

巴西橡胶树查尔酮异构酶 HbCHI 基因家族的鉴定和基因功能初步验证

吴倩倩^{1,2}, 夏玲¹, 于飞³, 梁晓宇^{1,2}, 王萌^{1,2}, 张宇^{1,2*}

1. 海南大学三亚南繁研究院, 海南三亚 572024; 2. 海南大学热带农林学院, 海南儋州 571737; 3. 惠州海关, 广东惠州 516006

摘要: 为了研究查尔酮异构酶 (CHI) 对橡胶树叶片发育过程中黄酮类化合物合成的影响, 本研究利用 CHI 的功能域 Chalcone (PF02431) 鉴定橡胶树查尔酮异构酶 HbCHI 基因家族成员, 分析其蛋白序列理化性质、保守结构域、保守基序和系统进化树分析; 利用 qRT-PCR 分析 *HbCHI* 在橡胶树叶片发育过程中的表达模式; 利用农杆菌介导的烟草瞬时表达技术分析 *HbCHI2* 影响植物黄酮合成的功能。结果表明: 从橡胶树基因组数据库中鉴定获得 9 个 HbCHI 基因家族成员 (*HbCHI1*~*HbCHI9*), 其编码的蛋白质包含 177~474 个氨基酸, 等电点为 5.1~9.52, 主要为亲水蛋白; 大部分 *HbCHI* 含有 1~3 个数量不等的基序, 只有 *HbCHI1* 含有 6 个保守基序 (motif1~motif6); 系统进化分析显示, *HbCHI1*~*HbCHI4* 是 I 型 CHI, *HbCHI6*~*HbCHI9* 表现出脂肪酸结合位点, 是 III 型 CHI, *HbCHI5* 是 IV 型 CHI; 橡胶树 HbCHI 基因家族的相对表达量检测结果均表现出从小古铜期到成熟期先下降后上升的趋势, 其中在淡绿期时的相对表达量最低, 且总黄酮含量与 CHI 基因相对表达量变化趋势一致; 相关性分析表明 *HbCHI2* 表达量与黄酮含量相关性最高, 皮尔逊系数为 0.97; 在烟草中过表达 *HbCHI2* 促进了本氏烟草中类黄酮的生物合成, 增加了叶片的总黄酮含量, 是对照的 2.13 倍。本研究结果表明 *HbCHI2* 基因正调控橡胶树叶片中类黄酮生物合成。

关键词: 巴西橡胶树; 查尔酮异构酶; 基因表达; 类黄酮; 基因功能

中图分类号: S794.1

文献标志码: A

Identification and Preliminary Verification of Gene Function of Chalcone Isomerase HbCHI Gene Family in *Hevea brasiliensis*

WU Qianqian^{1,2}, XIA Ling¹, YU Fei³, LIANG Xiaoyu^{1,2}, WANG Meng^{1,2}, ZHANG Yu^{1,2*}

1. Sanya Institute of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya, Hainan 572024, China; 2. College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; 3. Huizhou Customs, Huizhou, Guangdong 516006, China

Abstract: In order to study the effect of chalcone isomerase on the synthesis of flavonoids during the development of rubber leaves, this study used the CHI functional domain chalcone (PF02431) to identify the HbCHI gene family members of the Ccalcone isomerase, and to analyze the physicochemical properties, conserved domain, conserved motif and phylogenetic tree of the protein sequences. qRT-PCR was used to analyze the expression pattern of *HbCHI* during the development of rubber leaves. The effect of *HbCHI2* on plant flavonoid synthesis was analyzed using Agrobacterium-mediated transient expression technique in *Nicotiana benjamina*. Nine HbCHI gene family members (*HbCHI1*~*HbCHI9*) were identified from the genomic database of *H. brasiliensis*. The proteins encoded by *HbCHI1*~*HbCHI9* contained 177~474 amino acids with isoelectric points ranging from 5.1 to 9.52. The proteins were mainly hydrophilic proteins. Only *HbCHI1* contained 6 conserved motif1~motif6 motifs, and phylogenetic analysis showed that HbCHI1~

收稿日期 2024-10-10; 修回日期 2024-10-14

基金项目 “崖州湾” 菁英人才科技专项 (No. SCKJ-JYRC-2023-22); 海南省“南海新星” 科技创新人才平台项目 (No. NHXXR-CXM202310)。

作者简介 吴倩倩 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 橡胶树病害综合防控。*通信作者 (Corresponding author): 张宇 (ZHANG Yu), E-mail: yuzhang_rain@163.com。

HBCHI4 was type I CHI. *HbCHI6–HbCHI9* showed fatty acid binding sites, which were type III CHI. *HbCHI5* was type IV CHI. The relative expression level of HbCHI gene family in rubber trees showed a trend of first decreasing and then increasing from small bronzer to mature stage. The relative expression level was the lowest in light green stage, and the change trend of total flavonoids content was consistent with the relative expression level of CHI gene. Correlation analysis showed that *HbCHI2* had the highest significant correlation with flavonoids content. The Pearson coefficient was 0.97. Overexpression of *HbCHI2* in *N. benjamina* promoted the biosynthesis of flavonoids and increased the total flavonoids content in leaves, which was 2.13 times that of control. These results indicate that *HbCHI2* gene regulates flavonoid biosynthesis in rubber leaves.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; chalcone isomerase; gene expression; flavonoids; gene function

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.02.001

黄酮类化合物在植物对生物和非生物胁迫的防御过程中起到了重要作用,已有多项研究报道了它们在真菌、细菌和病毒防御中的关键性作用^[1-2]。通过作用于生长素外运载体 PIN-FORM (PIN),调节极性生长素运输 (PAT),从而帮助植物更有效地应对胁迫^[3]。黄酮类化合物中羟基的数量和位置决定了它们的自由基清除能力,并通过自由基清除机制在细胞中发挥作用^[4-6]。此外,黄酮还作为信号分子,促进根瘤菌和丛枝菌根真菌的定植,从而增强植物—微生物共生以抵抗胁迫^[7]。通过代谢积累黄酮,植物可以激活包括苯丙烷生物合成在内的抗真菌防御反应^[8]。已有研究表明,黄酮类化合物的抑菌试验显示其提取物对黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、厚垣镰孢霉 H ML278 (*Fusarium chlamydosporum* H ML278) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 具有较强的抑制作用^[9]。

