 个与甲基供体腺苷蛋氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 结合相关的保守区域, 分别是 Motif A (A₂₀₂~A₂₁₀)、Motif B (A₂₅₄~A₂₆₄)、Motif C (A₂₈₄~A₂₉₉); 并且 Motif A 和 Motif B 及 Motif

B 和 Motif C 之间的距离也是高度保守, 分别是 52、30 (图 4)。基于保守域的特征, 将植物的氧甲基转移酶划分成 2 个超家族, *liCOMT* 属于第 2 类植物氧甲基转移酶 (OMT-II) (表 2)。比对结果显示在 A₁₁₉~A₁₇₅ 这个区域, *liCOMT* 与其他植物的 *COMTs* 之间也有较高的同源性。在这个区域中预测出催化羟基肉桂酸甲基化反应的酶中固有的 2 个保守元件 S1、S2。S1 元件的保守序列是 GVS (V/M/I/L) (A/S) (P/A) (L/I) XLMN (Q/H) (D/G), 在 *liCOMT* 中位于 A₁₁₉~A₁₃₁; S2 元件的保守序列是 (V/I) L (D/E) GG (I/V) PFNKAYGM, 在 *liCOMT* 中位于 A₁₄₅~A₁₅₈, S1 和 S2 通常相隔 13 个氨基酸 (图 4)。



相同的氨基酸残基用黑色背景表示 保守的区域 Motif A、Motif B、Motif C、S1 Motif、S2 Motif 用黑色方框表示

Identical amino acid residues are denoted by black backgrounds. The conserved regions, including Motif A, Motif B, Motif C, S1 Motif and S2 Motif are boxed

图 4 *liCOMT* 蛋白与其他植物 *COMT* 蛋白氨基酸序列的比对

Fig. 4 Full-length alignments of deduced *liCOMT* protein with other plant *COMTs*

表 2 *IiCOMT* 中高度保守的腺苷蛋氨酸依赖的植物 II 类氧甲基转移酶的 7 个特征域及其距离

Table 2 Seven characteristic motifs of plant OMT-II S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases conserved in *IiCOMT* and its distances among them

特征域	保守序列	<i>IiCOMT</i> 序列
Motif A	LVDVGGGXG	VVDVGGGNG
Spacing I	52	52
Motif B	VPXXDAXXMKW	VPKGDAMIMKW
Spacing II	30	30
Motif C	ALPXXGKVIXXEXILP	ALPENGKVIVAECILP
Motif I	LDRXLRL	LDRILRL
Motif J	IKGINFDLPHVI	LKGINFDLPHVI
Motif K	PGVEHVGDMF	PGIEHVGDMF
Motif L	GGKERTXXEFXXLA	GGKERTAKELEALA

3.3 *IiCOMT* 基因的表达分析

使用 qRT-PCR 分析 *IiCOMT* 基因在二倍体、四倍体菘蓝不同器官中的表达情况。结果表明, *IiCOMT* 基因在 2 种倍性菘蓝的根茎叶中均有表达。在二倍体和四倍体菘蓝中 *IiCOMT* 基因表达量最高的均为茎, 这与植物木质素在茎中木质部大量沉积是一致的; 二倍体菘蓝中 *IiCOMT* 基因表达量最低的是根, 而在四倍体中是叶。 *IiCOMT* 基因在四倍体菘蓝根、茎、叶中的表达均显著高于二倍体亲本, 其中四倍体菘蓝根(板蓝根)中 *IiCOMT* 的表达量是二倍体中的约 3.3 倍(图 5)。

为了考察环境胁迫是否影响 *IiCOMT* 表达, 本实验对四倍体菘蓝幼苗进行处理以分析 *IiCOMT* 基因在这些因素影响下的表达变化。结果表明, 与对照相比, 不同处理条件(4 °C、250 mmol/L NaCl、500 μmol/L MeJA、100 μmol/L GA₃、100 μmol/L ABA、1 mmol/L SA)处理 32 h 后, *IiCOMT* 的表达均出现了不同程度的上调。其中 100 μmol/L GA₃ 处理诱导效果最佳, 与对照相比, *IiCOMT* 的表达水平提高了约 4.3 倍(图 6)。

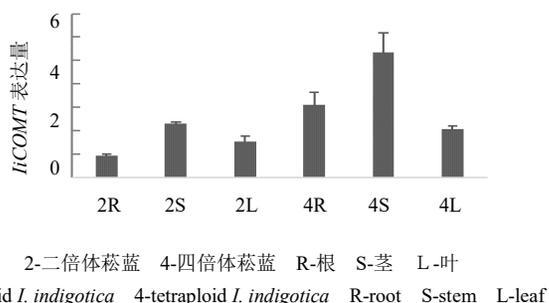


图 5 *IiCOMT* 在二倍体和四倍体菘蓝不同器官中的表达分析
Fig. 5 *IiCOMT* expression levels in diploid and tetraploid *I. indigotica*

