

艾叶类黄酮 O-甲基转移酶基因家族的鉴定及表达分析

彭赛男, 李宇琨, 罗丹丹, 陈昌婕, 周佳, 李佳怡, 郑佳, 刘大会*, 苗玉焕*

(湖北中医药大学, 中药资源中心, 湖北 武汉 430065)

摘要: 艾 (*Artemisia argyi*) 以叶片入药, 为我国常用大宗中药材, 主要活性成分为挥发油、黄酮等化合物, 具有多种药理活性。目前鉴定到的艾叶黄酮类物质多为氧甲基化修饰, 而类黄酮 O-甲基转移酶 (flavonoid O-methyltransferase, FOMT) 是黄酮类化合物氧甲基化修饰的关键酶。为进一步了解 FOMT 蛋白功能及特性, 本研究对艾中 FOMT 基因家族进行了全基因组的挖掘和鉴定, 并进行系统发育、染色体定位、基因序列特征、亚细胞定位预测、蛋白结构、基因结构分析及表达模式的分析和验证。结果表明, 在艾的基因组中, 共鉴定得到 83 个 FOMT 基因, 系统发育树显示 FOMT 基因分为 CCoAOMT (caffeoyl CoA O-methyltransferase) 亚家族 (32 个基因) 和 COMT (caffeic acid O-methyltransferase) 亚家族 (51 个基因) 两个亚类。基因序列特征分析显示 FOMT 编码氨基酸的数目介于 70~734 aa, 分子质量为 25 296.55~34 241.3 Da, 等电点为 4.51~9.99, 与 32 个 CCoAOMT 亚家族成员相比, 51 个 COMT 亚家族成员中, 约 1/3 的 FOMT 蛋白为疏水性蛋白, 2/3 蛋白为亲水性蛋白。亚细胞定位预测结果显示超过 80% 的 CCoAOMT 亚家族成员定位于细胞质, 96% 的 COMT 亚家族成员定位于叶绿体。COMT 成员相对 CCoAOMT 成员 motif 数较多, 且位于 N 端的 motifs 变异相对较大, 位于 C 端的 motifs 相对保守; 表达模式分析显示 CCoAOMT 亚家族成员主要在根中表达, 而 COMT 成员主要在叶片中高量表达; 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 验证了部分 FOMT 在叶片中优势表达, 具有组织表达特异性。本研究对艾叶 FOMT 基因家族进行鉴定与分析, 为进一步深入研究 FOMT 功能和甲基化黄酮类化合物的生物合成提供理论依据。

关键词: 艾叶; 类黄酮; 类黄酮 O-甲基转移酶; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)04-1069-10

Identification and expression analysis of flavonoid O-methyltransferases gene family in *Artemisia argyi*

PENG Sai-nan, LI Yu-kun, LUO Dan-dan, CHEN Chang-jie, ZHOU Jia, LI Jia-yi,
ZHENG Jia, LIU Da-hui*, MIAO Yu-huan*

(Hubei University of Chinese Medicine, Resource Center for Chinese Materia Medica, Wuhan 430065, China)

Abstract: *Artemisia argyi* (*A. argyi*) is a Chinese herbal medicine in China. The main active components are volatile oils, flavonoids, and other compounds, which have various pharmacological activities. Methoxylated flavonoids are the main active ingredients in *A. argyi*. Flavonoid O-methyltransferase (FOMT) is a key enzyme in the O-methylation of flavonoids. In order to further understand the function and characteristics of FOMT proteins, this paper carried out the whole genome mining and identification of FOMT genes in *A. argyi* and performed phylogenetic, chromosomal localization, gene sequence characterization, subcellular localization prediction, protein structure, gene structure analysis, and expression pattern analysis. The results showed that a total of 83 FOMT genes were identified in the genome of *A. argyi*. The phylogenetic tree shows that FOMT genes are divided

收稿日期: 2022-08-22; 修回日期: 2022-10-11.

基金项目: 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设” (2060302).

*通讯作者 Tel: 86-27-68890106, E-mail: liudahui@hbtcm.edu.cn;

Tel: 13419560708, E-mail: 1365049791@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1004

into two subgroups, *CCoAOMT* (caffeoyl CoA *O*-methyltransferase) subfamily (32 genes) and *COMT* (caffeic acid *O*-methyltransferase) subfamily (51 genes). Gene sequence analysis showed that the number of amino acids encoded by FOMT was 70-734 aa, the molecular weight was 25 296.55-34 241.3 Da, and the isoelectric point was 4.51-9.99. Compared with 32 members of the *CCoAOMT* subfamily, nearly 1/3 of the 51 members of the *COMT* subfamily were hydrophobic proteins and 2/3 were hydrophilic proteins. Subcellular localization prediction showed that more than 80% of *CCoAOMT* subfamily members were located in the cytoplasm, and 96% of *COMT* subfamily members were located in the chloroplast. *COMT* subfamily members have more motifs than *CCoAOMT* subfamily members. The N-terminal motifs of *COMT* subfamily proteins are relatively variable, while the C-terminal motifs are relatively conserved. Expression pattern analysis showed that *CCoAOMT* subfamily members were mainly expressed in roots, while *COMT* members were mainly expressed in leaves. Some *FOMTs* showed the tissue expression specificity by real-time quantitative PCR analysis, especially in leaves. In this study, we identified and analyzed the *FOMT* gene family in *A. argyi*, and provided a theoretical basis for further research on the function of FOMTs and the biosynthesis of methylated flavonoids in *A. argyi*.