黄酮类化合物的生物合成起始于苯丙氨酸,经由苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、反式肉桂酸 4-单加氧酶 (C4H) 和 4-香豆酸酯-CoA 连接酶 (4CL) 等限速酶的作用,生成对香豆酰基辅酶 A (p-coumaroyl-CoA)。随后,通过查尔酮合酶 (CHS) 催化生成柚皮素查尔酮 (naringenin chalcone),再经查尔酮异构酶 (CHI) 催化转化为柚皮素 (naringenin)。柚皮素在黄酮醇合酶 (FLS)、类黄酮 3'-羟化酶 (F3'H) 及类黄酮 3',5'-羟化酶 (F3'5'H) 作用下,最终转化为山奈酚 (kaempferol),并通过类黄酮糖基转移酶 (UGT) 进一步合成为黄酮类化合物^[10]。如在鞘芥麦的研究中发现,过表达 *CHI* 可以显著提高下游 *F3H*、*F3'H* 和 *FLS* 相关基因的表达水平,进而增加黄酮类化合物的生物合成^[11]。

查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 是黄酮类化合物合成途径的关键限速酶,决定植物

细胞内黄酮类化合物的产生^[12]。CHI 分为 4 种类型: I 型和 II 型 CHI 是真正具有 CHI 酶活性,主要参与类黄酮合成和花色苷积累, I 型 CHI 对柚皮素查尔酮表现出底物特异性,存在于地钱、苔藓、蕨类植物和大多数维管植物中^[13], II 型 CHI 则是豆科植物特有的^[14]; III 型和 IV 型 CHI 无查尔酮环化活性,具有脂肪酸结合特性,在拟南芥的脂肪酸的合成和储存中起作用^[15]; IV 型 CHI 蛋白则完全失去了 CHI 的催化活性,但可作为类黄酮生成和花色苷沉着的增强剂^[16-17]。目前,已从山茶花^[18]、棉花^[19]、烟草^[20]、桑树^[21]、银杏^[22]、马缨杜鹃^[23]等多种植物中克隆并验证了 CHI 与黄酮合成的相关性。

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 是一种落叶多年生热带树种,主要生产天然橡胶和橡胶木^[24]。在我国橡胶树的种植过程中,面临多种病虫害的威胁,其中橡胶树炭疽病和白粉病是危害最普遍且严重的 2 种叶部病害^[25]。尽管黄酮类化合物在多种植物中具有明确的作用^[1-2]。但关于巴西橡胶树黄酮代谢调控的具体机制,特别是查尔酮异构酶 (CHI) 基因在黄酮调控中的作用,目前仍不清晰。因此,探究 CHI 的功能对阐释橡胶树黄酮合成的分子机制具有重大意义。本研究通过对橡胶树查尔酮异构酶基因的生物信息学分析,以及在烟草中的瞬时表达,验证其在黄酮合成中的调节功能,为进一步研究 *HbCHI2* 在巴西橡胶树中的功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试材料为橡胶树品种热研 73397 芽接苗,由中国热带农业科学院橡胶研究所种苗基地提供;本氏烟草由本实验室提供,在温度为 25 ℃、湿度 60% 的条件下培养,其光暗时

间设定为 10 : 14。

1.1.2 菌株及载体 大肠杆菌 DH5 α 感受态以及农杆菌 GV3101 感受态均购自上海吐露港生物技术有限公司; pBin 载体由本实验室提供。

1.1.3 主要试剂 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒和质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, qPCR Mix 和高保真酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit T2001 (ZYMO RESEARCH)、卡那霉素和利福平购自索莱宝生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 从 Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 数据库下载 CHI 的隐马尔科夫模型 Chalcone (PF02431) 作为种子序列, 借助 hmmer 3.0 软件于橡胶树基因组数据中开展筛选, 获取 HbCHI 基因家族成员信息。把筛选所得的橡胶树 HbCHI 基因家族成员蛋白名称经由 NCBI 进行比对, 得到橡胶树 HbCHI 基因 ID。运用 TBtools 软件对其蛋白理化性质进行分析, 通过 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>) 在线软件分析橡胶树 HbCHI 基因家族的保守基序, 利用 NCBI 中的 BatchCD Search 工具分析 HbCHI 基因家族的保守结构域, 并通过 TBtools 中的 Visualize Gene Structure 功能生成可视化图形。利用 Mega 软件通过邻接法 (Neighbor-Joining) 构建橡胶树与茶树、陆地棉和拟南芥 CHI 的系统发育树。

1.2.2 HbCHI 基因家族成员在橡胶树不同发育期的表达特性分析 采集橡胶树热研 73397 的不同时期 (小古铜期、大古铜期、淡绿期和成熟期) 叶片, 利用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 使用 ToloScript All-in-one RT EasyMix for qPCR 试剂盒反转录获得 cDNA。以橡胶树 *HbActin* 作为内参基因, 使用 NCBI Primer Blast 设计基因特异性引物 (表 1) 进行实时荧光定量分析, 检测橡胶树 *HbCHIs* 的相对表达量。每个样本进行 3 次重复, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算表达量。

1.2.3 橡胶树叶片不同发育期总黄酮含量测定 采集橡胶树不同发育时期 (小古铜期 S₁、大古铜期 S₂、淡绿期 S₃、成熟期 S₄) 叶片, 将叶片 80 °C 烘干 24 h 后研磨, 再过 80 目筛得到烘干样品。称取 100 mg 样品置于 10 mL 具塞玻璃管中, 加入 4 mL 80% 甲醇, 使用超声波提取法提取 2 h,

