

## 白木香纤维素合酶家族基因的鉴定及表达分析

米芯雨<sup>1,2</sup>, 邱海玲<sup>1,2</sup>, 关范圆<sup>2</sup>, 郑语嫣<sup>2</sup>, 王晓晖<sup>1\*</sup>, 史社坡<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学, 北京中医药研究院, 中药现代研究中心, 北京 102488; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

**摘要:** 纤维素合酶 (cellulose synthase, CesA) 是纤维素生物合成途径中的一类关键酶, 在植物生长发育和植物防御反应中有着重要的作用。本研究利用白木香基因组数据库, 通过生物信息学手段, 对白木香纤维素合酶家族成员及其编码蛋白的理化特性、蛋白保守基序、染色体定位、启动子区域等进行预测分析。系统分析鉴定了 21 个白木香 *AsCesA* 基因, 并发现 *AsCesA* 蛋白主要分布于质膜, 氨基酸数目为 390~1 261 个, 分子质量为 43.35~142.58 kD, 等电点分布在 5.67~8.86, 均含跨膜结构域, 数目为 6~8; 系统进化分析表明 21 个 *AsCesA* 分为 3 个亚组; 保守基序分析表明, 不同 *AsCesA* 蛋白的 motif 组成有一定差异, 但均含有 motif2、motif6、motif7 和 motif10。顺式作用元件分析表明, *AsCesA* 基因家族具有响应植物激素作用、非生物胁迫和生物进程相关的顺式作用元件。分析 NaCl 诱导不同时刻的白木香愈伤组织的转录组数据, 选择了 7 个具有差异表达的 *AsCesA* 并分析其在非生物胁迫下的表达量变化。实时荧光定量 PCR 结果表明, 盐、低温、干旱和重金属胁迫均能不同程度影响白木香中 7 个 *AsCesA* 基因的表达水平。其中 *AsCesA1*、*AsCesA3* 和 *AsCesA20* 均能响应低温、盐胁迫、干旱胁迫和重金属胁迫, 推测这 3 个基因可能在白木香响应非生物胁迫中发挥重要作用。对不同非生物胁迫下的纤维素含量进行测定, 白木香愈伤组织中纤维素含量变化与纤维素合酶的表达量趋势基本一致。本研究为进一步揭示纤维素合酶在白木香中防御反应中作用奠定基础。

**关键词:** 白木香; 纤维素合酶; 生物信息学; 非生物胁迫; 表达分析

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)01-0253-12

## Identification and expression analysis of cellulose synthase family genes in *Aquilaria sinensis*

MI Xin-yu<sup>1,2</sup>, QIU Hai-ling<sup>1,2</sup>, GUAN Fan-yuan<sup>2</sup>, ZHENG Yu-yan<sup>2</sup>, WANG Xiao-hui<sup>1\*</sup>, SHI She-po<sup>1\*</sup>

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

**Abstract:** Cellulose synthase (CesA), one of the key enzymes in the biosynthesis of cellulose in plants, plays an important role in plant growth and plant resistance. In this study, a total of 21 *AsCesA* genes from *Aquilaria sinensis* were systematically identified and the physico-chemical characteristics were analyzed based on genome database and bioinformatical methods. The phylogenetic tree was constructed and the gene location on chromosome, *cis*-acting elements in the 2 000 basepairs upstream regulatory regions and conservative motifs were analyzed. The *AsCesA* proteins were mainly located on the plasma membrane. The number of amino acids of the proteins ranged from 390 to 1 261. The isoelectric point distributed from 5.67 to 8.86. All of the 21 *AsCesA* proteins possessed the transmembrane domains, the number of which was from 6 to 8. The genes were classified into 3 groups according to the phylogenetic relationship. Obvious differences were observed in motif composition in

收稿日期: 2023-04-27; 修回日期: 2023-08-14.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32170374).

\*通讯作者 E-mail: shishepo@163.com; wangxhui2014@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0490

genes from different groups. However, motif2, motif6, motif7 and motif10 were observed in all of *AsCesA* proteins. Analysis of *cis*-acting elements indicated that *AsCesA* genes family has *cis*-acting elements related to plant hormones, abiotic stresses, and biological processes. Seven *AsCesA* genes with differential expression were selected according to the calli transcriptome data induced by NaCl at different times and their expression levels under different abiotic stresses were analyzed by quantitative real-time PCR. The results indicated that salt, low temperature, drought, and heavy metal stresses could affect the expression level of *AsCesA* genes, and the abundance of *AsCesA1*, *AsCesA3* and *AsCesA20* showed a significant change, implying their potential important roles to the abiotic stresses. The accumulation pattern of cellulose content under different abiotic stresses was similar to the expression trend of *AsCesA* genes. Our results provide valuable insights into the role of cellulose synthase in *A. sinensis* in plant defense.

**Key words:** *Aquilaria sinensis*; cellulose synthase; bioinformatics; abiotic stress; expression analysis

作为植物细胞的重要组成部分,植物细胞壁不仅具有传统意义上的机械支持和防御保护功能,还与植物细胞的物质运输、信号传导、生化代谢等生理功能有关<sup>[1]</sup>。纤维素是植物细胞壁的主要组成成分,并赋予细胞壁独特的抗张强度。植物中的纤维素主要以小微纤丝的形式存在,小微纤丝是以纤维素为基本单位组成的,而纤维素分子是线性 $\beta$ -1,4糖苷键连接的葡聚糖<sup>[2]</sup>。纤维素在植物体内的生物合成主要与纤维素合酶息息相关。早在1990年代,研究者<sup>[3]</sup>在木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)中首次发现了纤维素合酶基因。而后又在经济作物棉花中发现了第一个植物纤维素合酶基因<sup>[4]</sup>,通过氨基酸序列的比对,发现纤维素合酶具有 $\beta$ -糖基转移的保守序列,如典型的DDDQXXRW序列<sup>[5]</sup>(天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-谷氨酰胺-X-X-精氨酸-色氨酸)。拟南芥作为模式植物,纤维素合酶的功能研究得比较透彻,目前发现拟南芥中有10个纤维素合酶(*AtCesA*)基因,能够在质膜上以UDP-葡萄糖为底物,催化 $\beta$ -1,4糖苷键的形成<sup>[6]</sup>,进而合成纤维素。拟南芥中CesA蛋白家族中不同成员作用的研究已取得较大进展,*AtCesA4*、*AtCesA7*和*AtCesA8*对于次生细胞壁中的纤维素生物合成是不可或缺的;而初生细胞壁的纤维素主要由*AtCesA1*、*AtCesA3*和*AtCesA6*介导合成<sup>[7]</sup>;此外,*AtCesA6*与*AtCesA2*、*AtCesA5*和*AtCesA9*存在部分功能上的冗余现象。

一般纤维素合酶基因的大小为3.5~5.5 kb,有9~13个内含子,氨基酸序列相似性为53%~98%<sup>[2]</sup>。通过对已知植物的CesA氨基酸序列相似性比较,发现植物纤维素合酶具有以下结构特点:①植物CesA与细菌CesA蛋白序列的保守区一致,含有3个紧密相连的Asp残基,3个Asp残基与保守序列QXXRW连接形成D-D-D-QXXRW结构域<sup>[5]</sup>,在质膜区构成底物结合的活性位点;②通常含有8个跨膜结构域,分别处于CesA蛋白序列的两端,N末端有2个,C末端有6个,跨

膜区是 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷链穿过质膜进入细胞壁的重要通道<sup>[8]</sup>;③植物CesA蛋白的N末端具有锌指结构或LIM结构域,此结构域中具有非常保守的重复序列CXXC(半胱氨酸-X-X-半胱氨酸)<sup>[9]</sup>。此序列可以与DNA结合,与CesA蛋白各亚基之间的相互作用有关,并且对于维持纤维素合酶复合体的稳定性具有重要作用;④植物纤维素合酶包含有2个高突变区,植物体内数量繁多的CesA基因很可能与这2个突变区相关。