Key words: *Artemisia argyi*; flavonoid; flavonoid *O*-methyltransferase; bioinformatics; expression analysis

艾叶为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Lévl. et Vant. 的干燥叶, 具有温经止血、散寒止痛、祛湿止痒等功效^[1]。黄酮类化合物为其主要活性成分, 具有多种药理活性^[2]。据统计, 目前艾叶中已鉴定的类黄酮成分有约 2/3 属于 *O*-甲基化修饰的类黄酮, 如异泽兰黄素、棕矢车菊素、矢车菊黄素、紫花牡荆素、高车前素、鼠李素等。甲基化是类黄酮重要的修饰反应, 包括 *O*-甲基化和 *C*-甲基化两类, 其中 *O*-甲基化较为常见, *O*-甲基化的类黄酮在植物中广泛存在。研究表明^[3], *O*-甲基化修饰可提高类黄酮的结构稳定性、蛋白亲和力、转运力, 降低其水溶性, 并显著提高类黄酮的生物利用度, 这些性质的改变使得部分类黄酮的生理活性和药理活性显著提高。在生理活性方面, *O*-甲基化修饰的黄酮可提高植物对生物和非生物胁迫的抵抗力, 例如柑橘在感染黄龙病时其果实中多甲氧基黄酮的总量也显著提高^[4]; 在干旱和高山中生长的唇形科植物产生更多的 *O*-甲基化黄酮^[5]; 毛白桦叶片腺毛分泌的 5-羟基-4', 7-二甲氧基黄酮对秋蛾幼虫具有更强的毒性^[6]。以上结果表明, *O*-甲基化类黄酮可能是植物中重要的防御类化合物, 可显著提高植物对环境的适应性。在药理活性方面, *O*-甲基化的类黄酮因其更易靶向穿透癌细胞, 具有较好的抗癌活性。如黄芩中的汉黄芩素 (5,7-二羟基-8-甲氧基黄酮)、黄芩黄酮 I (5,2'-二羟基-7, 8-二甲氧基黄酮) 和韧黄芩素 I (5,2'-二羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮) 能诱导癌细胞的凋亡而对正常细胞没有影响^[7,8]。此外, *O*-甲基化的类黄酮还具有更强的抗炎、抗代谢紊乱、抗疟原虫等活性。如柑橘中的多氧甲基类黄酮是中国传统医药制剂“橘汁姜汤”的主要抗炎成分^[9]; 黑姜中的多氧甲基类黄酮 (5,7-二甲氧基黄酮、5,7,4'-三甲氧基黄酮和 3,5,7,3',4'-五甲氧基黄酮) 可减

轻昼夜节律紊乱并改善代谢综合征和肥胖症^[10]; 青蒿中的 *O*-甲基类黄酮能增强青蒿素的抗疟原虫和细胞毒性作用^[11]。

植物类黄酮的生物合成前体为苯丙氨酸^[12], 在苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、肉桂酸 4-羟化酶 (C4H) 和 4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4CL) 催化下生成香豆酰辅酶 A, 底物进一步在查尔酮合酶 (CHS) 的作用下形成查尔酮, 然后由查尔酮异构酶 (CHI) 异构化形成柚皮素等黄烷酮苷元; 柚皮素经黄烷酮 3-羟化酶 (F3H)、类黄酮 3'-羟化酶 (F3'H) 和黄酮合酶 (FNS I/FNS II) 等作用下分别生成黄酮醇和黄酮类化合物; 最后, 这些黄酮类化合物在羟化酶 (HO)、糖基转移酶 (GT)、酰基转移酶 (AT)、异戊二烯基转移酶 (PT)、*O*-甲基转移酶 (OMT) 等修饰下形成各种结构的类黄酮^[13]。在植物体内, 类黄酮 *O*-甲基化反应主要由类黄酮 *O*-甲基转移酶 (flavonoid *O*-methyltransferase, FOMT) 以 *S*-腺苷-*L*-蛋氨酸 (SAM) 为甲基供体将甲基转移到类黄酮-OH 上^[14]。FOMT 催化类黄酮合成 *O*-甲基化类黄酮, 是类黄酮代谢途径中的关键修饰酶^[3]。根据分子质量和是否依赖二价离子, 可将 OMT 分为咖啡酸氧甲基转移酶 (caffeic acid *O*-methyltransferase, COMT) 和咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶 (caffeoyl CoA *O*-methyltransferase, CCoAOMT)^[15]。COMT 亚家族成员蛋白分子质量一般在 38~43 kDa, 催化过程不需阳离子参与, 可利用基于组氨酸 (His) 催化的二元体来增强其酶活性^[16]。FOMT 大多属于此亚家族。CCoAOMT 亚家族成员数目相对较少, 蛋白分子质量较小 (26~30 kDa), 催化过程需二价阳离子参与。CCoAOMT 亚家族又被分为两个亚组, 其中一个亚组成员特异性催化咖啡酰辅酶 A, 是木质素合成关键酶, 为 true CCoAOMT; 另一亚组成员偏

好催化咖啡酸酯和类黄酮,被命名为CCoAOMT-like^[17]。

异泽兰黄素(5,7-二羟基-3',4',6-三甲氧基黄酮)是艾叶中重要活性成分之一^[2],是一种极具药用价值的多甲氧基黄酮类物质^[18],具有抗肿瘤^[19-21]、抗炎^[22]、抗氧化等作用^[23]。本团队前期已公布蕲艾高质量染色体级别基因组,为解析艾叶中药效成分黄酮类物质的生物合成路径奠定重要基础,对艾重要品质性状遗传改良具有重要意义^[24]。本研究利用生物信息学的方法,对艾FOMT基因家族进行了全基因组的挖掘和鉴定,并分析了其系统发育、染色体定位、基因序列特征、亚细胞定位、蛋白结构、基因结构等,利用荧光定量PCR技术,对部分艾叶FOMT基因在艾不同组织器官及不同叶片发育时期进行表达模式分析,以期深入解析艾叶中异泽兰黄素等氧甲基化修饰的黄酮类有效成分的生物合成路径奠定基础。

材料与方法

材料 以本团队前期在湖北蕲春筛选的富含黄酮类成分的艾种质“香艾”(基因组测序材料)为研究对象,取其根(root, R)、根茎(rhizome, Rh)、茎秆(stem, S)、叶芽(0d, LA)、幼叶(15d, LB)、成熟叶片(30d, LC)、老叶片(45d, LD)等不同组织作为实验材料分别进行转录组测定,转录组数据参考本团队前期发表的蕲艾全基因组测序和组装结果^[24]。本课题组前期已完成高质量艾基因组组装及注释。