随后 5000 r/min 离心 10 min, 上清液为黄酮提取液, 重复提取 1 次, 最后加入 80% 甲醇定容至 10 mL, 待测。吸取 200 μ L 提取液于 2 mL 离心管中, 加入 1 mL ddH₂O 和 60 μ L 5% NaNO₂ 反应 6 min, 加入 120 μ L 10% AlCl₃ 反应 5 min, 最后加入 400 μ L 1 mol/L NaOH 完成反应。使用芦丁标准品制作芦丁标准曲线: 先称取 10 mg 芦丁标准品加入 80% 甲醇定容至 50 mL, 得到 0.2 mg/mL 的标准溶液, 稀释为 0、0.008、0.016、0.032、0.048、0.064、0.080 mg/mL 浓度, 制作标准曲线。在 420 nm 波长下测定吸光度, 将吸光度带入芦丁标准曲线计算总黄酮含量。每个样本进行 3 次重复。

1.2.4 目的基因克隆及载体构建 使用带酶切位点的引物扩增插入片段, 酶切载体 (过表达载体为 pBin, 酶切位点为 *Bam*H I) 后, 利用同源重组酶连接载体和插入片段, 产物转入 DH5 α 感受态细胞。一端使用载体引物, 另一端使用插入片段引物对产物进行阳性鉴定, 测序确认插入片段序列完全正确后, 则成功构建重组载体。

1.2.5 农杆菌介导的烟草瞬时表达 将 pBin 空载 (CK) 以及重组质粒借助冻融法转入农杆菌 GV3101 内, 运用基因特异性引物对阳性农杆菌转化子进行检测。选取阳性转化子置于含有 50 μ g/mL 卡那霉素和 20 μ g/mL 利福平的 LB 培养液中, 在 28 °C 的温度条件下, 以 220 r/min 的转速培养 2 d。从培养体系中取出 5 mL 菌液放入 50 mL 的离心管内, 通过 5000 r/min 的转速离心 5 min, 收集菌体, 再使用侵染液对菌体进行 3 次洗涤, 最后重新悬浮菌体。使用分光光度计调节 OD₆₀₀ 至 0.5, 将其置于昏暗条件下 2 h。选取 5 周龄的本氏烟草, 使用注射器将分别携带 pBin 空载以及含有 *HbCHI2* 基因的农杆菌悬浮液, 逐一注入到本氏烟草叶片主叶脉的两侧。收集 2、4、6 dpi 叶片, 进行 qRT-PCR 分析。采集 6 dpi 叶片提取叶片总黄酮, 检测其含量。每个样本进行 3 次生物学重复。

2 结果与分析

2.1 HbCHI 基因家族鉴定

从橡胶树基因组数据库中鉴定获得 9 个 HbCHI 基因家族成员 (HbCHI1~HbCHI9), *HbCHI* 基因编码的蛋白质包含 177~474 个氨基酸; HbCHI1、HbCHI2、HbCHI5 和 HbCHI9 为稳定蛋

表 1 本试验所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
NbActin-F	GAGCGGGAATTTGTTAGGGATG	qp-HbCHI1-F	AACGTGATGATTCCCGCCAG
NbActin-R	AGCGGAATCTCTCAGACCAAT	qp-HbCHI1-R	AGTACCGGCACTGCTTCATC
NbANR-F	GCAGAGCAAATGTATCGTCCAG	qp-HbCHI2-F	TTGTGGGGCATTGCAACAGT
NbANR-R	GGGCATGCAGATGTTATCAGGT	qp-HbCHI2-R	AGCTGCACCCCATATTGAGAT
NbANS-F	AGCAGATCAGGAACCTAGCAAC	qp-HbCHI3-F	GTGGTTATGGTGGATGAAGTCC
NbANS-R	CAGTATGAGCTTCGACACCAAG	qp-HbCHI3-R	TGCCCCACAATTTTCAGGGTC
NbCHS-F	CCAATGACACCCACTTGGATAG	qp-HbCHI4-F	TGCTCCTCCTCTTCCCCAAA
NbCHS-R	CAGAGACAAGCTGGAACAAAAGG	qp-HbCHI4-R	GGGCTTCATCCACCATAACCA
NbDFR-F	GGCAACACCTATGGATTTTCGAG	qp-HbCHI5-F	TGGGATACCATCTGGTGTGG
NbDFR-R	TCGAGAGTTCCAGCAGATGAAG	qp-HbCHI5-R	GCTTCAGAGTTGTTGCCAGC
NbF3'5'H-F	CTCGAACGAACCATGTGAAGTG	qp-HbCHI6-F	ATCCCCGTGTCAGAGCAAAC
NbF3'5'H-R	TCCCACTCAAGAACCTTTTCAGG	qp-HbCHI6-R	AACCGTTACCACGCAGTCAT
NbF3'H-F	CGTCCTCAAGCACAGTAGAATG	qp-HbCHI7-F	AAGGGGATCTCATGGGAGGT
NbF3'H-R	CTAGGTCAGATTCCATCACGAG	qp-HbCHI7-R	AAGCACTTCGAACAGAGCGA
NbF3H-F	AGGTGGCTTCATTGTCTCTAGC	qp-HbCHI8-F	GGCTGTTCAGGCCTCTCATT
NbF3H-R	TCACAGCTATCCATCCTTCTGG	qp-HbCHI8-R	GCTATCCAGCTGAGGTGTCC
NbFLS-F	TCACTTGGGCTTGGGTTAGAAG	qp-HbCHI9-F	TTTCCAACCAACACAACCGC
NbFLS-R	ATGTCTGTATGGGCCACAACCTC	qp-HbCHI9-R	AGCCTTCCCTGCATTCTCAC
NbLAR-F	ATGAAGTGGACAGGTCAGATCC	qp-HbActin-F	GATGTGGATATCAGGAAGGA
NbLAR-R	AATGGTCAAGAGGAGGAGGAAG	qp-HbActin-R	CATACTGCTTGGAGCAAGA
NbUFGT-F	GGACTGCTGGTTCTGGTTCTTT	HbCHI2-pBin-F	acgggtgcttagagcgggatccATGGGTTCTGAAGTTGTTATGGTG
NbUFGT-R	GCTACAACCTTCTGGTGGCATGT	HbCHI2-pBin-R	gactctagatcaggtggatccTTTAGACAAATGGGCAGAAAGGT

注：小写字母代表线性化载体重叠序列。
Note: The lowercase letters represent an overlapping sequence of linearized vector.