此外,近年来的研究表明,CesA在植物的非生物胁迫响应过程中起着重要的作用。例如,Kang等<sup>[10]</sup>发现黄瓜纤维素合酶基因家族成员*CsCesA5*、*CsCesA20*和*CsCesA28*在200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl水培处理下表达上调,表明它们可能响应相同的盐胁迫调节途径。Chai等<sup>[11]</sup>研究表明中间锦鸡儿*CiCesA8*的转基因拟南芥在种子萌发时对脱落酸更敏感并且对于干旱胁迫的耐受性降低,相应的脱落酸和胁迫相关基因表达下调。Wang等<sup>[12]</sup>研究表明,镉胁迫通过转录因子调控番茄纤维素合酶的表达以促进细胞壁纤维素的生物合成,尤其是根中细胞壁镉的固定过程,以缓解镉对植株的毒害作用。Chen等<sup>[13]</sup>发现破坏纤维素合成酶基因*AtCesA8*/*IRX1*可增强拟南芥对于干旱和渗透胁迫耐受性。Zhang等<sup>[14]</sup>研究表明,盐胁迫可能会影响CesA的活性,敲除拟南芥*AtCesA6*或*AtCesA1*都导致其对盐胁迫敏感性增加。Li等<sup>[15]</sup>通过基因沉默*BoiCesA*增加了西蓝花对盐胁迫的耐受性。低温会对不同物种的CesA基因表达产生不同的影响。如冷处理减少CesA在杨树和棉花中的表达,但增加了CesA在耐寒水稻中的表达<sup>[16]</sup>。因此,参与初生细胞壁生物合成(如*AtCesA1/6*等)和参与次生细胞壁生物合成(*AtCesA8*等)的纤维素合酶在植物非生物胁迫反应过程中起到重要作用。

白木香(*Aquilaria sinensis*)是瑞香科沉香属植物,具有重要的药用、经济、观赏、生态价值<sup>[17]</sup>。白木香是我国名贵药材沉香的唯一正品植物来源,但由于其自然

繁殖率低, 加上掠夺式砍伐, 生态环境遭受严重破坏, 白木香的野生资源濒于枯竭, 目前已被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 附录 II<sup>[18]</sup> 和国家濒危二级保护植物。CesAs 作为植物生长发育和非生物胁迫响应过程中的一个重要的基因家族, 在白木香中还未曾有报道。随着白木香基因组序列 (NCBI: txid210372) 的公布和完善<sup>[19]</sup>, 对纤维素合成酶家族基因进行全基因组挖掘和全面、系统的分析十分必要。本研究利用白木香基因组数据库, 通过生物信息学手段, 鉴定白木香纤维素合酶家族成员, 并进行蛋白理化特性分析; 利用 MEGA7.0、TBtools 等软件构建系统进化树, 并进行了蛋白保守基序、染色体定位、启动子区域分析。根据之前的转录组数据选择了 7 个 *AsCesA* 基因, 分析其在不同非生物胁迫下的表达水平, 为更好地了解 *CesA* 基因家族成员及其在白木香非生物胁迫响应中的生物学功能提供依据, 为进一步探索该家族在白木香防御反应中的作用奠定基础。

## 材料与方法

**材料** 选用实验室恒温箱长势相同的白木香愈伤组织, 用盐胁迫 ( $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ )、低温胁迫 ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ )、重金属胁迫 ( $500 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CdCl}_2$ )、干旱胁迫 ( $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ PEG6000}$ ) 4 种非生物胁迫分别处理 0、12、24、36、48 h 提取 RNA, 检测 *AsCesAs* 基因在各种胁迫下的表达差异。每组 3 个样品, 实验重复 3 次。温箱环境为温度  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , 湿度 40%, 无光照。琼脂糖 (Biowest agrose, 西班牙), 核酸 Marker 和核酸染料购自北京拜尔迪生物科技有限公司, 纤维素含量检测试剂盒 (Cat BC4280, 北京索莱宝科技有限公司), 引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。白木香愈伤组织中 RNA 的提取和 cDNA 的合成按照植物 RNA 提取试剂盒 (Cat 17200, 加拿大 Norgen 公司) 实验操作步骤进行植物总 RNA 提取, 利用 NanoDrop one 检测 RNA 浓度, 同时利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和质量。利用 GoScript Reverse Transcription System 反转录试剂盒 (Cat A5000, 美国 Promega 公司) 将白木香总 RNA 反转录为第一链 (cDNA), 反转录条件按照说明书进行。

**仪器** 台式高速冷冻离心机 (TY2019006127) 和普通 PCR 仪 (TY2019006123) 购自 (德国 Eppendorf 公司), 涡旋器 (G002035-0001, 生工生物工程(上海) 股份有限公司), 电子天平 (PL602E, 梅特勒托利多科技(中国) 有限公司), 凝胶成像仪 (WD-9413B, 北京六一生物科技有限公司), 电泳仪 (JY300E) 和实时荧光定量 PCR 仪 (CFX96) 购自 (美国 Bio-Rad 公司), 超微量分

光光度计 NanoDrop 2000 (ND2000, 基因有限公司)。

**白木香 *AsCesA* 家族的鉴定** 从拟南芥数据库 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥纤维素合酶蛋白氨基酸序列, 从 GigaDB 数据库 (<http://gigadb.org/>) 下载白木香基因组数据, 与拟南芥纤维素合酶进行 BLAST 比对, 阈值设定值为  $E < 1e^{-5}$ , 初步获得白木香 *CesA* 基因。从 Pfam 官网 (<http://pfam.xfam.org/>) 下载纤维素合酶家族的隐马尔可夫模型文件 (PF03552), 利用 HMM model 在白木香基因组文件中搜寻候选基因家族成员。将上述两种方法筛选得到的白木香纤维素合酶基因取交集, 并将蛋白序列上传到 NCBI-Batch CDD-Search 网站上 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>), 再次鉴定验证, 删去冗余序列。利用 ExPasy 网站 (<https://web.expasy.org/prot-param/>)、WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 及 TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 分析白木香 *AsCesA* 蛋白的分子量、等电点、亚细胞定位、跨膜结构域数量等。

**构建进化树** 根据 ClustalW 程序对拟南芥以及白木香 *AsCesA* 蛋白序列进行多序列比对, 最终结果利用 MEGA 7.0 软件采用邻接法 (Neighbor Joining, NJ) 构建进化树, 循环次数 1 000 次, 再用 Evolview 在线网站 (<http://www.evolgenius.info/evolview/>) 对进化树进行美化处理, 从而分析白木香和模式植物拟南芥纤维素合酶基因的进化关系, 以推测可能的生物功能。

**白木香 *CesA* 蛋白保守基序分析、染色体定位分析及启动子区域分析** 通过 MEME 网站分析白木香 *CesA* 蛋白保守基序, 基序的数目设置为 10 个。从白木香基因组注释信息中获取 *AsCesA* 基因在白木香染色体上的起始位置信息。提取 *AsCesA* 基因上游 2 000 bp 片段的碱基序列, 提交至 PlantCARE 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行启动子序列分析。通过 TBtools 软件对上述分析进行可视化处理。

**白木香 *AsCesA* 基因在不同胁迫处理下的表达分析** 分析课题组前期用 NaCl 诱导不同时刻的白木香愈伤组织的转录组数据<sup>[20]</sup>, 利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 的方法检测白木香 7 个 *AsCesA* 基因在干旱胁迫、盐胁迫、低温、重金属胁迫处理下的表达情况, 每组 3 个样品, 重复 3 次。分析使用 SYBR Green I 荧光染料法, 在 qRT-PCR 仪上进行。选取白木香 *AsRPL* 基因<sup>[21]</sup> 作为目标基因定量表达的内参基因, 引物序列见表 1。反应体系中含有  $5 \text{ } \mu\text{L} \times \text{PerfectStart Green qPCR SuperMix 酶}$ 、上下游引物 ( $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各  $0.2 \text{ } \mu\text{L}$ 、模板  $0.5 \text{ } \mu\text{L}$ 、dd  $\text{H}_2\text{O}$   $4.1 \text{ } \mu\text{L}$ , 总体

Table 1 Primers used for qRT-PCR

| Gene            | Primer sequence (5'-3') |                        |
|-----------------|-------------------------|------------------------|
|                 | Forward                 | Reverse                |
| <i>AsRPL</i>    | CGAACCCAATGAGGGAAA      | TTGCTCCAAGACCTTAGCG    |
| <i>AsCesA1</i>  | CCTACATTTGTTAGAGAACGGC  | CGCACATTATTTCTGGC      |
| <i>AsCesA2</i>  | GGTGACAGTGTGGACTAACG    | CCATCTTCCGCTCATACTC    |
| <i>AsCesA3</i>  | CAACCAATCACCCACATTC     | CAGCACCTCTCTCAGAAGTAGC |
| <i>AsCesA7</i>  | GCAATAGCGGTTGGGTTTAG    | GCAATGAGACCTGACCACAC   |
| <i>AsCesA17</i> | CACAAGAGATGGTCGGAAG     | GTGGAACAAGGAAATGCC     |
| <i>AsCesA20</i> | GCTCTTGATGGACTACAGGG    | CTTCTTTGTTGCTTGCG      |
| <i>AsCesA21</i> | GCTGGACAGATAACAATGAC    | AGAGCACAAATCCACACTG    |