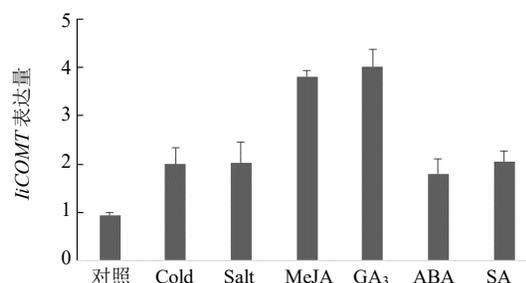


图 6 *IiCOMT* 在不同处理 32 h 后的基因表达分析
Fig. 6 Expression profiling of *IiCOMT* after various treatments for 32 h

4 讨论

四倍体菘蓝是本课题组经过多倍体育种培育的高产高抗且抗病毒活性强的优良品系, 为了探索其优异品质形成的分子机制, 前期进行了深入的研究^[20-24]。研究表明, 从筛选获得的 2 种倍性菘蓝的差异基因入手是揭示四倍体菘蓝优良品质形成的遗传基础的可行之路。

COMT 作为木脂素生物合成的关键酶, 前期拟南芥基因芯片筛选显示四倍体菘蓝中 *COMT* 的表达水平显著高于二倍体亲本^[5], 可作为揭示 2 种倍性菘蓝落叶松脂素等木脂素类成分差异的遗传基础进而通过分子育种培育抗病毒活性好的优质菘蓝品系的重要切入点。因此, 本研究对 *IiCOMT* 进行了基因克隆和表达特征研究。生物信息学分析发现 *IiCOMT* 与其他植物的 *COMTs* 有较高的相似性, 包含 Motif A、Motif B 和 Motif C 保守结构域且三者间离也高度保守, 这能保证其形成特异的空间构型与甲基供体 SAM 结合^[25]; 此外还包含 S1 和 S2 保守元件, 它们可能与酶的底物特异性识别有关^[26]。可以推测, *IiCOMT* 具有其他植物氧甲基转移酶类

似的功能，参与木脂素单体的生物合成。应用 qRT-PCR 检测 *IiCOMT* 在四倍体和二倍体菘蓝不同器官中的表达情况，结果表明 *IiCOMT* 在四倍体菘蓝根、茎、叶中的表达均显著高于二倍体，其中四倍体菘蓝根（板蓝根）中 *IiCOMT* 的表达量是二倍体中的约 3.3 倍，与基因芯片筛选差异表达基因的结果相符^[5]。该结果明确了 *IiCOMT* 在 2 种倍性菘蓝中的表达差异，为研究与之相关的四倍体菘蓝木脂素类成分高积累的分子机制提供了科学依据。

本研究发现寒冷、高盐和多种信号分子（赤霉素、甲基茉莉酸、脱落酸和水杨酸）处理均可以诱导 *IiCOMT* 在四倍体菘蓝中的表达。文献报道，胁迫处理对其他植物中 *COMT* 的表达也具有显著影响。例如，UV-B 处理可以显著提高当归的根、叶柄、叶中 *COMT* (*AsCOMT*) 的表达水平^[27]；聚乙二醇 6000 (PEG) 模拟干旱胁迫能诱导番茄 *COMT* (*SiCOMT1*) 表达量上调^[28]；割胶处理能诱导橡胶树中的 *COMT* (*HbCOMT1*) 的表达水平快速上升^[29]。这些研究结果均提示 *COMT* 可能参与了植物胁迫响应。近期，Zhang 等^[30]研究发现将法国苔草 *Carx rigescens* L. 中的 *COMT* 基因转化拟南芥能提升抗盐胁迫能力；Liu 等^[31]研究发现过表达 *SiCOMT1* 能提高番茄对盐胁迫的抗性。本研究发现多种胁迫处理均可诱导 *IiCOMT* 表达水平的上升，*IiCOMT* 的表达是否能提高菘蓝抗逆水平值得深入研究。此外，*IiCOMT* 诱导表达的结果也提示可以借助诱导处理提高 *IiCOMT* 的表达水平，促进菘蓝中落叶松脂素等抗病毒活性成分的生物合成。

综上，本实验对前期筛选出对菘蓝木脂素类成分生物合成具有潜在调控作用的 *IiCOMT* 基因进行了基因克隆及表达分析研究，为进一步阐明与 *COMT* 相关的四倍体菘蓝优良品质的分子机制提供了条件，也为利用基因工程技术进行分子育种提高落叶松脂素等抗病毒活性成分的含量奠定了基础，具有重要研究意义和现实价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Alix K, Gérard P R, Schwarzacher T, et al. Polyploidy and interspecific hybridization: Partners for adaptation, speciation and evolution in plants [J]. *Ann Bot*, 2017, 120(2): 183-194.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 214.
- [3] 乔传卓, 吴美枢, 戴富宝, 等. 菘蓝多倍体育种的研究

[J]. *J Integrative Plant Biology*, 1989, 31(9): 678-683.