白, HbCHI3、HbCHI4 和 HbCHI6-HbCHI8 为不稳定蛋白; 理论等电点为 5.10~9.52; HbCHI 蛋白除 HbCHI1 和 HbCHI5 外均为亲水蛋白 (表 2)。HbCHI1 含有 6 个保守基序 (motif1~motif6), 其他 HbCHI 含有 1~3 个数量不等的基序 (图 1A)。不同 HbCHI 蛋白含有不同类型的查尔酮超家族结

构域 (chalcone_3 superfamily、PLN02804、PLN02311、PLN03175 和 PLN03174) (图 1B)。

2.2 HbCHI 基因家族进化分析

选取了茶树、陆地棉与拟南芥的 CHI 蛋白构建系统进化树 (图 2), 结果表明, 这些 CHI 分成 3 组, HbCHI6~HbCHI9 与茶树 CsCHI7 和 CsCHI8、

表 2 HbCHI 蛋白理化性质分析
Tab. 2 Physicochemical property analysis of HbCHI proteins

蛋白名称 Protein name	氨基酸数量 Number of amino acid	分子质量 Molecular weight/Da	理论等电点 pI	不稳定系数 Instability index	脂溶指数 Aliphatic index	亲水性平均值 Grand average of hydropathicity
HbCHI1	448	48 483.89	5.57	37.43	96.25	0.083
HbCHI2	209	23 360.66	5.13	36.70	94.64	-0.174
HbCHI3	209	23 452.76	5.30	44.16	95.55	-0.206
HbCHI4	177	20 188.06	5.10	44.85	94.69	-0.299
HbCHI5	277	29 989.17	7.74	35.99	89.82	0.078
HbCHI6	434	48 026.06	8.57	45.60	83.55	-0.116
HbCHI7	290	32 051.83	9.52	49.82	88.07	-0.234
HbCHI8	474	52 889.09	9.27	40.67	83.50	-0.132
HbCHI9	271	29 753.49	5.61	35.26	85.20	-0.375

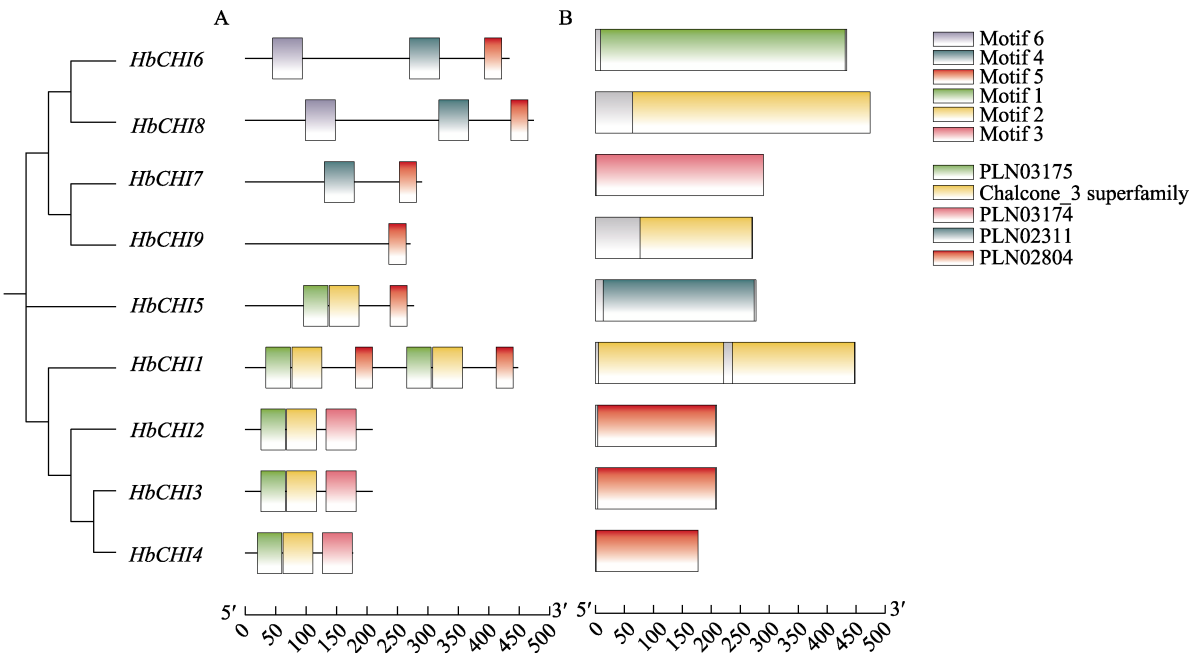


图 1 *HbCHI* 基因的保守基序 (A) 与保守结构域 (B) 分析

Fig. 1 Conserved motif (A) and gene structure (B) analysis of rubber tree *HbCHI* genes