系为 10  $\mu$ L。反应程序是: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60  $^{\circ}$ C 退火/延伸 40 s (每次循环后采集荧光), 40 个循环后, 55~95  $^{\circ}$ C 做熔解曲线分析, 每个温度以每步 0.5  $^{\circ}$ C 上升, 每个温度停留 10 s。根据熔解曲线判断 RT-PCR 产物的特异性, 相对定量分析采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法进行分析。实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 GraphPad Prism 8 进行统计学分析, 两组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  时认为差异有统计学意义。

**白木香愈伤组织中纤维素含量的测定** 按照试剂盒方法 (BC4280) 测量纤维素含量, 在相应时间点取样经不同非生物胁迫下处理后的愈伤组织, 在室温下阴干, 称取约 0.3 g 样本, 加入 1 mL 80% 甲醇, 室温快速匀浆, 90  $^{\circ}$ C 水浴 20 min, 冷却至室温, 6 000  $\times$ g, 离心 10 min, 弃上清。沉淀先后用 1.5 mL 80% 乙醇和丙酮各洗两遍, 再加入提取液二浸泡 15 h, 离心 10 min, 弃上清, 将沉淀用蒸馏水清洗两遍, 之后干燥沉淀, 得到细胞壁物质。称取烘干的细胞壁物质 5 mg, 加入 0.5 mL 蒸馏水充分匀浆, 用蒸馏水定容至 0.5 mL。将定容后的匀浆液置于冰水混合物中, 缓慢加入 0.75 mL 浓硫酸, 缓慢混匀, 冰水浴中静置 30 min。8 000  $\times$ g, 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min, 取上清液, 用蒸馏水稀释 20 倍后待测。每 300  $\mu$ L 样品加入 70  $\mu$ L 工作液及 630  $\mu$ L 浓硫酸, 混匀, 95  $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 取出后冷却至室温, 测定  $A_{620}^{[22]}$ , 并根据标准曲线计算样品中纤维素含量。

## 结果与分析

### 1 白木香 *AsCesA* 基因家族成员鉴定及理化性质分析

通过本地 BlastP 与 HMM Search 筛选, 将比对出来的 *AsCesA* 基因进行 NCBI-CDD 保守域的结构验证, 最终确定了白木香中基因组中有 21 个 *AsCesA* 基因。白木香 *AsCesA* 基因编码蛋白质的理化性质分析, 结果 (表 2) 显示, 白木香 CesA 蛋白的分子质量在 43.35 kD (*AsCesA6*)~142.58 kD (*AsCesA3*) 之间; 最长的 *AsCesA3* 含有 1 261 个氨基酸残基, 最短的 *AsCesA6* 含有 390 个氨基酸残基; 理论等电点 (pI) 介于 5.67 (*AsCesA9*)~8.86 (*AsCesA16*) 之间, 同时发现 pI < 7 的 CesA 蛋白达

到了 61.9% (13 个)。白木香 *AsCesA* 均含有 6~8 个跨膜结构域, 构成了  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷链穿过质膜进入细胞壁的重要通道<sup>[8]</sup>。

### 2 白木香 *AsCesA* 基因家族系统进化分析

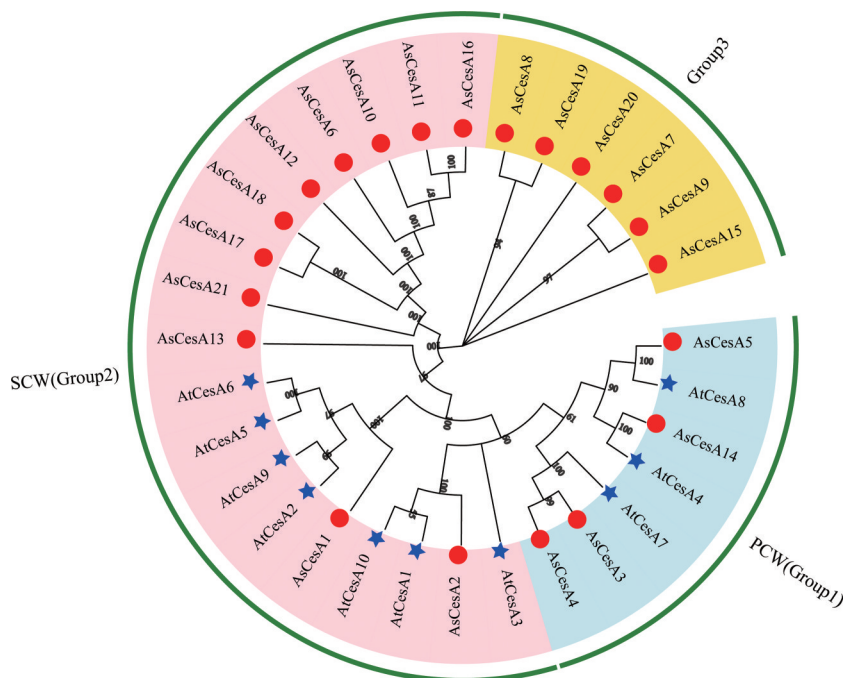
为了研究白木香 *AsCesA* 基因家族成员的分组以及生物功能, 将拟南芥 *AtCesA1*~*AtCesA10* 和 21 个白木香 CesA 蛋白序列进行多序列比对并构建进化树 (图 1)。根据进化树的亲缘关系, 可以将白木香 CesA 分成 3 个亚组, 其亚组 1 包括 *AsCesA3*、*AsCesA4*、*AsCesA5* 和 *AsCesA14*; 亚组 2 包括 *AsCesA1*、*AsCesA2*、*AsCesA6*、*AsCesA10*、*AsCesA11*、*AsCesA12*、*AsCesA13*、*AsCesA16*、*AsCesA17*、*AsCesA18* 和 *AsCesA21*; 亚组 3 包括 *AsCesA7*、*AsCesA8*、*AsCesA9*、*AsCesA15*、*AsCesA19*、*AsCesA20*。由于拟南芥中 *AtCesA4*、*AtCesA7* 和 *AtCesA8* 能调控次生细胞壁中的纤维素生物合成, 而 *AtCesA1*、*AtCesA3* 和 *AtCesA6* 介导合成初生细胞壁的纤维素生物合成, 进化树表明白木香中 *AsCesA5*、*AsCesA14*、*AsCesA3*、*AsCesA4* 与拟南芥 *AtCesA4*、*AtCesA7* 和 *AtCesA8* 归为同一支, 根据相似的蛋白结构可能具有类似的功能<sup>[8]</sup>, 推测白木香 *AsCesA* 亚组 1 可能参与初生细胞壁的生成, 而亚组 2 可能负责次生细胞壁的合成。

### 3 白木香 *AsCesA* 基因保守结构域、染色体定位、启动子序列分析

利用 MEME 在线工具对白木香 *AsCesA* 蛋白序列进行了保守基序分析, 预测出 10 个 motif (图 2)。21 个 *AsCesA* 至少均还有保守基序 motif2、motif6、motif7 和 motif10 (图 3)。*AsCesA1*、*AsCesA3*、*AsCesA4*、*AsCesA5*、*AsCesA7*、*AsCesA8*、*AsCesA9*、*AsCesA13*、*AsCesA14*、*AsCesA15*、*AsCesA18*、*AsCesA19* 和 *AsCesA20* 蛋白均含有 motif1-10。*AsCesA11* 和 *AsCesA16* 所含保守基序相同, 均含有 motif1-6、motif7 和 motif10。根据白木香 *AsCesA* 蛋白序列结构, 在 NCBI-CDD Search 网站提取相关保守结构域信息, 并制作保守结构域图 (图 2)。结果显示, 每个 *AsCesA* 基因都含有一个相同的保守结构域 cellulose-synt, 并且大部分都存在于 C-端。