FOMT基因全基因组的鉴定、系统发育树构建及染色体定位 利用同源比对和保守结构域(PF01596)从艾叶基因组数据库中调取类黄酮生物合成通路上的FOMT基因家族序列,根据同源比对和保守结构域分析,在艾叶基因组中共鉴定得到83个FOMT家族成员。利用83个FOMT蛋白的序列,与其他植物的FOMT成员进行系统进化树构建。应用MEGA比对工具采取NJ(Neighbour-join)方法,并进行了重复1000次的bootstrap检验,所有设定均采用默认值。同时从基因组注释文件中筛选出基因家族成员ID,并利用TBtools软件确定每个FOMT基因的位置信息并绘制其所对应的染色体物理位置图。

FOMT基因家族成员的鉴定、蛋白质特征分析及亚细胞定位 利用TBtools软件对获取的83个FOMT蛋白的基本理化性质进行预测,包括理论等电点、不稳定系数及分子量等。使用在线生物信息学工具Plant-mPLOC(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)和WOLF PSORT(<https://www.genscript.com/wolf-psort.html?src=leftbar>)对获取的83个FOMT蛋白进行亚细胞定位预测。

FOMT基因保守结构域和基因结构分析 利用MEME(<http://meme-suite.org/tools/meme>)在线网站对83个FOMT的蛋白质保守基序进行分析,目标保守基序设为10,其余为默认值。利用TBtools对艾叶FOMT家族的基因进行保守基序、保守结构域和基因结构三者可视化分析。

FOMT基因家族成员的实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)分析 随机选择FOMT基因:AY065929-RA、AY178629-RA、AY068208-RA、AY287150-RA、AY261599-RA和AY163585-RA(依次命名为FOMT1、FOMT2、FOMT3、FOMT4、FOMT5、FOMT6)进行qRT-PCR验证。实验样品为艾的根(R)、根茎(Rh)、茎秆(S)、嫩叶(young leaves, L1)、成熟叶(mature leaves, L2)、老叶(old leaves, L3)6个不同组织。利用天根试剂盒提取本研究所植物总RNA,用NanoDrop 2000分光光度计检测所提取总RNA的 A_{260}/A_{280} 的比值和浓度及用1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性。将符合要求的总RNA利用反转录试剂盒合成cDNA。以cDNA为模板, β -actin为内参基因,Primer Premier 5设计引物用于qRT-PCR反应,对部分艾叶FOMT基因进行qRT-PCR,定量引物见表1。qRT-PCR反应体系及反应条件参照ABclone公司的荧光定量PCR试剂盒说明书进行,利用荧光定量PCR仪进行反应,相对定量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法。

结果与分析

1 艾叶FOMT基因家族全基因组鉴定

从艾叶基因组数据库筛选并鉴定FOMT基因,去

Table 1 Primer sequences of flavonoid O-methyltransferase (FOMT) genes randomly selected from *Artemisia argyi*

Gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
Reference gene	GCAAGAGCTTGAAACCGCAA	AAGAGAACCTCAGGGCAACG
FOMT1	GGTCCATAGACAAATGTTGATCTT	TTCTACACGCCATTGCTTCATT
FOMT2	CCACTGAAGAGACCTTTGCTTATGC	CTACGGGAGTGAGTCCATACGC
FOMT3	GGTTGCTAAGAGTAAATCAAATAAATA	CCATCGTCCTTCGCACATA
FOMT4	CCACTGAAGAGAACTTTACTTATGC	GAACTGATCTAGACTTG TAGTCCCC
FOMT5	ATGACAACCGAAATTAACAGAAA	TGTTTCAGTTTCAGATAAGGGTTTTT
FOMT6	CACATACTTCATTCTCAGGCTCATA	CCTTCTTTTCTCCATTCTCGGTT

除可变剪切导致的重复转录本和结构域确认, 最终获得 83 个 *FOMT* 家族成员。为研究艾叶 *FOMT* 基因家族的进化关系, 本研究选取其他植物的 *FOMT* 成员与艾 *FOMT* 进行系统进化树构建。如图 1 所示, 进化树主要由两大进化枝构成, 包括 *CCoAOMT* 亚家族 (32 个基因) 和 *COMT* 亚家族 (51 个基因), 根据 *FOMT* 催化位点具有相对特异性的特点, *COMT* 亚家族成员与已进行功能报道的 *FOMT* 的聚类结果可预测其催化位点。根据 *COMT* 亚家族进化分枝和聚类结果, 可将其进一步分为 3'*FOMT* (31 个基因)、4'*FOMT* (10 个基因)、6'*FOMT* (6 个基因) 及未归类基因 (4 个)。

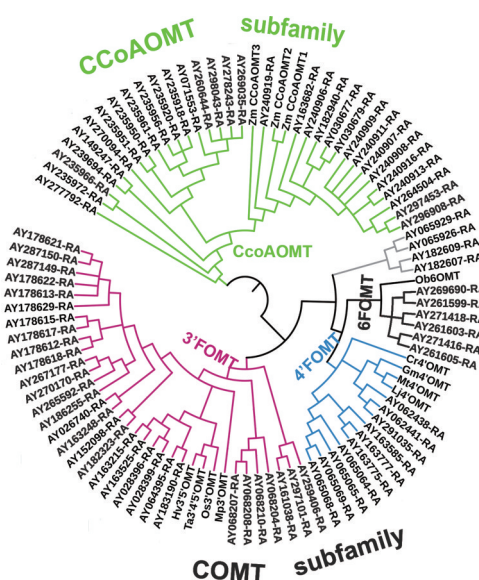


Figure 1 Phylogenetic tree of *FOMT* gene family of *Artemisia argyi*. CCoAOMT: Caffeoyl CoA *O*-methyltransferase; COMT: Caffeic acid *O*-methyltransferase

基于本课题组已组装完成的艾染色体级别参考基因组, 本研究分析了 *FOMT* 家族成员在艾染色体上的分布情况。结果显示, *FOMT* 家族成员在艾 10 条染色体上均有分布但分布不均匀, 每条染色体排列的基因数目差别很大, 以在 2、9 和 10 号染色体上分布数目最