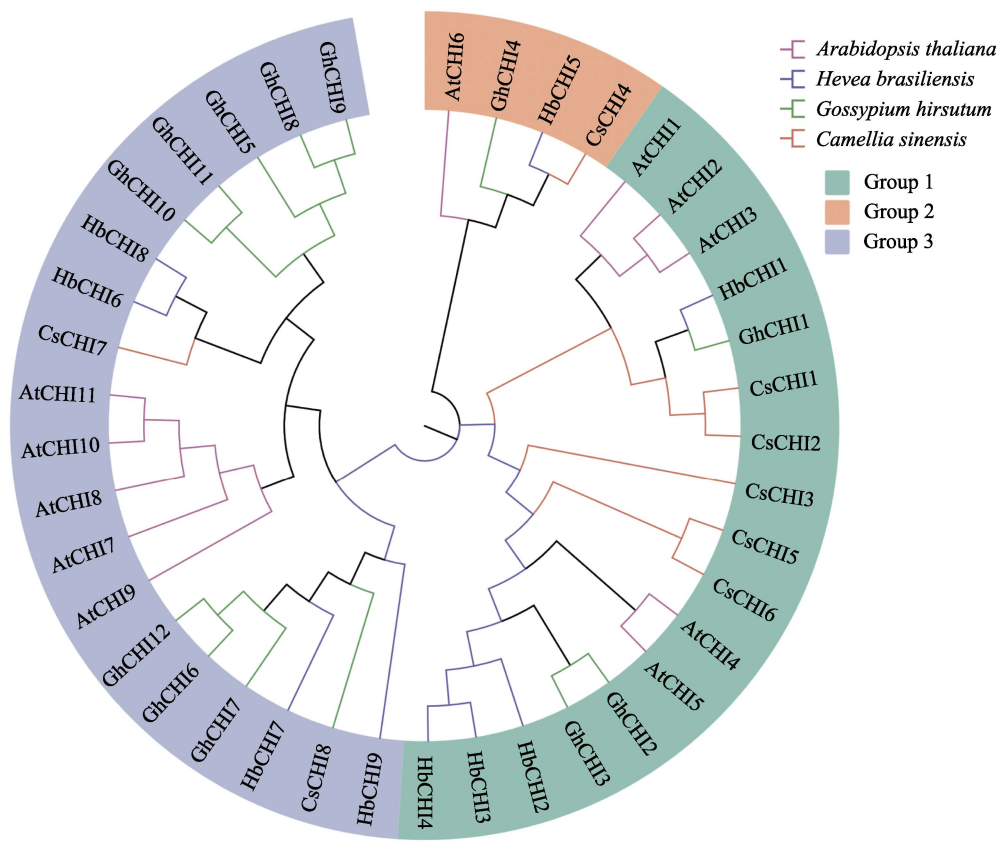


图 2 橡胶树与茶树、陆地棉、拟南芥 CHI 基因家族蛋白的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of CHI gene family proteins members of *Hevea brasiliensis*, *Camellia sinensis*, *Gossypium hirsutum* and *Arabidopsis thaliana*

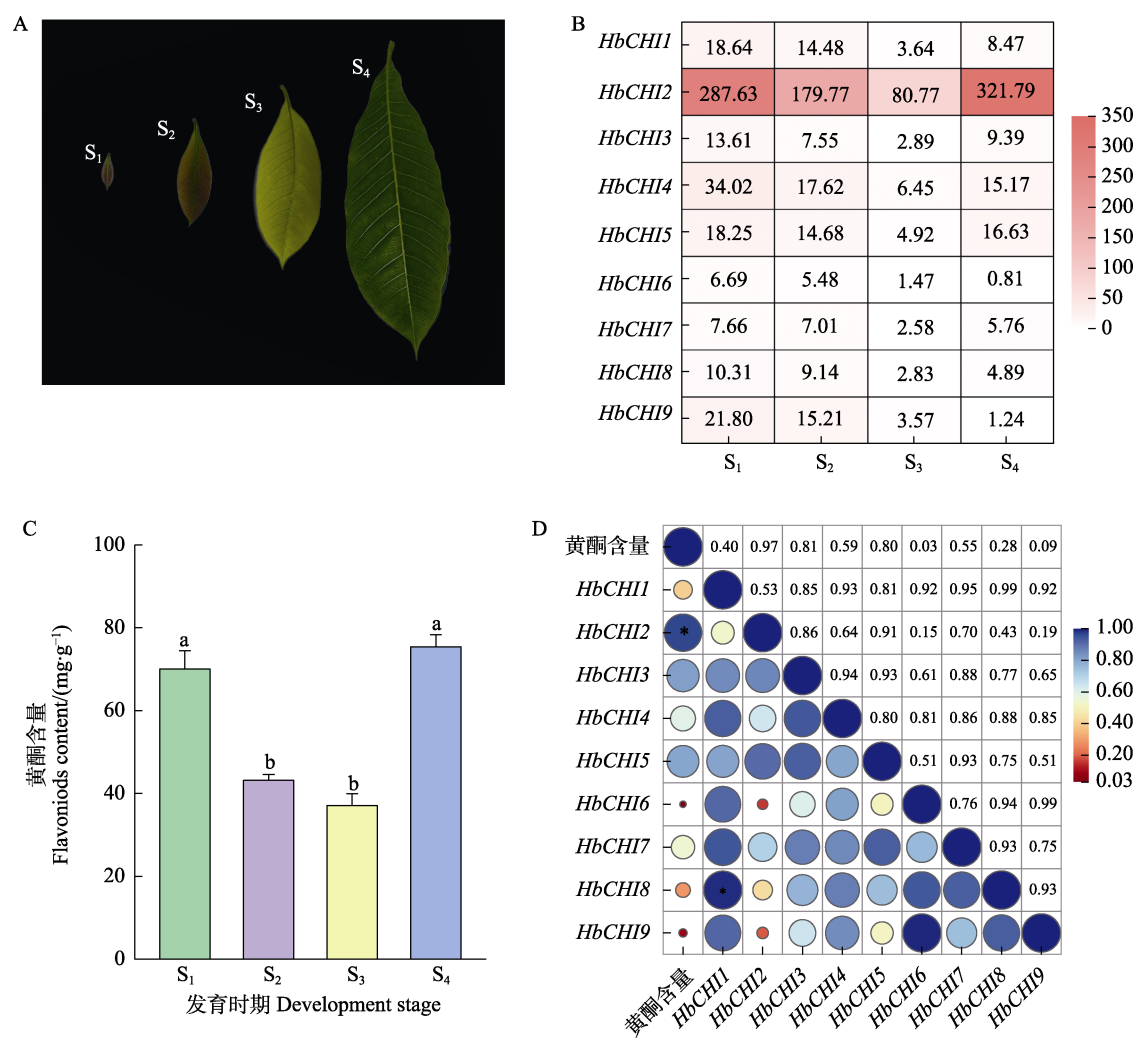
陆地棉 GhCHI5~GhCHI12、拟南芥的 AtCHI8~AtCHI11 属同一分支；HbCHI5 与 CsCHI4、GhCHI4、AtCHI6 属同一分支；HbCHI1~HbCHI4 与 GhCHI1~GhCHI3、AtCHI1~AtCHI5、CsCHI1~