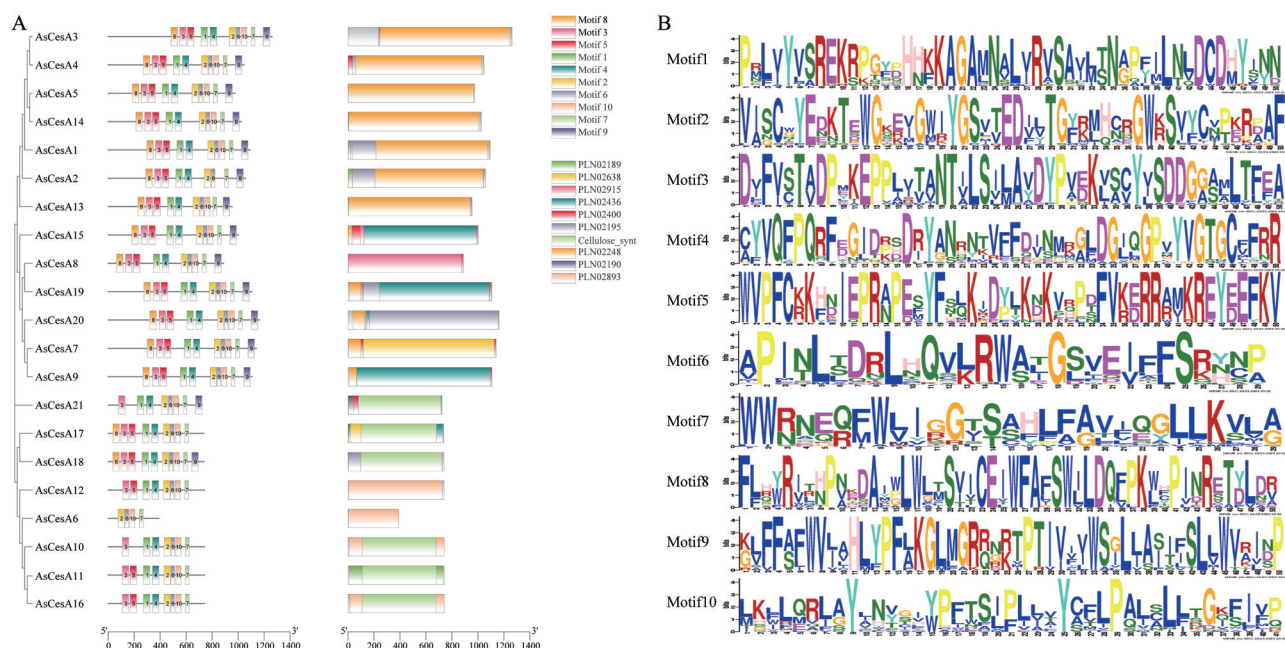
**Table 2** Analysis of the physico-chemical properties of *AsCesA* family gene in *Aquilaria sinensis*. GRAVY: Grand average of hydrophobicity

| Protein ID | Molecular weight/kD | Protein isoelectric | Number of amino acid | Aliphatic index | GRAVY  | Transmembrane domain number | Subcellular localization |
|------------|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------|--------|-----------------------------|--------------------------|
| AsCesA1    | 123.19              | 6.59                | 1 094                | 85.33           | -0.224 | 8                           | Plas                     |
| AsCesA2    | 119.11              | 6.38                | 1 058                | 85.32           | -0.227 | 6                           | Plas                     |
| AsCesA3    | 142.58              | 6.82                | 1 261                | 82.41           | -0.297 | 8                           | Plas                     |
| AsCesA4    | 118.19              | 6.36                | 1 046                | 82.75           | -0.191 | 8                           | Plas                     |
| AsCesA5    | 109.57              | 6.23                | 974                  | 87.77           | -0.097 | 6                           | Plas                     |
| AsCesA6    | 43.35               | 6.00                | 390                  | 97.79           | -0.261 | 6                           | Plas                     |
| AsCesA7    | 127.71              | 6.76                | 1 140                | 83.49           | -0.204 | 6                           | Plas                     |
| AsCesA8    | 100.35              | 5.93                | 888                  | 87.96           | -0.121 | 8                           | Plas                     |
| AsCesA9    | 124.04              | 5.67                | 1 108                | 82.29           | -0.201 | 8                           | Plas                     |
| AsCesA10   | 83.74               | 6.74                | 742                  | 89.91           | 0.034  | 7                           | Plas                     |
| AsCesA11   | 83.65               | 8.83                | 742                  | 92.67           | 0.070  | 8                           | Plas                     |
| AsCesA12   | 82.80               | 7.87                | 740                  | 88.32           | 0.118  | 7                           | Plas                     |
| AsCesA13   | 108.70              | 7.44                | 954                  | 89.17           | -0.138 | 8                           | Plas                     |
| AsCesA14   | 116.65              | 8.03                | 1 026                | 81.88           | -0.252 | 8                           | Plas                     |
| AsCesA15   | 113.04              | 8.26                | 1 002                | 79.79           | -0.266 | 6                           | Plas                     |
| AsCesA16   | 84.56               | 8.86                | 742                  | 94.64           | 0.093  | 8                           | Plas                     |
| AsCesA17   | 83.74               | 6.46                | 737                  | 85.47           | -0.034 | 8                           | Plas                     |
| AsCesA18   | 84.51               | 6.80                | 739                  | 85.64           | -0.097 | 8                           | Plas                     |
| AsCesA19   | 124.14              | 6.33                | 1 107                | 82.57           | -0.187 | 8                           | Plas                     |
| AsCesA20   | 129.91              | 8.64                | 1 164                | 83.04           | -0.188 | 6                           | Plas                     |
| AsCesA21   | 80.43               | 8.62                | 724                  | 89.24           | 0.040  | 7                           | Plas                     |

**Figure 1** Evolutionary analysis of CesA proteins in *Aquilaria sinensis* and *Arabidopsis thaliana*. Blue star represents CesA proteins in *A. thaliana*; red point represents CesA proteins in *A. sinensis*

对 21 条白木香 *AsCesA* 氨基酸序列进行多序列比对<sup>[23]</sup>, 发现了纤维素合酶家族中特征且极为保守的功能结构域 D、DXD (图 3A) 和 QXXRW (图 3B), 而白木香中大部分 *AsCesA* 蛋白均存在这些功能域, 如在 motif6 中均含有 D...QXXRW 结构域, 这与报道的拟南芥 *AtCesA* 蛋白相同<sup>[24]</sup>。

根据白木香基因组注释的染色体定位信息, 将 21 个 *AsCesA* 基因进行染色体信息可视化分析, 结果 (图 4A) 显示, 鉴定到的白木香 *AsCesA* 基因全部都不均等地分布在 1~8 号染色体上。其中 2 号染色体上含有的基因数最多, 共 5 个 *AsCesA* 基因, 3 号和 5 号染色体上含有的基因数最少, 仅 1 个 *AsCesA*。启动子区域