- [4] 李彬. 板蓝根活性成分及品质评价 [D]. 上海: 第二军医大学, 2003.
- [5] Lu B B, Pan X Z, Zhang L, et al. A genome-wide comparison of genes responsive to autopolyploidy in *Isatis indigotica* using *Arabidopsis thaliana* affymetrix genechips [J]. *Plant Mol Biol Report*, 2006, 24(2): 197-204.
- [6] Humphreys J M, Hemm M R, Chapple C. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase [J]. *PNAS*, 1999, 96(18): 10045-10050.
- [7] 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 Physiol*, 1999, 121(1): 215-224.
- [8] Osakabe K, Tsao C C, Li L, et al. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms [J]. *PNAS*, 1999, 96(16): 8955-8960.
- [9] Chen F, Yasuda S, Fukushima K. Evidence for a novel biosynthetic pathway that regulates the ratio of syringyl to guaiacyl residues in lignin in the differentiating xylem of *Magnolia kobus* DC [J]. *Planta*, 1999, 207(4): 597-603.
- [10] Bennett M R, Shepherd S A, Cronin V A, et al. Recent advances in methyltransferase biocatalysis [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 37: 97-106.
- [11] Vanholme R, De Meester B, Ralph J, et al. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, 56: 230-239.
- [12] Bugos R C, Chiang V L, Campbell W H. cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase of aspen [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 17(6): 1203-1215.
- [13] 李波, 倪志勇, 王娟, 等. 木质素生物合成关键酶咖啡酸-O-甲基转移酶基因 (COMT) 的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2010, 8(1): 117-124.
- [14] Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M, et al. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping [J]. *Plant Physiol*, 1999, 119(1): 153-164.
- [15] Pinçon G, Maury S, Hoffmann L, et al. Repression of

- O*-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(7): 1167-1176.
- [16] Guo D, Chen F, Inoue K, *et al.* Downregulation of caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase in transgenic alfalfa. impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(1): 73-88.
- [17] Piquemal J, Chamayou S, Nadaud I, *et al.* Down-regulation of caffeic acid *O*-methyltransferase in maize revisited using a transgenic approach [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(4): 1675-1685.
- [18] Li Q, Chen J, Xiao Y, *et al.* The dirigent multigene family in *Isatis indigotica*: Gene discovery and differential transcript abundance [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 388.
- [19] Shapiro M B, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: Sequence statistics and functional implications in gene expression [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(17): 7155-7174.
- [20] Xiao Y, Feng J, Li Q, *et al.* *liWRKY34* positively regulates yield, lignan biosynthesis and stress tolerance in *Isatis indigotica* [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(12): 2417-2432.
- [21] Pan X Z, Xiao Y, Wang Z N, *et al.* Tetraploids *Isatis indigotica* are more responsive and adaptable to stresses than the diploid progenitor based on changes in expression patterns of a cold inducible *li CPK1* [J]. *Biologia*, 2008, 63(4): 535-541.
- [22] Xiao Y, Yu X, Chen J, *et al.* *liSDD1*, a gene responsive to autopolyploidy and environmental factors in *Isatis indigotica* [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(2): 987-994.
- [23] Lu B B, Du Z, Ding R X, *et al.* Cloning and characterization of a differentially expressed phenylalanine ammonia-lyase gene (*liPAL*) after genome duplication from tetraploid *Isatis indigotica* fort [J]. *J Integr Plant Biol*, 2006, 48(12): 1439-1449.
- [24] Ma R F, Liu Q Z, Xiao Y, *et al.* The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Isatis indigotica* Fort.: Molecular cloning, characterization, and expression analysis [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(11): 801-812.
- [25] Joshi C P, Chiang V L. Conserved sequence motifs in plant *S*-adenosyl-*L*-methionine-dependent methyltransferases [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 37(4): 663-674.
- [26] Selman-Housein G, López M A, Hernández D, *et al.* Molecular cloning of cDNAs coding for three sugarcane enzymes involved in lignification [J]. *Plant Sci*, 1999, 143(2): 163-171.
- [27] 杨彩霞, 王引权, 雒军, 等. 当归咖啡酸-*O*-甲基转移酶在大肠杆菌中的表达及组织表达分析 [J]. 甘肃中医药大学学报, 2019, 36(6): 1-6.
- [28] 孙莎莎, 韩亚萍, 闫燕燕, 等. 过表达咖啡酸-*O*-甲基转移酶基因 (COMT1) 调控番茄幼苗对干旱胁迫生理响应 [J]. 植物生理学报, 2019, 55(8): 1109-1122.
- [29] 戚继艳, 方永军, 龙翔宇, 等. 一个橡胶树咖啡酸甲基转移酶基因 (COMT) 的克隆和表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(7): 838-846.
- [30] Zhang K, Cui H, Cao S, *et al.* Overexpression of CrCOMT from *Carex rigescens* increases salt stress and modulates melatonin synthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Rep*, 2019, 38(12): 1501-1514.
- [31] Liu L, Sun C B, Liu C, *et al.* Overexpression of the melatonin synthesis-related gene SICOMT1 improves the resistance of tomato to salt stress [J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1514.

[责任编辑 时圣明]