CsCHI3、CsCHI5、CsCHI6 属同一分支。其中 HbCHI1~HbCHI4 是 I 型 CHI,而 HbCHI6~HbCHI9 是III型 CHI, HbCHI5 是IV型 CHI。

2.3 *HbCHI* 的表达特性分析和叶片黄酮含量分析

为了研究橡胶树叶片不同生长时期（图 3A）的 *HbCHI* 表达模式和总黄酮之间的关系，本研究检测了橡胶树叶片不同发育时期的相对表达量与黄酮含量。结果表明，在不同发育时期的橡胶叶片中，*HbCHI* 基因的相对表达量均表现出从小古铜期到成熟期先下降后上升的趋势，其中在淡绿期的相对表达量最低，且 9 个 *HbCHI* 基因相对表

达量差异较大，*HbCHI2* 表达量最高，在成熟期表达量高达 321.79，而该时期表达量最低的基因（*HbCHI6*）只有 0.81（图 3B）；总黄酮含量在橡胶树不同叶片发育期差异较大，成熟期叶片含量最大，为 75.44 mg/g，其次是小古铜期（70.03 mg/g），淡绿期最低，仅为 37.09 mg/g（图 3C）。总黄酮含量与 *HbCHI* 基因的相对表达量变化趋势均表现为先降后升。通过对总黄酮含量与 *HbCHI* 相对表达量的相关性热图分析发现，橡胶树 *HbCHI* 的相对表达量与总黄酮含量呈正相关关系，其中 *HbCHI2* 与总黄酮含量显著相关，皮尔逊相关系数为 0.97（图 3D）。



A: 橡胶树不同发育时期叶片; B: *HbCHI* 的表达模式; C: 总黄酮含量, 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$); D: 总黄酮含量与 *HbCHI* 相对表达量的相关性分析, *表示显著相关 ($P<0.05$).

A: Rubber tree leaves at different development stage; B: Expression patterns of *HbCHI*; C: Flavonoids content, different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$); D: Correlation thermogram between flavonoids content and relative expression of *HbCHI*, * indicates significant correlation ($P<0.05$).

图 3 *HbCHI* 在叶片不同发育时期的表达分析和黄酮含量分析

Fig. 3 Expression analysis of *HbCHI* and analysis of flavonoid content in leaves at different development stage

2.4 HbCHI2 的烟草瞬时表达功能验证

将过表达载体（OE-*HbCHI2*）利用农杆菌 GV3101 侵染本氏烟草，对不同时间瞬时过表达的叶片进行 qRT-PCR 分析。结果表明，*HbCHI2* 侵染后的烟草叶片在 2、4、6 dpi 时显著过表达（图 4A），与对照组相比，*HbCHI2* 侵染后的烟草叶片类黄酮合成途径的下游相关基因 *NbANS*、*NbF3'H*、*NbLAR* 均呈现显著上调表达（图 4B）。在过表达的 6 dpi 时，本氏烟草叶片总黄酮含量相对于空载显著提高，是空载的 2.13 倍（图 4C）。以上结果表明过表达 *HbCHI2* 促进了本氏烟草中类黄酮的生物合成。

3 讨论

查尔酮异构酶是黄酮合成途径的关键酶，控制植物生成黄酮类化合物的速率及产量。前人已经在棉花^[19]和桑树^[21]等物种中鉴定出 CHI 基因

家族，并针对其在花色改良、系统发育及胁迫应答中的重要作用进行研究。本研究鉴定得到 9 个橡胶树 *HbCHI* 基因，在调控黄酮类化合物的生物合成中具有重要功能。CHAO 等^[21]对 2 种桑树 I 型 CHI 的分析揭示了其在花青素积累中的作用；XU 等^[26]对葱 IV 型 CHI 的研究表明，*AfCHIL* 可以有效提高 *AfCHS* 在柚皮苷合成中的效率。本研究对橡胶树 *HbCHI* 基因进行了系统进化分析，结果显示：*HbCHI1*~*HbCHI4* 为 I 型 CHI，是真正发挥黄酮类化合物合成功能的 CHI；没有豆科植物专属的 II 型 CHI，与橡胶树作为维管植物的属性相符；*HbCHI6*~*HbCHI9* 为 III 型 CHI，表现出脂肪酸结合特性；*HbCHI5* 为 IV 型 CHI，充当类黄酮生成和花色素沉着的增强剂^[16-17]。