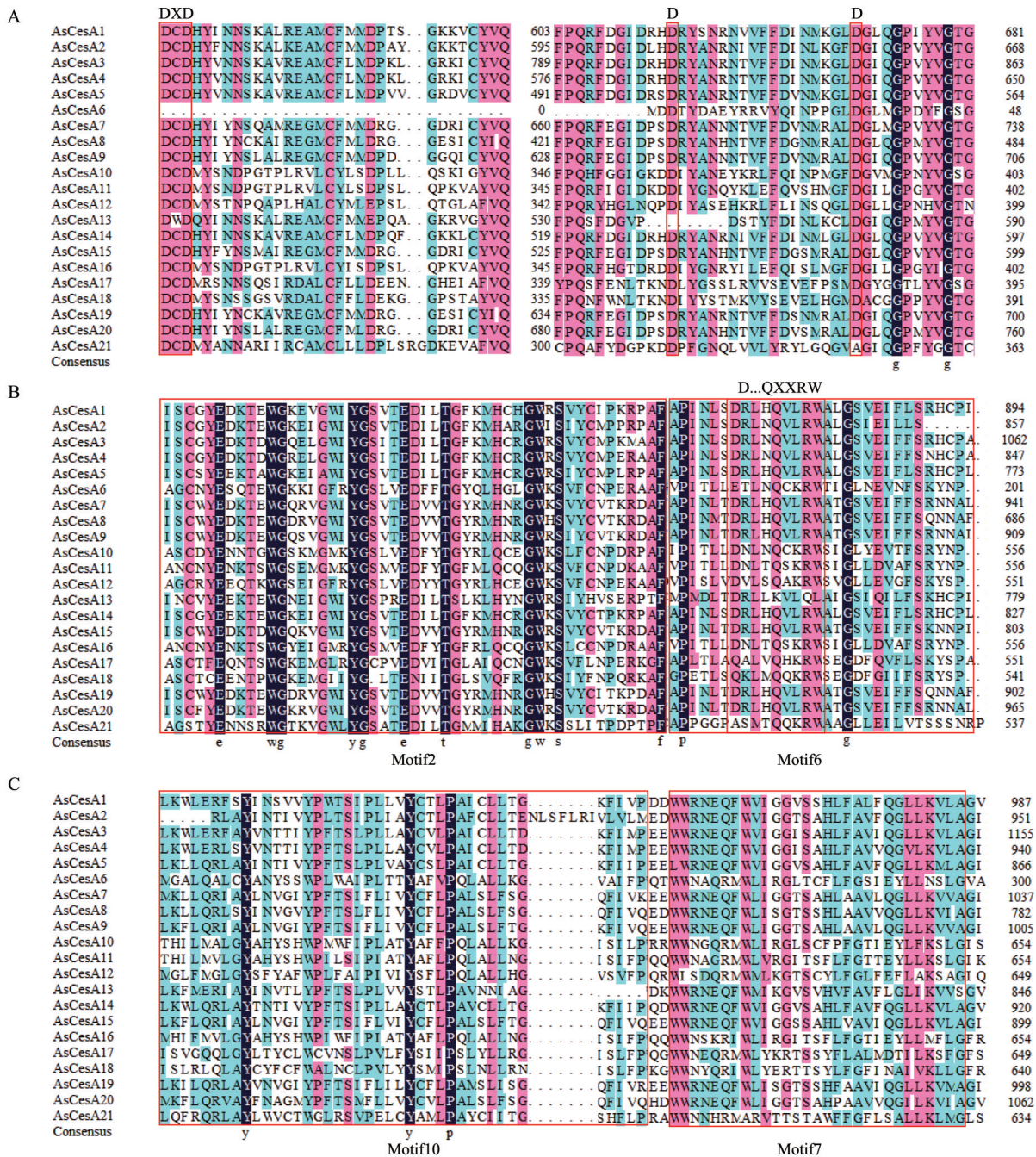
**Figure 2** Conserved protein motifs and conserved domains of the *AsCesA* genes of *A. sinensis*. A: The motifs and conserved domains of the *AsCesA* proteins; B: Ten conserved motifs of the *AsCesA* proteins

的顺式作用元件能很大程度上影响基因的表达模式。通过提取 21 条 *AsCesA* 基因上游 2 000 bp 的碱基序列, 对其顺式作用元件进行了预测。21 条 *AsCesA* 基因共预测出 26 种顺式作用元件。其中, 除一般元件外, 与植物生长发育相关的顺式作用元件包括光响应元件、厌氧诱导相关的顺式作用元件、细胞周期相关的顺式作用元件、昼夜节律相关的顺式作用元件和锌代谢调控相关元件等, 与植物生物与非生物胁迫的包括低温反应元件、干旱诱导的 MYB 结合位点、参与植物防御和胁迫的元件、伤口反应元件等。此外, 还预测出与脱落酸、茉莉酸甲酯、生长素、水杨酸和赤霉素等植物激素相关的顺式作用元件。

#### 4 *AsCesA* 基因在不同非生物胁迫诱导下的表达分析

为验证白木香 *AsCesA* 基因在植物防御反应中的作用, 对 NaCl 诱导不同时刻的白木香愈伤组织进行转录组分析, 选择了 7 个表达量较高或具有差异表达的 *AsCesA* (图 5) 并分析其在非生物胁迫下的表达量变化。对正常培养的白木香愈伤组织分别进行盐、干旱、低温及重金属处理, 以 0 h 处理的白木香愈伤组织样品为对照, 不同时间点取样提取 RNA 后进行实时荧光定量 PCR 分析, 检测 *AsCesA1*、*AsCesA2*、*AsCesA3*、*AsCesA7*、*AsCesA17*、*AsCesA20* 和 *AsCesA21* 的表达水平。从图 6 中可知盐胁迫、低温胁迫、干旱胁迫和重金属胁迫均能够不同程度影响 *AsCesA* 基因的表达。盐胁迫对 *AsCesA* 基因的表达影响较为一致, 与对照组相比均呈不同程度下降的趋势, 与转录组数据基本吻合。具体而言,

NaCl 处理 48 h 后 *AsCesA1*、*AsCesA2* 和 *AsCesA3* 的表达水平达到了最低, 分别是对照组的 21.66%、30.73% 和 27.91%。而 *AsCesA7* 和 *AsCesA20* 分别在 NaCl 处理 24 和 36 h 时表达量最低, 仅为各自对照组的 44.44% 和 30.76%。*AsCesA17* 仅在盐胁迫初期表达量显著升高, 而在 24~48 h 内变化与对照组相比没有显著差异。*AsCesA21* 对盐胁迫不敏感, 在 NaCl 处理 48 h 内均没有明显变化。*AsCesA1*、*AsCesA2*、*AsCesA3* 和 *AsCesA20* 对重金属胁迫响应较强烈, 且趋势较为一致, 在处理 48 h 后表达水平显著升高。此外, PEG6000 模拟的干旱胁迫对 7 个 *AsCesA* 表达量也均有不同程度的影响, *AsCesA1*、*AsCesA2*、*AsCesA3*、*AsCesA17* 在处理 48 h 内与对照组相比, 表达量均显著下降, 而 *AsCesA20* 在 PEG6000 胁迫 48 h 内表达量呈现出先降低又升高再下降的趋势。*AsCesA7* 和 *AsCesA21* 对 PEG6000 的胁迫在初期不甚敏感, 仅在处理后 24 h 后开始变化, 前者是先在 36 h 有所升高而后在 48 h 时逐渐降低, 而后者则随着时间变化表达量逐渐升高, 并在处理 36 h 达到了峰值。低温对 *AsCesA* 基因的表达量影响趋势不同。*AsCesA1*、*AsCesA7*、*AsCesA17*、*AsCesA21* 在低温诱导 24 h 内表达量显著下调, 而在 36~48 h 内呈现出先上升后下降的表达水平, 并均在 36 h 时表达量最高, 为对照组的 1.82、3.09、3.30 和 7.74 倍。而 *AsCesA2*、*AsCesA3*、*AsCesA20* 在低温诱导 48 h 内表达量均显著低于对照组, 且表达量随着时间变化不明显。综上结果表明, 盐、低温、干旱和重金属胁迫均能在不同程度上影响白木