多, 在 1、3 和 4 号染色体上分布最少 (图 2), 并发现在染色体 2、5、9、10 号上, 大多数 *FOMT* 以基因簇形式存在。

2 *FOMT* 基因家族蛋白理化性质和亚细胞定位预测

利用 *FOMT* 基因 ID, 从基因组数据中获得 *FOMT* 蛋白序列, 使用 TBtools 对 *FOMT* 蛋白质序列进行理化性质分析。结果如表 2 所示, 32 个 CCoAOMT 亚家族成员编码氨基酸的数量介于 70 (AY235972-RA)~725 (AY240916-RA) 个氨基酸, 蛋白分子质量在 7 802.12 Da (AY235972-RA)~84 350.75 Da (AY240919-RA)。此外, 32 个 CCoAOMT 亚家族成员中有 29 个蛋白的理论等电点在 4.51 (AY270094-RA)~6.29 (AY235950-RA), 为酸性蛋白, AY239694-RA 的理论等电点为 7.00, 属于中性蛋白, AY277792-RA、AY235972-RA 蛋白的理论等电点分别为 8.59、9.99, 均为碱性蛋白。对 CCoAOMT 亚家族成员进行蛋白稳定系数的预测结果表明, 有 30 个不稳定系数小于 40, 为稳定蛋白, 剩余 2 个为不稳定蛋白。预测结果显示此 32 个 CCoAOMT 亚家族成员蛋白的亲水性平均值均为负值, 均为亲水性蛋白, 亚细胞定位结果显示超过 80% 的 CCoAOMT 亚家族成员定位于细胞质。51 个 COMT 亚家族成员编码氨基酸的数量为 178 (AY267177-RA)~398 (AY062441-RA) 个氨基酸, 蛋白分子质量在 20 058.9 Da (AY267177-RA)~45 573.58 Da (AY062441-RA), 理论等电点预测结果表明有 48 个 COMT 亚家族成员为酸性蛋白, 其余 3 个 COMT 亚家族成员为碱性蛋白。51 个 COMT 亚家族成员蛋白稳定系数的预测结果显示有 45 个 *FOMT* 蛋白为稳定蛋白, 其余 3 个为不稳定蛋白。亲水性平均值预测结果显示, 与 32 个 CCoAOMT 亚家族成员相比, 51 个 COMT 亚家族成员中, 约 1/3 的 *FOMT* 蛋白为疏水性蛋白, 2/3 蛋白为亲水性蛋白。另外, 与 CCoAOMT 亚家族成员不同的是 96% 的 COMT 亚家族成员定位于叶绿体。

Table 2 Information and characteristics of the *FOMT* gene family in the flavonoid synthesis of *Artemisia argyi*. pI: Isoelectric point; GRAVY: Grand average of hydropathicity

Sequence ID	Amino acid length	Molecular mass/Da	pI	Instability index	Aliphatic Index	GRAVY	Subcellular localization
CCoAOMT							
AY149247-RA	77.00	8 511.05	6.23	38.88	122.73	0.440	Nucleus
AY239694-RA	279.00	31 200.99	7.00	39.31	97.46	-0.010	Chloroplast
AY235918-RA	185.00	21 069.00	4.58	24.51	102.76	-0.137	Cytoplasm
AY235920-RA	197.00	22 540.75	4.80	26.36	101.47	-0.184	Chloroplast, cytoplasm
AY235961-RA	109.00	12 410.68	5.54	39.18	127.89	0.418	Chloroplast
AY235951-RA	584.00	65 124.66	5.32	31.78	93.30	-0.144	Chloroplast
AY235950-RA	115.00	12 767.04	6.29	32.69	103.48	-0.033	Cytoplasm
AY071553-RA	229.00	26 049.98	5.08	28.96	100.87	-0.218	Chloroplast, cytoplasm
AY270094-RA	227.00	25 207.26	4.51	40.25	95.73	-0.256	Cytoplasm