本研究分析了橡胶树叶片在不同时期的表达模式及黄酮含量，结果显示橡胶树 CHI 基因家族的相对表达量从小古铜期到成熟期呈现先降后升

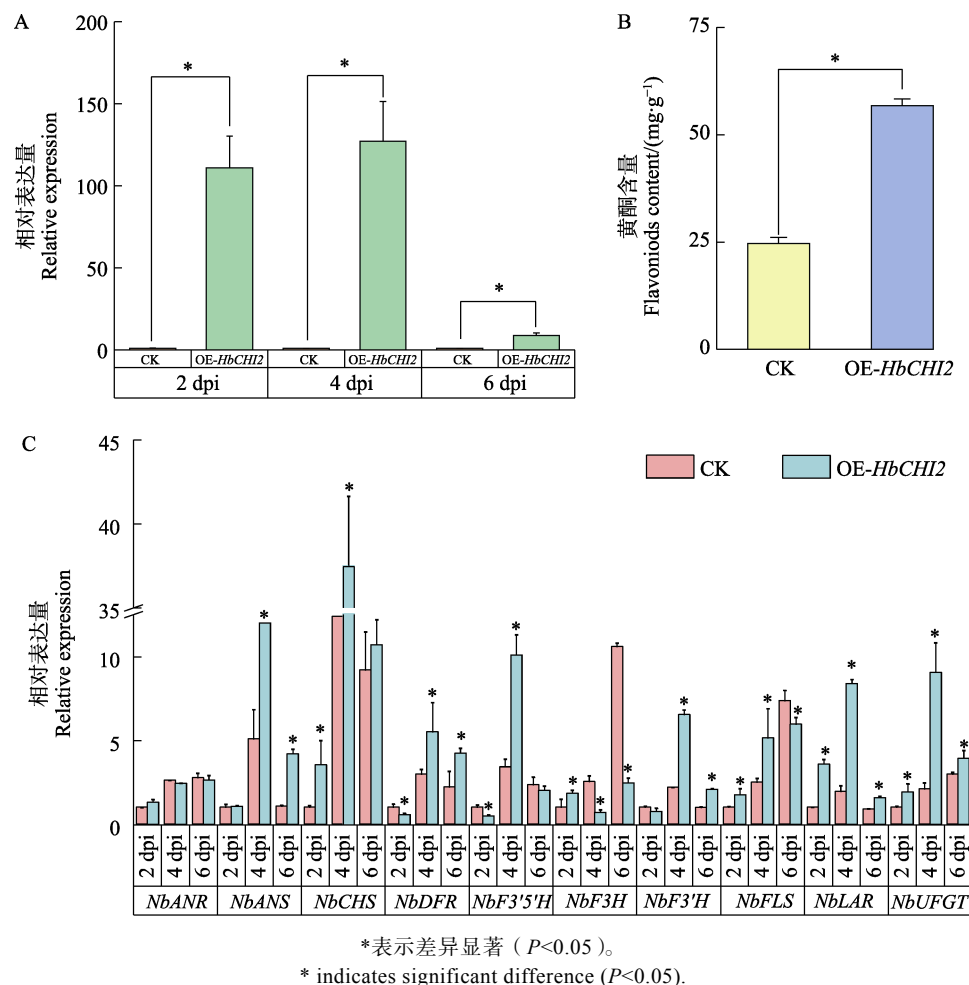


图 4 烟草瞬时表达后的 *HbCHI2* 和下游相关基因的表达水平和黄酮含量
Fig. 4 Expression level of *HbCHI2* and downstream genes and flavonoids content after instantaneous overexpression in *N. benjamina*

的趋势,在淡绿期时达到最低点。总黄酮含量的变化趋势与 *HbCHI* 基因的表达量一致,相关性分析表明, *HbCHI2* 与黄酮含量的相关性最高,皮尔逊系数为 0.97。为验证橡胶树 *HbCHI2* 基因的功能,本研究进行了烟草瞬时表达实验,结果显示,烟草中过表达 *HbCHI2* 促进了 *NbANS*、*NbF3'H*、*NbLAR* 等下游相关基因的相对表达量,进而促进了类黄酮的生物合成,总黄酮含量因此增加了 2.13 倍,表明 *HbCHI2* 基因调控了橡胶树叶片中类黄酮的生物合成,证实了其作为 I 型 CHI 的功能。已有许多研究也支持这一结论,例如,山茶花 I 型 CHI *CnCHI4* 的过表达可以显著增加烟草和山茶花的类黄酮生物合成^[18];马缨杜鹃 I 型 CHI *RdCHI1* 可以将底物柚皮素查尔酮转化为原花青素、花色苷和黄酮醇等黄酮类化合物^[23];君子兰 I 型 CHI *CmCHI1* 和 *CmCHI2* 可以将底物柚皮素查尔酮完全转化为产物柚皮素^[27]。

HbCHI2 基因在黄酮生物合成中发挥了重要作用,为进一步探究橡胶树黄酮生物合成的分子机制提供数据支持。然而,关于 *HbCHI2* 基因对橡胶树抗性的影响及其在生物胁迫和非生物胁迫影响下的分子机制仍不明确。因此,进一步对 *HbCHI* 的遗传功能及其调控机制展开研究将会是未来的关键方向,这对于选育抗炭疽病和白粉病的橡胶树品种具有重要的研究价值。

参考文献

- [1] RAMAROSON M L, KOUTOUAN C, HELESBEUX J J, LE CLERC V, HAMAMA L, GEOFFRIAU E, BRIARD M J M. Role of phenylpropanoids and flavonoids in plant resistance to pests and diseases[J]. *Molecules*, 2022, 27(23): 8371.
- [2] 靳长迎, 谢巧玲, 彭飞, 王秀平, 杨越冬. 板栗花抑制植物病原真菌成分提取及活性研究[J]. *核农学报*, 2024, 38(5): 889-898.
JIN C Y, XIE Q L, PENG F, WANG X P, YANG Y D. Extraction and activity evaluation of the plant pathogenic fungi inhibition compounds from chestnut flower[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2024, 38(5): 889-898. (in Chinese)
- [3] ABAS L, KOLB M, STADLMANN J, JANACEK D P, LUKIC K, SCHWECHHEIMER C, SAZANOV L A, MACH L, FRIML J, HAMMES U Z. Naphthylphthalamic acid associates with and inhibits PIN auxin transporters[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2021, 118(1): e2020857118.
- [4] WU J, LV S, ZHAO L, GAO T, YU C, HU J, MA F. Advances in the study of the function and mechanism of the action of flavonoids in plants under environmental stresses[J]. *Planta*, 2023, 257(6): 108.
- [5] AGATI G, AZZARELLO E, POLLASTRI S, TATTINI M J P S. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance[J]. *Plant Science*, 2012, 196: 67-76.
- [6] AGATI G, BRUNETTI C, DI FERDINANDO M, FERRINI F, POLLASTRI S, TATTINI M. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2013, 72: 35-45.
- [7] HOLMER R, RUTTEN L, KOHLEN W, VAN VELZEN R, GEURTS R. Commonalities in symbiotic plant-microbe signalling[J]. *Advances in Botanical Research*, 2017, 82: 187-221.
- [8] JIANG L, WU P, YANG L, LIU C, GUO P, WANG H, WANG S, XU F, ZHUANG Q, TONG X. Transcriptomics and metabolomics reveal the induction of flavonoid biosynthesis pathway in the interaction of *Stylosanthes-Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Genomics*, 2021, 113(4): 2702-2716.
- [9] 何海燕, 付跃, 李燕婷, 张健, 覃拥灵. 桑叶总黄酮提取工艺优化及抑菌效果研究[J]. *中国饲料*, (2024-08-02) [2024-09-25]. <https://doi.org/10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.202401-0005-07>.
HE H Y, FU Y, LI Y T, ZHANG J, QIN Y L. Optimization of extraction process and antibacterial effect of total flavonoids from mulberry leaves[J]. *China Feed*, (2024-08-02) [2024-09-25]. <https://doi.org/10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.2-024010005-07>. (in Chinese)
- [10] 尚军, 吴旺泽, 马永贵. 植物苯丙烷代谢途径[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2022, 38(11): 1467-1476.
SHANG J, WU W Z, MA Y G. Metabolic pathway of phenylpropane in plants[J]. *China Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2022, 38(11): 1467-1476. (in Chinese)
- [11] FRASER C M, CHAPPLE C. The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*[J]. *The Arabidopsis Book*, 2011, 9: e0152.
- [12] NAN G, WU H, WU Q, LIU L, LIAO Q, LI C, CHEN H, WU Q. Cloning, identification, and functional analysis of chalcone isomerase gene and its promoter from *Tartary buckwheat*[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2022, 44(8): 78.
- [13] NI R, ZHU T T, ZHANG X S, WANG P Y, SUN C J, QIAO Y N, LOU H X, CHENG A X. Identification and evolutionary analysis of chalcone isomerase-fold proteins in ferns[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(1): 290-304.
- [14] CHENG A X, ZHANG X, HAN X J, ZHANG Y Y, GAO S, LIU C J, LOU H X. Identification of chalcone isomerase in the basal land plants reveals an ancient evolution of enzy-