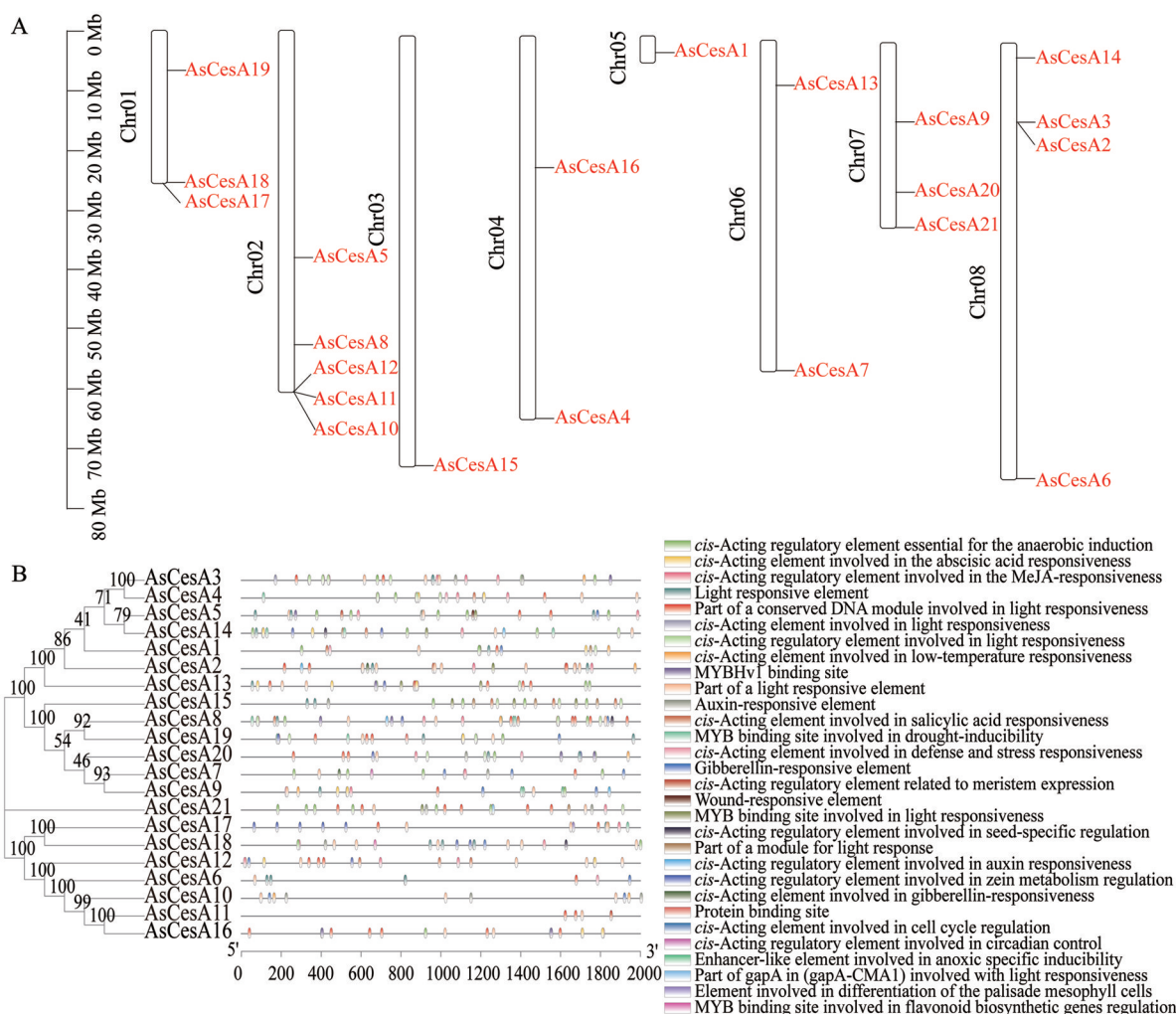
**Figure 3** The conserved functional domain analysis of *AsCesA* family genes in *A. sinensis*. A: The DXD and D conserved sequence in *AsCesA* proteins; B: The D...QXXRW conserved sequence, motif2 and motif6 in *AsCesA* proteins; C: The motif 7 and motif 10 in *AsCesA* proteins

香愈伤组织中 *AsCesA1*、*AsCesA2*、*AsCesA3*、*AsCesA7*、*AsCesA17*、*AsCesA20*、*AsCesA21* 基因的表达水平。

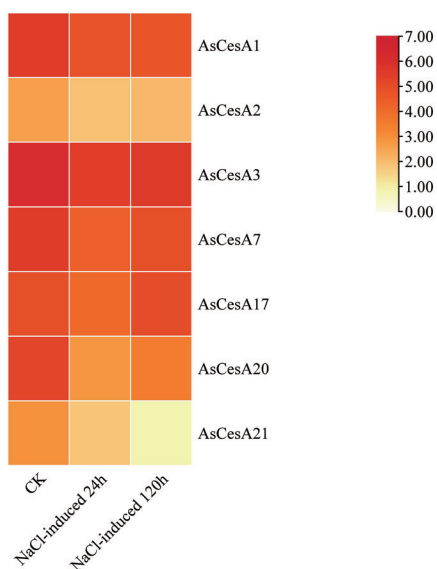
### 5 不同非生物胁迫影响白木香纤维素含量

为检测白木香在植物防御反应中的纤维素含量变化,对正常培养的白木香愈伤组织分别进行盐、干旱、低温及重金属处理。以0 h处理的白木香愈伤组织样品为对照,不同时间点取样提取愈伤组织中的纤维素。重金属、盐胁迫和低温胁迫下,白木香愈伤组织中纤维

素含量在24 h内逐渐降低,分别是对照组含量的56.56%、50.11%和50.11%,在之后的12 h内又逐渐上升,处理36 h重金属胁迫时纤维素含量甚至略高于对照组,而盐胁迫和低温胁迫仍远低于对照组含量(图7)。其中,重金属和盐胁迫下,白木香愈伤组织的纤维素含量下降较为急剧,推测是这两种非生物胁迫对于其纤维素合酶表达量影响较大,而低温胁迫下纤维素含量在0~12 h内变化浮动较小,在12~48 h时含量变



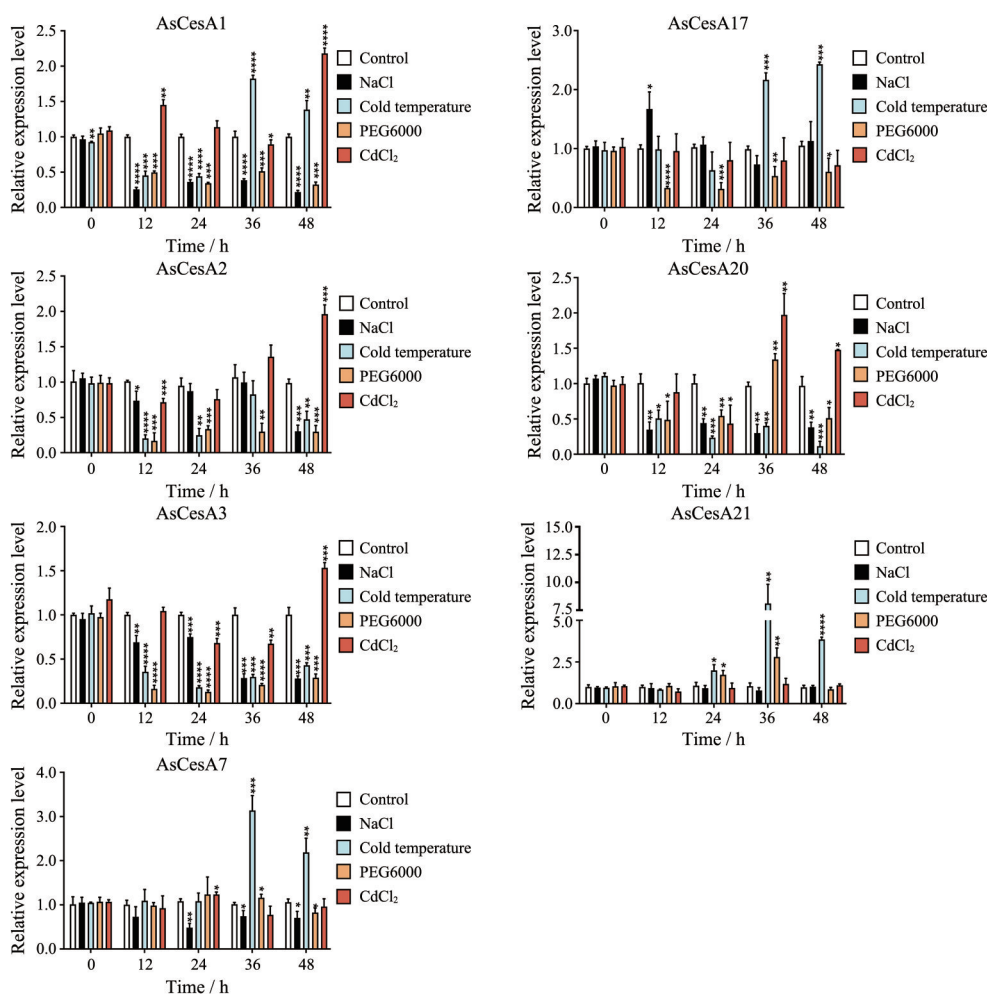
**Figure 4** Chromosome loci and *cis*-acting elements of *AsCesA* genes in *A. sinensis*. A: The distribution of members of the *AsCesA* family on chromosomes; B: *cis*-Acting elements of *AsCesA* genes in *A. sinensis*



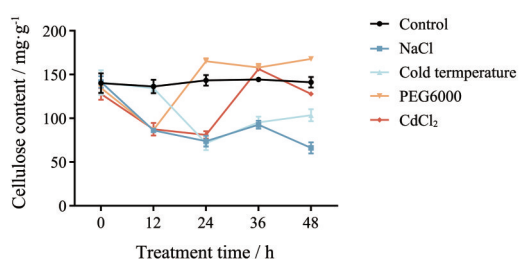
**Figure 5** Heatmap of fragments per kilobase of exon model per million mapped reads (FPKM) of *AsCesA* genes at different times in *A. sinensis* calli