Continued

Sequence ID	Amino acid length	Molecular mass/Da	pI	Instability index	Aliphatic Index	GRAVY	Subcellular localization
AY260644-RA	305.00	34 241.30	4.65	35.94	87.21	-0.475	Cytoplasm
AY278243-RA	305.00	34 241.30	4.65	35.94	87.21	-0.475	Cytoplasm
AY269035-RA	305.00	34 241.30	4.65	35.94	87.21	-0.475	Cytoplasm
AY298043-RA	305.00	34 241.30	4.65	35.94	87.21	-0.475	Cytoplasm
AY235956-RA	229.00	25 860.71	5.23	29.42	97.55	-0.203	Chloroplast, cytoplasm
AY235966-RA	574.00	65 770.09	5.88	38.29	101.03	-0.080	Cytoplasm
AY235972-RA	70.00	7 802.12	9.99	24.33	114.14	-0.053	Chloroplast
AY163682-RA	252.00	28 211.32	5.32	37.36	95.20	-0.223	Cytoskeleton, cytoplasm
AY240907-RA	233.00	26 441.46	5.29	38.26	103.39	-0.228	Cytoskeleton, cytoplasm
AY240911-RA	244.00	27 459.48	5.26	28.85	101.93	-0.206	Cytoplasm
AY240906-RA	486.00	54 584.57	5.27	30.80	102.53	-0.172	Cytoskeleton, cytoplasm
AY240908-RA	244.00	27 442.45	5.29	29.65	104.30	-0.147	Cytoskeleton, cytoplasm
AY240916-RA	725.00	82 749.66	5.94	31.89	98.12	-0.183	Cytoplasm
AY240913-RA	243.00	27 325.34	5.17	35.42	103.95	-0.145	Cytoskeleton, cytoplasm
AY240909-RA	244.00	27 434.53	5.28	30.38	103.11	-0.156	Cytoskeleton, cytoplasm
AY030677-RA	266.00	29 966.43	5.20	32.99	104.89	-0.102	Cytoskeleton, cytoplasm
AY030679-RA	247.00	27 795.93	5.56	35.05	100.69	-0.203	Cytoplasm
AY182940-RA	109.00	12 585.39	5.52	33.76	94.77	-0.188	Cytoplasm
AY264504-RA	244.00	27 340.31	5.16	34.17	102.75	-0.156	Cytoskeleton, cytoplasm
AY240919-RA	734.00	84 350.75	5.83	32.90	104.06	-0.124	Cytoplasm
AY297453-RA	244.00	27 399.38	5.28	33.39	102.75	-0.168	Cytoskeleton, cytoplasm
AY296908-RA	244.00	27 399.38	5.28	33.39	102.75	-0.168	Cytoskeleton, cytoplasm
AY277792-RA	412.00	47 473.14	8.59	41.84	88.45	-0.214	Chloroplast, cytoplasm
COMT							
AY065929-RA	260.00	29 062.74	7.65	34.10	87.04	-0.040	Chloroplast
AY065926-RA	352.00	39 155.04	5.43	41.14	96.68	-0.028	Chloroplast
AY182609-RA	302.00	33 385.82	6.08	24.82	96.49	0.030	Chloroplast
AY182607-RA	357.00	40 129.53	5.85	33.34	91.74	-0.054	Chloroplast
AY269690-RA	357.00	39 612.66	5.39	32.81	92.04	0.015	Chloroplast
AY261599-RA	357.00	39 612.66	5.39	32.81	92.04	0.015	Chloroplast
AY271418-RA	353.00	39 434.52	5.38	33.73	96.69	-0.027	Chloroplast
AY261603-RA	353.00	39 434.52	5.38	33.73	96.69	-0.027	Chloroplast
AY271416-RA	352.00	39 002.23	5.26	31.04	96.36	0.068	Chloroplast
AY261605-RA	352.00	39 002.23	5.26	31.04	96.36	0.068	Chloroplast
AY062438-RA	369.00	42 106.76	5.81	38.64	96.07	-0.122	Chloroplast
AY291035-RA	398.00	45 558.61	5.07	26.71	95.95	-0.117	Chloroplast
AY062441-RA	398.00	45 573.58	5.06	26.77	95.70	-0.122	Chloroplast
AY163775-RA	244.00	27 379.62	5.54	29.99	97.50	0.008	Chloroplast
AY163777-RA	392.00	44 168.96	6.31	34.84	95.03	-0.098	Chloroplast, mitochondrion
AY163585-RA	363.00	40 756.99	5.69	34.29	97.22	-0.033	Chloroplast, mitochondrion
AY065065-RA	363.00	40 650.13	5.72	38.81	101.02	0.006	Chloroplast, mitochondrion
AY065064-RA	360.00	40 573.91	5.80	35.97	92.64	-0.129	Chloroplast
AY065069-RA	237.00	26 594.02	5.66	28.63	101.60	0.006	Chloroplast, cytoplasm
AY065068-RA	266.00	29 585.37	6.05	32.25	99.70	0.089	Chloroplast
AY259406-RA	231.00	25 967.00	5.73	34.91	80.52	-0.153	Chloroplast
AY297101-RA	259.00	28 479.82	5.34	37.28	91.04	-0.136	Chloroplast
AY161038-RA	246.00	26 996.16	5.31	39.64	92.24	-0.076	Chloroplast, cytoplasm
AY068204-RA	363.00	40 196.52	5.62	35.41	87.77	-0.101	Chloroplast
AY068208-RA	359.00	39 985.95	5.34	40.38	91.45	-0.094	Chloroplast
AY068210-RA	364.00	40 481.72	5.15	44.37	89.67	-0.074	Chloroplast
AY068207-RA	365.00	40 660.86	5.35	43.24	92.08	-0.081	Chloroplast
AY183190-RA	364.00	39 773.75	5.18	28.67	87.36	0.007	Chloroplast
AY064395-RA	364.00	39 693.62	5.10	28.95	88.19	0.001	Chloroplast
AY028399-RA	384.00	42 000.57	6.18	35.14	89.40	-0.013	Chloroplast
AY028396-RA	289.00	31 505.29	5.77	35.48	85.40	0.002	Chloroplast, mitochondrion
AY163215-RA	364.00	39 914.18	5.42	30.95	90.33	0.029	Chloroplast

3 艾叶 *FOMT* 基因保守结构域和基因结构分析

将 *FOMT* 基因的系统进化树与其基因结构和蛋白结构进行交互分析, 从进化角度探究基因结构和蛋白结构的差异性。系统进化分析结果表明, 艾中 *CCoAOMT* 亚家族和 *COMT* 亚家族在进化关系可区分开 (图 3A), 在蛋白结构上也可清晰区分开。蛋白结构模体 (motif) (查找数为 10) 分析显示, *COMT* 成员相对 *CCoAOMT* 成员 motif 数较多, 且位于 N 端的 motifs 变异相对较大, 位于 C 端的 motifs 相对保守。 *CCoAOMT* 亚家族成员主要具有 motif2、6、3、4、8; *COMT* 亚家族成员主要具有 motif5、6、1、7、9、10 (图 3B)。此外, 保守结构域分析显示, *CCoAOMT* 亚家族成员氨基酸序列相对较短, 只包含 1 个 AdoMet_MTases superfamily 结构域。 *COMT* 亚家族成员氨基酸序列相对较长, 包含 AdoMet_MTases superfamily 和 Methyltransf_2 结构域, 此外, 大多数 *COMT* 的 N 端还包含 1 个 dimerization 结构域, 该结构域在蛋白二聚体的形成发挥重要作用。部分 *FOMT* 成员还具有 PcnB superfamily、AraC superfamily、F-box_AtFBL13-like 及 dimerization2 superfamily

结构域 (图 3C)。在基因结构上, *FOMT* 家族成员基因长度变异较大, 内含子外显子数目变异较大, 其中 *CCoAOMT* 亚家族成员的外显子和内含子数目明显多于 *COMT* 亚家族成员 (图 3D)。