- matic cyclization activity for synthesis of flavonoid[J]. *New Phytologist*, 2018, 217(2): 909-924.
- [15] NGAKI M N, LOUIE G V, PHILIPPE R N, MANNING G, POJER F, BOWMAN M E, LI L, LARSEN E, WURTELE E S, NOEL J P. Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis[J]. *Nature*, 2012, 485(7399): 530-533.
- [16] ZHAO C, LIU X, GONG Q, CAO J, SHEN W, YIN X, GRIERSON D, ZHANG B, XU C, LI X. Three AP2/ERF family members modulate flavonoid synthesis by regulating type IV chalcone isomerase in citrus[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(4): 671-688.
- [17] JIANG W, YIN Q, WU R, ZHENG G, LIU J, DIXON R A, PANG Y. Role of a chalcone isomerase-like protein in flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(22): 7165-7179.
- [18] YU S, LI J, PENG T, NI S, FENG Y, WANG Q, WANG M, CHU X, FAN Z, LI X. Identification of chalcone isomerase family genes and roles of *CnCHI4* in flavonoid metabolism in *Camellia nitidissima*[J]. *Biomolecules*, 2022, 13(1): 41.
- [19] 杨丹, 鲍军秀, 陈沛, 王斐, 汤寿伍, 刘海峰, 李鸿彬. 棉花查尔酮异构酶基因家族的鉴定及表达分析[J]. *华中农业大学学报*, 2023, 42(5): 94-104.
- YANG D, BAO J X, CHEN P, WANG F, TANG S W, LIU H F, LI H B. Identification and expression analysis of chalcone isomerase gene family in cotton[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2023, 42(5): 94-104.
- [20] 翟妞, 郑庆霞, 刘萍萍, 徐国云, 张慧, 李晶, 陈千思, 武明珠, 周会娜. 烟草查尔酮异构酶基因 2(*NtCHI2*)功能分析[J]. *烟草科技*, 2020, 53(9): 1-5.
- ZHAI N, ZHENG Q X, LIU P P, XU G Y, ZHANG H, LI J, CHEN Q S, WU M Z, ZHOU H N. Functional analysis of chalcone isomerase gene 2 (*NtCHI2*) in tobacco[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2020, 53(9): 1-5. (in Chinese)
- [21] CHAO N, WANG R F, HOU C, YU T, MIAO K, CAO F Y, FANG R J, LIU L. Functional characterization of two chalcone isomerase (CHI) revealing their responsibility for anthocyanins accumulation in mulberry[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2021, 161: 65-73.
- [22] CHENG H, LI L, CHENG S, CAO F, WANG Y, YUAN H. Molecular cloning and function assay of a chalcone isomerase gene (*GbCHI*) from *Ginkgo biloba*[J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30: 49-62.
- [23] 孙威, 孙世宇, 陈一然, 王聿晗, 张艳, 鞠志刚, 乙引. 马缨杜鹃查尔酮异构酶基因 *RdCHI1* 的克隆与功能解析[J]. *园艺学报*, 2022, 49(11): 2407-2418.
- SUN W, SUN S Y, CHEN Y R, WANG Y H, ZHANG Y, JU Z G, YI Y. Cloning and functional analysis of chalcone isomerase gene *RdCHI1* from *Rhododendron Maying*[J]. *Acta Horticultural*, 2022, 49(11): 2407-2418. (in Chinese)
- [24] 曾霞, 郑服丛, 黄茂芳, 林位夫. 世界天然橡胶技术现状与展望[J]. *中国热带农业*, 2014(1): 31-36.
- ZENG X, ZHENG F C, HUANG M F, LIN W F. Present situation and prospect of natural rubber technology in the world[J]. *China Tropical Agriculture*, 2014(1): 31-36. (in Chinese)
- [25] 汪金蓉, 徐国宾, 刘梅芳, 陈奕鹏, 杨子林. “保叶清”烟雾剂防治橡胶树“两病”田间试验初报[J]. *南方农业*, 2015, 9(25): 5-7.
- WANG J R, XU G B, LIU M F, CHEN Y P, YANG Z L. Preliminary report on the field experiment of “Bao Qing Ye” aerosol to control “two diseases” of rubber trees[J]. *South China Agriculture*, 2015, 9(25): 5-7. (in Chinese)
- [26] XU H, LAN Y, XING J, LI Y, LIU L, WANG Y. *AfCHIL*, a type IV chalcone isomerase, enhances the biosynthesis of naringenin in metabolic engineering[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 891066.
- [27] LIU Y, XUE X, ZHAO C, ZHANG J, LIU M, LI X, LI Y, GAO X. Cloning and functional characterization of chalcone isomerase genes involved in anthocyanin biosynthesis in *Clivia miniata*[J]. *Ornamental Plant Research*, 2021, 1(1): 1-10.