化明显。干旱胁迫处理 48 h 内对白木香愈伤组织纤维素含量影响与上述三者稍有不同。在干旱胁迫 12 h 内, 纤维素含量急剧下降, 并达到了最低, 为对照组的 63.72%。而在 12~24 h 内急剧增加, 在 24~48 h 又出现一定程度的波动, 其中在干旱胁迫 24 和 48 h 时纤维素含量略高于对照组。

由纤维素合酶基因在不同非生物胁迫下的表达差异和纤维素含量变化的相关性分析可知, 盐胁迫 48 h 内, 7 个纤维素合酶表达量均显著下调, 共同导致纤维素含量显著下调, 且 *AsCesA1*、*AsCesA7* 和 *AsCesA20* 对于盐胁迫下纤维素含量变化影响程度较大(图 6、7)。在低温诱导 24 h 内, *AsCesA1*、*AsCesA2*、*AsCesA3*、*AsCesA17*、*AsCesA20* 表达量显著下调, 而在 36~48 h 内呈现出先上升后下降的表达水平, 并均在 36 h 时表达量最高, 共同导致白木香愈伤组织中纤维素含量先下降后上升, 且 *AsCesA3*、*AsCesA20* 对于低温胁迫下的纤维素含量



**Figure 6** Relative expression level of *AsCesA* genes under different abiotic stresses in *A. sinensis* calli. Repeat 3 samples, each for 3 times.  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs control group



**Figure 7** Changes of cellulose content under different abiotic stresses in *A. sinensis* calli

变化贡献较大(图6、7)。干旱胁迫48 h内, *AsCesA1*、*AsCesA2*、*AsCesA3*、*AsCesA17*表达量均显著下降且低于对照组, 而*AsCesA20*和*AsCesA21*在处理36 h后表达显著上升, 推测白木香愈伤组织在干旱胁迫初期主要是受*AsCesA1*、*AsCesA2*、*AsCesA3*、*AsCesA17*的影响, 而在后期主要受*AsCesA20*和*AsCesA21*的影响, 因此纤维素含量才出现先下降后上升的变化(图6、7)。*AsCesA1*、*AsCesA2*、*AsCesA3*和*AsCesA20*对重金属胁迫

响应较强烈, 前期诱导24 h表达下调, 而处理36或48 h后表达水平显著升高且远高于对照组, 因此导致纤维素含量在重金属诱导呈现出先下降后上升的变化趋势(图6、7)。

## 讨论

纤维素合酶是纤维素生物合成中的一类关键酶, 其在植物生长发育、形态结构调控及植物防御反应中起到重要的作用<sup>[25]</sup>。作为植物生长发育和非生物胁迫响应过程中的一个重要的基因家族, 纤维素合酶截至目前已经在拟南芥<sup>[7]</sup>、棉花<sup>[26]</sup>、烟草<sup>[8]</sup>、豹皮樟<sup>[27]</sup>、番茄<sup>[28]</sup>、黄秋葵<sup>[29]</sup>等经济作物中得以广泛鉴定, 而在药用植物白木香中还未曾有报道。本研究利用白木香基因组数据库, 通过生物信息学手段, 系统分析鉴定了白木香中21个*CesA*基因, 进行蛋白理化特性分析, 进化树分析, 蛋白保守基序、染色体定位、启动子区域分析, 非生物胁迫下表达量分析, 为后续研究纤维素合酶在白

木香防御反应过程中的作用奠定基础。

蛋白的亚细胞定位是其发挥功能的主要场所,根据亚细胞定位预测,白木香中21个*AsCesA*均定位于质膜上。一般情况下植物纤维素合酶共有8个跨膜结构域,N端有2个,C端有6个, $\beta$ -1,4葡萄糖苷链会通过细胞质膜的跨膜结构域穿过细胞壁进而合成纤维素<sup>[30]</sup>。而本文中鉴定的21个白木香*AsCesA*大部分均具有8个跨膜结构域,而*AsCesA2*、5、6、7、15含有6个跨膜结构域,*AsCesA7*、12、21含有7个跨膜结构域,这与烟草中报道的纤维素合酶一致<sup>[8]</sup>,*Xu*等<sup>[8]</sup>还通过比较含有不同跨膜结构域的烟草纤维素合酶在不同发育阶段的烟草组织中的表达量,发现含有6个跨膜结构域的*NtCesA16*主要在成熟期烟草的茎和叶脉中表达,而含有8个跨膜结构域的*NtCesA19*主要在幼苗期烟草的叶和叶脉中表达,因而推测跨膜结构域的数量可能通过影响纤维素合成进而决定细胞壁的类型。因此,本文中鉴定的白木香中纤维素合酶具有不同的跨膜结构域,其在不同组织中的表达量和在纤维素生物合成中的功能有待进一步研究。与拟南芥10个*AtCesA*共同构建进化树,系统发育分析将白木香*AsCesA*蛋白分成3个进化分支。拟南芥中*AtCesA4*、*AtCesA7*、*AtCesA8*主要负责次生细胞壁中的纤维素的生物合成,而*AtCesA1*、*AtCesA3*和*AtCesA6*介导合成初生细胞壁的纤维素。进化树分析表明,白木香*AsCesA*亚组1与*AtCesA4*、*AtCesA7*、*AtCesA8*聚为一支,可能参与初生细胞壁中纤维素的生物合成;亚组2与*AtCesA1*、*AtCesA3*和*AtCesA6*亲缘关系比较近,可能参与次生细胞壁中纤维素的生物合成。

蛋白保守结构域决定了蛋白独有的功能。保守基序分析表明,不同*AsCesA*的motif组成有一定差异,但均含有motif2、motif6、motif7和motif10,推测这4个基序是白木香纤维素合酶发挥功能的必需的。保守结构域预测结果表明,白木香21个*AsCesA*蛋白中大多数均含有保守的DDD-QXXRW氨基酸残基序列,其可以在蛋白质折叠形成三级结构时在空间上相互接近,形成一个葡萄糖链的分泌通道<sup>[8]</sup>。

纤维素合酶家族在植物防御反应过程中起到重要的作用。如拟南芥中*AtCesA6*和*AtCesA1*和西兰花中的*BoiCesA*基因参与响应盐胁迫<sup>[14,15]</sup>;低温能够减少在杨树和棉花中*CesA*基因的表达<sup>[16]</sup>;中间锦鸡儿*CiCesA8*能够响应干旱胁迫<sup>[11]</sup>等。顺式作用元件分析的结果表明,*AsCesA*基因家族具有参与植物激素响应、非生物胁迫反应和生长发育相关的顺式作用元件。白木香在面对诸如昆虫咬食、雷电等自然灾害或物理化学刺激的胁迫时会在木质部形成沉香<sup>[1]</sup>,说明白木香形成沉

香过程中,植物的防御反应可能起到重要的作用,因此研究植物的防御反应有利于全面揭示沉香结香机制。细胞壁作为细胞与环境相互作用的中介,在非生物胁迫下细胞壁的形态、种类甚至结构的变化对于植物的发育及环境胁迫的适应尤为重要。因此,本文进一步对白木香中纤维素合酶基因响应非生物胁迫进行了研究。对NaCl诱导不同时刻的白木香愈伤组织的转录组测序结果进行分析,选择了7个具有差异表达的*AsCesA*并分析其在非生物胁迫下的表达量变化,实时荧光定量PCR结果表明,盐、低温、干旱和重金属胁迫均能不同程度影响白木香中*AsCesA*基因的表达水平。盐胁迫对*AsCesA*基因的表达影响较为一致,诱导48 h内基因表达均呈不同程度下调。具体而言,NaCl处理48 h后*AsCesA1*、*AsCesA2*和*AsCesA3*的表达水平达到了最低,而*AsCesA7*和*AsCesA20*分别在NaCl处理24和36 h表达量最低。*AsCesA17*仅在盐胁迫初期表达量显著升高。*AsCesA21*对盐胁迫不敏感,在NaCl处理48 h内均没有明显变化。*AsCesA1*、*AsCesA2*、*AsCesA3*和*AsCesA21*对重金属胁迫响应较强烈,在处理48 h后表达水平显著升高。此外,对于PEG6000模拟的干旱胁迫,*AsCesA1*、*AsCesA2*、*AsCesA3*、*AsCesA17*在处理48 h内表达量均显著下降,而*AsCesA20*表达量出现显著波动。*AsCesA7*和*AsCesA21*对干旱胁迫在初期不甚敏感,仅在处理后24 h后开始小幅变化。低温对*AsCesA*基因的表达量影响趋势不同。*AsCesA1*、*AsCesA7*、*AsCesA17*、*AsCesA21*在低温诱导24 h内表达量显著下调,而后出现波动,并均在36 h时表达量最高。而*AsCesA2*、*AsCesA3*、*AsCesA20*在低温诱导48 h内表达量显著降低,但随着时间变化不明显。其中*AsCesA1*、*AsCesA3*和*AsCesA20*均能响应低温、盐胁迫、干旱胁迫和重金属胁迫,推测这3个基因可能在白木香响应非生物胁迫中发挥重要作用。为进一步验证白木香中纤维素合酶的表达变化对纤维素含量的影响,本研究检测了不同外源非生物胁迫下白木香愈伤组织中纤维素含量的变化。结果表明,白木香愈伤组织中纤维素含量变化与纤维素合酶的表达量趋势基本一致。综上,盐、干旱、低温胁迫及重金属胁迫均能不同程度上影响*AsCesA*基因的表达丰度,进而影响纤维素含量水平。结合顺式作用元件分析,白木香纤维素合酶可能通过不同的机制响应外源非生物胁迫,进而影响纤维素的生物合成以影响植物细胞壁的种类、密度及弹性等理化性质,从而以更加适应外界环境。