4 艾叶 *FOMT* 家族基因表达模式分析

为揭示 *FOMT* 基因的表达情况, 将鉴定到的 *FOMT* 两个亚家族基因分别在艾的根 (R)、根茎 (Rh)、茎秆 (S)、叶芽 (0 d, LA)、幼叶 (15 d, LB)、成熟叶片 (30 d, LC)、老叶片 (45 d, LD) 7 个不同组织的表达量进行归一化和热图分析, 结果显示 32 个 *CCoAOMT* 亚家族成员中有超过一半基因 (17 个) 在根 (R) 和根茎 (Rh) 中高表达, 8 个基因在 7 个组织中都不表达, 其余 7 个基因在茎秆 (S) 和叶片 (LA-D) 中高表达; 而 *COMT* 亚家族成员中一半以上基因 (31 个) 在茎秆和叶片中优势表达, 20 个基因在根和根茎中优势表达。以上结果说明 *CCoAOMT* 和 *COMT* 亚家族成员在组织表达模式上也存在明显差异, *CCoAOMT* 成员主要在艾根和根茎中优势表达, 可能主要参与到根中木质素的合成, 而 *COMT* 成员主要在叶片中优势表达, 可能主



Figure 3 A: Phylogenetic tree of *FOMT* gene family of *Artemisia argyi*. B, C: The motifs (B) and conserved domains (C) of *FOMT* gene family of *Artemisia argyi*. D: Gene structure analyses of *FOMT* gene family of *Artemisia argyi*

要参与到叶片中类黄酮成分的合成(图4)。

5 艾叶 *FOMT* 基因家族成员的 qRT-PCR 分析

为进一步研究艾叶类黄酮生物合成通路中 *FOMT* 家族基因在艾不同组织及不同叶龄叶片中的表达模式,本研究利用荧光定量PCR技术对该家族中的部分基因进行表达模式的分析,通过对比不同组织及不同叶龄叶片中 *FOMT* 基因表达量的FPKM热图分析发现(图5), *FOMT1*、*FOMT2*、*FOMT3*、*FOMT4* 均在叶片(L1~3)中优势表达,这与热图中 *FOMT* 基因表达量的FPKM变化一致,均在叶片中高表达,推测在叶片中优势表达的基因,可能主要参与到叶片中类黄酮成分的合成。*FOMT5*、*FOMT6* 均在根中高表达,在其他部位几乎无表达,该结果与热图中 *FOMT5*、*FOMT6* 在根优势表达的趋势相符。两种方法互相验证后结果会更具说服力。

讨论

类黄酮是植物中广泛存在的天然产物,其结构和种类极为丰富。目前,植物中已鉴定到的类黄酮达到

8 000 多种^[25],其基本结构为C6-C3-C6,是由2个苯环(A环与B环)通过中央三碳(C环)相互连接而成。根据中央三碳的氧化程度及B环的连接位点,可将类黄酮分为6大类:黄酮(flavones)、黄酮醇(flavonols)、黄烷酮(flavanones)、黄烷醇(flavanols)、异黄酮(isoflavones)和花青素(anthocyanidins)^[26,27]。类黄酮的生物活性与其结构密切相关,而结构上的巨大差异主要是通过羟基化、糖基化、酰基化和甲基化等对类黄酮基本骨架进行多重修饰而产生。其中羟基化是类黄酮最常见的修饰,据统计78.6%的类黄酮都有羟基化修饰,56.2%的类黄酮再进行糖基化修饰,24.8%的类黄酮会发生甲基化修饰,而酰基化修饰较少发生,只占4.8%^[28]。目前研究最多的是黄酮的羟基化和糖基化修饰,而关于甲基化和酰基化的研究较少。艾叶富含黄酮类化合物,目前从艾叶中共分离得到51种黄酮类物质,经统计发现约2/3的黄酮都属于O-甲基化类黄酮^[2]。在植物体内,类黄酮O-甲基化反应主要由 *FOMT* 以SAM为甲基供体通过SN2亲核取代反应完

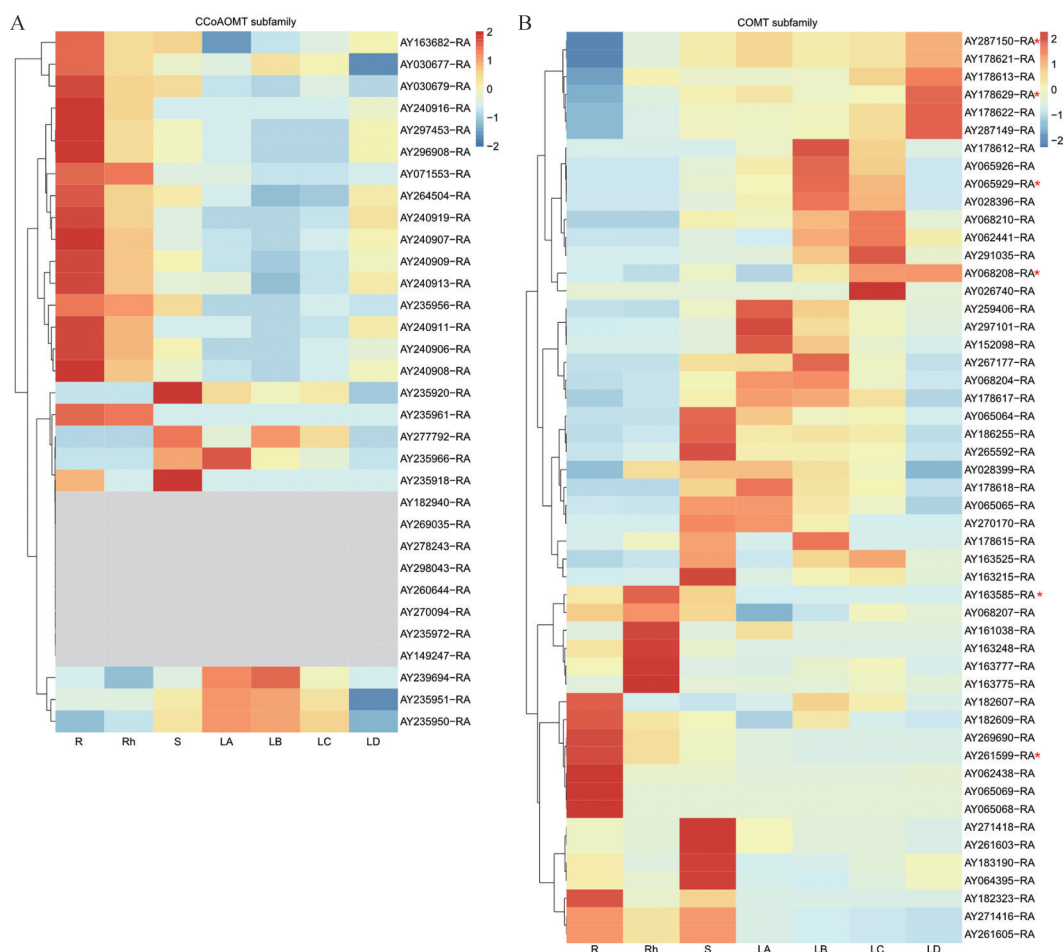


Figure 4 Expression pattern of *FOMT* gene in *Artemisia argyi*. A: Indicates expression pattern of *CCoAOMT* subfamily genes in different tissues; B: Indicates expression pattern of *COMT* subfamily genes in different tissues. The red asterisks indicate the *FOMT* genes randomly selected from *Artemisia argyi*

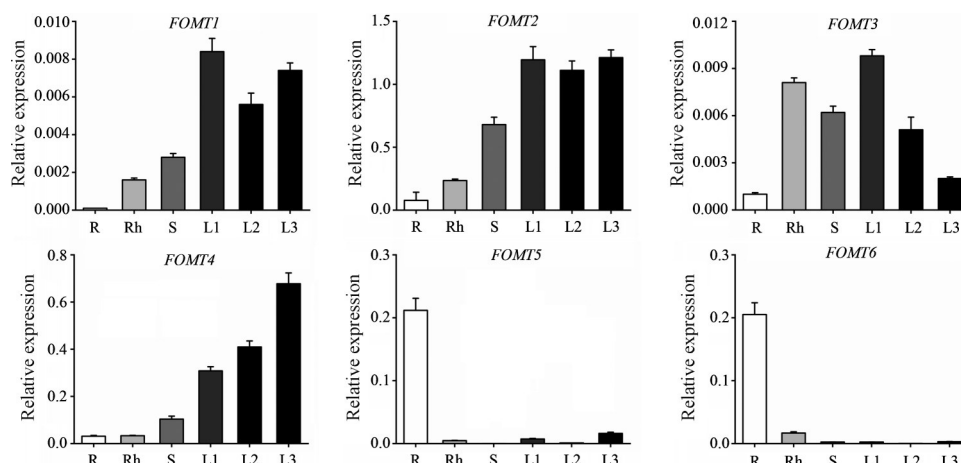


Figure 5 The expression levels of the *FOMT* genes in different tissues. R: Root; Rh: Rhizome; S: Stem; L1: Young leaves; L2: Mature leaves; L3: Old leaves

成^[29], 这表明 *FOMT* 在 *O*-甲基化类黄酮的生物合成中起到非常重要的作用。近年来, *O*-甲基类黄酮的药用价值和生物合成调控备受关注, 其药理活性及药物开发研究已成为当下的研究热点。此外, *O*-甲基化类黄酮也是植物体内重要的抗逆代谢物, 在绿色农药开发、作物抗性育种领域也具有较大的应用潜力。

本研究基于生物信息学方法, 对艾叶中鉴定到的类黄酮生物合成通路上 *FOMT* 基因家族成员进行基因序列特征、亚细胞定位、系统发育、基因结构、组织表达模式等的分析。系统进化分析结果表明, 艾叶类黄酮生物合成通路上的 *FOMT* 家族基因主要由两大进化枝构成, 包括 *CCoAOMT* 亚家族 (32 个基因) 和 *COMT* 亚家族 (51 个基因)。通过对 *FOMT* 催化位点分析发现 *FOMT* 常对黄酮骨架 B 环的 3' 和 4' 位羟基及 A 环的 6、7、8 位羟基进行催化, 且具有底物特异性和位点特异性的特征, 而且同科属物种中 *FOMT* 往往具有较高的同源性和相同的 *O*-甲基化位点^[30]。 *FOMT* 的催化特性也可为后续其功能验证提供借鉴。基因结构分析表明, *FOMT* 家族成员基因长度变异较大, 内含子外显子数目变异较大, 其中 *CCoAOMT* 亚家族成员的外显子和内含子数目明显多于 *COMT* 亚家族成员, 两者基因结构的差异可能会导致两者基因功能的多样性^[31]。通过荧光定量 PCR 分析发现, 一半以上 *FOMT* 基因在艾的叶片中表达量较高, 具有组织表达的特异性。根据银杏 *GbFOMT-13* 在叶片中的表达量变化与叶片中类黄酮合成速率相似, 推测 *GbFOMT-13* 参与银杏叶片中类黄酮甲基化反应^[32]。以此类推, 由于氧甲基化类黄酮成分在艾植株中的分布具有组织特异性, 主要分布在艾的叶片中。在艾的叶片中高表达的 *FOMT1*、*FOMT2*、*FOMT3*、*FOMT4* 可能参与艾叶类黄酮的氧甲基化反应。

综上所述, 本研究基于艾全基因组数据, 筛选并鉴定出 83 个 *FOMT* 基因, 对其进行全面的生物信息学分析, 包括系统发育、染色体定位、基因序列特征、亚细胞定位预测、系统发育、染色体定位、蛋白结构、基因结构分析及表达模式的分析和验证, 能初步了解艾 *FOMT* 基因家族的基因数量、功能分类及表达趋势, 为进一步深入研究 *FOMT* 功能和甲基化黄酮类化合物的生物合成提供理论依据。

作者贡献: 第一作者彭赛男负责论文设计、实验、数据分析及论文撰写; 通讯作者刘大会、苗玉焕负责论文设计、数据分析和论文指导; 李宇琨、罗丹丹、陈昌婕参与实验及数据分析; 周佳、李佳怡、郑佳参与样品采集。所有作者参与论文修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Li H, Chen XY, Zhu Z, et al. The modern research progress of *Artemisiae Argyi* [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2022, 45: 771-775.
- [2] Lan XY, Zhang Y, Zhu LB, et al. Research progress on chemical constituents from *Artemisiae Argyi Folium* and their pharmacological activities and quality control [J]. *Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2020, 45: 4017-4030.
- [3] Chen JH, Li XM, Yang WY, et al. Research progress of plant *O*-methoxy flavonoids and *O*-methyltransferases [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2021, 33: 1072-1079.
- [4] Shi Y, Liu Y, Chen JJ, et al. Effects of Yellow Dragon disease pathogen infection on flavonoids and volatile substances in citrus chazhi fruits [J]. *J Huazhong Agric Univ (华中农业大学学报)*, 2020, 39: 24-33.
- [5] Berim A, Gang DR. Methoxylated flavones: occurrence, importance, biosynthesis [J]. *Phytochem Rev*, 2016, 15: 363-390.