综上所述,本研究基于白木香基因组数据库,分析鉴定了白木香中21个*CesA*基因,预测出*AsCesA*蛋白均定位于质膜上;系统发育分析表明*AsCesA*共分为3个

亚组; AsCesA 的 motif 组成有一定差异, 均含有 motif2、motif6、motif7、motif10。通过盐胁迫下愈伤组织转录组数据筛选了 7 个可能参与植物防御反应的 *CesA* 基因, 发现盐、干旱、低温及重金属胁迫能够不同程度诱导这些基因的表达, 进而影响纤维素的含量。这些研究结果为进一步探索 *AsCesA* 基因家族在白木香响应非生物胁迫调节中的作用奠定基础。

**作者贡献:** 米芯雨负责白木香纤维素合酶 *AsCesA* 基因的挖掘、表达分析及论文初稿撰写; 邱海玲负责白木香 *AsCesA* 基因的实时荧光定量 PCR 数据分析; 关范圆和郑语嫣负责 *AsCesA* 基因生物信息学分析; 史社坡、王晓晖负责论文思路设计、指导实验、论文撰写与修改。所有作者参与论文修改。

**利益冲突:** 无相关利益冲突。

## References

- Chen X, Hao HQ, Peng L. Recent progresses on cellulose synthesis in cell wall of plants [J]. *J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报)*, 2011, 19: 283-290.
- Wei JH, Song YR. Advances of studies on plant cellulose synthase [J]. *Chin Bull Bot (植物学通报)*, 2002, 19: 641-649.
- Saxena I M, Brown R J. Identification of a second cellulose synthase gene (*acsAII*) in *Acetobacter xylinum* [J]. *J Bacteriol*, 1995, 177: 5276-5283.
- Pear J R, Kawagoe Y, Schreckengost W E, et al. Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 12637-12642.
- Liu CB, Xue YC, Nie HZ. Cellulose synthase superfamily in higher plants [J]. *Chem Life (生命的化学)*, 2007, 27: 533-535.
- Kumar M, Turner S. Plant cellulose synthesis: CESA proteins crossing kingdoms [J]. *Phytochem*, 2015, 112: 91-99.
- Endler A, Persson S. Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2011, 4: 199-211.
- Xu ZC, Kong YZ. Genome-wide identification, subcellular localization and gene expression analysis of the members of *CESA* gene family in common tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. *Hereditas (遗传)*, 2017, 39: 512-524.
- Sun MD. Characterization of *CesAs* Involved in Cellulose Biosynthesis of Primary Cell Walls in Plants (植物初生细胞壁 *CesAs* 基因的功能分析) [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018.
- Kang C, Zhao XF, Wang P, et al. Identification of *CsCesA* gene family in *Cucumis sativus* L. and analysis of abiotic stress [J]. *China Veget (中国蔬菜)*, 2022, 3: 29-41.
- Chai WJ. Identification and Functional Analysis of *R2R3-MYB* Gene Family Members and *CiCesAs* from *Caragana intermedia* (中间锦鸡儿 *R2R3-MYB* 基因家族成员和 *CiCesAs* 基因的鉴定与功能分析) [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- Wang M. Study on the Response Mechanism of Tomato Cell Wall Polysaccharides Under Cadmium Stress (镉胁迫下番茄细胞壁多糖的响应机制研究) [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2022.
- Chen Z, Hong X, Zhang H, et al. Disruption of the cellulose synthase gene, *AtCesA8/IRX1*, enhances drought and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2005, 43: 273-283.
- Zhang S S, Sun L, Dong X, et al. Cellulose synthesis genes *CESA6* and *CSII* are important for salt stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2016, 58: 623-626.
- Li S, Zhang L, Wang Y, et al. Knockdown of a cellulose synthase gene *BoiCesA* affects the leaf anatomy, cellulose content and salt tolerance in broccoli [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41397.
- Wang T, McFarlane H E, Persson S. The impact of abiotic factors on cellulose synthesis [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67: 543-552.
- Yuan HW, Zhao JP, Liu YB, et al. Advance in studies on chemical constituents, pharmacology and quality control of *Aquilaria sinensis* [J]. *Dig Chin Med*, 2018, 1: 316-330.
- Lin D, Yan HJ, Li L, et al. Advances in research on chemical constituents and genetic diversity of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2017, 26: 2204-2208.
- Ding, XP, Mei, WL, Lin, Q, et al. Genome sequence of the agarwood tree *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng: the first chromosome-level draft genome in the *Thymelaeaceae* family [J]. *GigaScience*, 2020, 9: g10013.
- Gao BW, Rong YQ, Li TZ, et al. Identification and expression analysis of three *G6PDH* genes from *Aquilaria sinensis* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2216-2225.
- Gao Z H, Wei J H, Yang Y, et al. Selection and validation of reference genes for studying stress-related agarwood formation of *Aquilaria sinensis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31: 1759-1768.
- Hao QQ. Functional Characterization of Transcription Factors *PmMYB1* and *PmMYB6* in Lignin Biosynthesis of *Pinus massoniana* (马尾松转录因子 *PmMYB1* 和 *PmMYB6* 在木质素生物合成中的功能研究) [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2022.
- Zhang XZ, Kang TY, Bao R, et al. Identification and expression analysis of cellulose synthase (*CesA/CsI*) gene superfamily members in peach (*Prunus persica*) [J]. *J Agric Biotechnol (农业生物技术学报)*, 2022, 30: 1096-1111.
- Delmer DP. Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 245-276.
- Polko JK, Kieber JJ. The regulation of cellulose biosynthesis in plants [J]. *Plant Cell*, 2019, 31: 282-296.
- Zhang SJ, Jiang ZX, Chen J, et al. The cellulose synthase (*CesA*) gene family in four *Gossypium* species: phylogenetics, sequence variation and gene expression in relation to fiber quality in

- upland cotton [J]. *Mol Genet Genomics*, 2021, 296: 355-368.
- [27] Yao XZ, Li QQ, Zhang BH, et al. Identification and expression analysis of cellulose synthase gene family in *Litsea coreana* var. *sinensis* [J]. *Seed (种子)*, 2022, 41: 41-47.
- [28] Song XM, Xu L, Yu JW, et al. Genome-wide characterization of the cellulose synthase gene superfamily in *Solanum lycopersicwn* [J]. *Gene*, 2019, 688: 71-83.
- [29] Li YP, Chen MD, Liu JT, et al. Identification and expression analysis of *CESA* gene family in *Hibiscus esculentus* [J]. *Acta Horti Sin (园艺学报)*, 2022, 49: 73-85.
- [30] Ren J, Yin YQ, Zhang HH, et al. Cloning and analysis of *AmCesA1* gene in *Acacia mangium* [J]. *Sci Silv Sin (林业科学)*, 2018, 54: 79-87.
- [31] Yu M, Hou WC, Feng J, et al. Comparative analysis of chemical constituents between the agarwood produced by whole-tree agarwood-inducing technique and natural agarwood based on the combination of non-targeted metabolomics and fingerprint [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 53: 5625-5635.