- [6] Lahtinen M, Salminen JP, Kapari L, et al. Defensive effect of surface flavonoid aglycones of *Betula pubescens* leaves against first instar *Epirrita autumnata* larvae [J]. *J Chem Ecol*, 2004, 30: 2257-2268.
- [7] Cui MY, Lu AR, Li JX, et al. Two types of *O*-methyltransferase are involved in biosynthesis of anticancer methoxylated 4'-deoxyflavones in *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Plant Biotechnol J*, 2022; 20: 129-142.
- [8] Shen J, Li P, Liu S, et al. Traditional uses, ten-years research progress on phytochemistry and pharmacology, and clinical studies of the genus *Scutellaria* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 265: 113-198.
- [9] Wang S, Chen P, Jiang W, et al. Identification of the effective constituents for anti-inflammatory activity of Ju-Zhi-Jiang-Tang, an ancient traditional Chinese medicine formula [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1348: 105-124.
- [10] Yoshida I, Kumagai M, Ide M, et al. Polymethoxyflavones in black ginger (*Kaempferia parviflora*) regulate the expression of circadian clock genes [J]. *J Funct Foods*, 2020, 68: 103900.
- [11] Ferreira JF, Luthria DL, Sasaki T, et al. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer [J]. *Molecules*, 2010, 15: 3135-3170.
- [12] Bu HY, Han F, Hao ML, et al. Research progress in the regulation of flavonoid biosynthesis in medicinal plants [J]. *North Pharm (北方药学)*, 2021, 18: 192-196.
- [13] Zhou ZK, Chen XS, Zhang M, et al. Phenolics, flavonoids, proanthocyanidin and antioxidant activity of brown rice with different pericarp colors following storage [J]. *J Stored Products Res*, 2014, 59: 120-125.
- [14] Zhang CL, Zhong YM, Shen DH, et al. Research progress of plant flavonoid *O*-methyltransferase [J]. *Acta Bot Boreal Occident Sin (西北植物学报)*, 2012, 32: 1274-1281.
- [15] Joshi CP, Chiang VL. Conserved sequence motifs in plant *S*-adenosyl-*L*-methionine-dependent methyltransferases [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 37: 663-674.
- [16] Green AR, Lewis KM, Barr JT, et al. Determination of the structure and catalytic mechanism of *Sorghum bicolor* caffeic acid *O*-methyltransferase and the structural impact of three *brwn midrib12* mutations [J]. *Plant Physiol*, 2014, 165: 1440-1456.
- [17] Rakoczy M, Femiak I, Alejska M, et al. Sorghum CCoAOMT and CCoAOMT-like gene evolution, structure, expression and the role of conserved amino acids in protein activity [J]. *Mol Genet Genomics*, 2018, 293: 1077-1089.
- [18] Wang XJ, Chen LL, Fang Y. Advances in pharmacological effect of eupatilin [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2019, 30: 665-668.
- [19] Fei X, Wang J, Chen C, et al. Eupatilin inhibits glioma proliferation, migration, and invasion by arresting cell cycle at G1/S phase and disrupting the cytoskeletal structure [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 4781-4796.
- [20] Cho JH, Lee JG, Yang YI, et al. Eupatilin, a dietary flavonoid, induces G2/M cell cycle arrest in human endometrial cancer cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49: 1737-1744.
- [21] Liu R. Study on the Mechanism of Apoptosis of Hepatoma Cells Induced by Isalanin (艾叶提取物异泽兰黄素诱导肝癌细胞凋亡机制的研究) [D]. Guangzhou: Southern Medical University (南方科技大学), 2019.
- [22] Choi EJ, Lee S, Chae JR, et al. Eupatilin inhibits lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory mediators in macrophages [J]. *Life Sci*, 2011, 88: 1121-1126.
- [23] Jegal KH, Ko HL, Park SM, et al. Eupatilin induces sestrin2-dependent autophagy to prevent oxidative stress [J]. *Apoptosis*, 2016, 21: 642-656.
- [24] Miao Y, Luo D, Zhao T, et al. Genome sequencing reveals chromosome fusion and extensive expansion of genes related to secondary metabolism in *Artemisia argyi* [J]. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20: 1902-1915.
- [25] Yonekura-Sakakibara K, Higashi Y, Nakabayashi R. The origin and evolution of plant flavonoid metabolism [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 943.
- [26] Wen W, Alseekh S, Fernie AR. Conservation and diversification of flavonoid metabolism in the plant kingdom [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2020, 55: 100-108.
- [27] Lin CC, Chen DW, Dai JG. Advances of synthetic biology of flavonoids [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1322-1335.
- [28] Alseekh S, Perez de Souza L, Benina M, et al. The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function [J]. *Phytochemistry*, 2020, 174: 112347.
- [29] Ibrahim RK, Bruneau A, Bantignies B. Plant *O*-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 36: 1-10.
- [30] Tian MM, Liu J, Huang X, et al. Bioinformatics analysis of flavonoid *O*-methyltransferase [J]. *Mol Plant Breeding (分子植物育种)*, 2021. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210615.1231.006.html>.
- [31] Xu G, Guo C, Shan H, et al. Divergence of duplicate genes in exon-intron structure [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: 1187-1192.
- [32] Zhang CL, Chen P, Zhong YM, et al. Cloning and expression of flavonoid *O*-methyltransferase gene in *Ginkgo biloba* [J]. *Acta Hort Sin (园艺学报)*, 2012, 39: 355-362.