



大豆 *Glyma04G227700* 生物信息学分析及与 *Glyma08G11030* 互作研究

罗 飞¹, 刘 灿¹, 于月华², 倪志勇¹

(1. 新疆农业大学 生命科学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆农业大学 农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要: 咖啡酸-O-甲基转移酶 (caffeic acid-O-methyltransferase, COMT) 是一种催化苯丙素类化合物羟基上氧原子的甲基化酶。前期研究表明, 大豆抵御干旱胁迫的 F-box 基因 *Glyma08G11030* 编码蛋白可能与 COMT 蛋白 *Glyma04G227700* 发生互作, 为了预测分析大豆 COMT 基因 *Glyma04G227700* 的功能及二者的互作关系, 本研究克隆 *Glyma04G227700* 基因, 并对其进行生物信息学分析, 通过实时荧光定量检测方法分析其在大豆不同组织中的表达情况, 并利用酵母双杂交系统验证蛋白互作情况。结果显示: *Glyma04G227700* 基因全长 1 095 bp, 编码 366 个氨基酸, 与野大豆 (RZC17879.1 *Glycine soja*) 亲缘关系较近。 *Glyma04G227700* 在大豆的根、茎、叶、子叶中都有表达, 且在根和茎中表达量较高, 在子叶中表达量最低。酵母双杂结果表明 *Glyma08G11030* 与 *Glyma04G227700* 蛋白不存在互作。

关键词: 大豆; 咖啡酸-O-甲基转移酶 (COMT); *Glyma04G227700*; 基因克隆; 生物信息学分析; 酵母双杂; *Glyma08G11030*

Bioinformatics Analysis of Soybean *Glyma04G227700* and Studies of Interaction with *Glyma08G11030*

LUO Fei¹, LIU Can¹, YU Yue-hua², NI Zhi-yong¹

(1. College of Life Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: Caffeic acid-O-methyltransferase (COMT) is a kind of enzyme that catalyzes oxygen atom on hydroxyl group of phenylpropanoid compounds. Previous studies had shown that F-box gene *Glyma08G11030* encoding protein of soybean drought stress resistance gene may interact with COMT protein *Glyma04G227700*. In order to predict and analyze the function of soybean COMT gene *Glyma04G227700* and the interaction between them. In this study, we cloned *Glyma04G227700* gene and analyzed it by bioinformatics method. And then we analyzed the expression of *Glyma04G227700* gene in different soybean tissues by real-time fluorescence quantitative detection method, and verified the protein interaction by yeast two-hybrid system. The results showed that the total length of *Glyma04G227700* gene was 1 095 bp, encoding 366 amino acids, and it was closely related to the wild soybean (RZC17879.1 *Glycine Soja*). *Glyma04G227700* was expressed in the root, stem, leaf and cotyledon of soybean, and the expression level was higher in root and stem, and the lowest in cotyledon. There was no interaction between *Glyma08G11030* and *Glyma04G227700* in yeast double hybrid results.

Keywords: soybean; caffeic acid-O-methyltransferase (COMT); *Glyma04G227700*; gene cloning; bioinformatics analysis; yeast two-hybrid; *Glyma08G11030*

木质素在植物中是一类从类苯丙酸途径的单体中衍生形成的重要大分子有机物, 主要存在于输导组织之中, 但在植物的根、茎、叶、果实以及木栓层的细胞壁中都有分布。木质素主要由 3 种木质醇单体 (monolignols) 聚合而成, 3 种木质醇单体均为苯丙烷类衍生的类苯丙酸化合物, 分别是肉桂醇 (P-coumaryl alcohol)、松柏醇 (coniferyl alcohol) 和芥子醇 (sinapyl alcohol)。根据单体类型, 将木质素分为 S-木质素、H-木质素以及 G-木质素 3 种类型^[1]。咖啡酸-O-甲基转移酶 (caffeic acid-O-methyltransferase, COMT) 是木质素合成过程中的关

键酶之一, 在苯丙氨酸途径中, COMT 催化咖啡酸、5-羟基松柏醛和 5-羟基松柏醇甲基化分别生成阿魏酸、芥子醛和芥子醇, 参与 S-木质素的合成^[2]。Southern 杂交表明大豆 COMT 基因为多基因家族, 其基因的长度范围为 1 000 ~ 2 000 bp, 其酶的氨基酸数目大致为 300 ~ 400, COMT 蛋白大小为 40 kDa 左右^[3]。大豆 COMT 蛋白氨基酸序列从 N 端到 C 端, 共存在 5 个序列保守区, 分别为 LVDGGGxG、GINFDLPHV、EHVGGDMF、NGKVI 和 GKKERT^[4-5]。5 个保守区共包含 36 个氨基酸残基, 靠近 C 端的 3 个保守区富含甘氨酸残基, 其中 LVDGGGxG 和

收稿日期: 2022-09-13

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2021D01A93)。

第一作者: 罗飞 (1999—), 男, 硕士研究生, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: 1002724468@qq.com。

通讯作者: 倪志勇 (1981—), 男, 博士, 教授, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: nizhiyong@126.com;

于月华 (1981—), 女, 博士, 高级实验师, 主要从事作物抗逆分子育种研究。E-mail: yuyuehua1213@sina.com。

NGKVI 保守区被认为是 SAM 和金属离子 Mg^{2+} 的结合部位^[6-7]。

作为木质素单体合成途径的关键酶,COMT 主要控制 S-木质素的合成从而影响着 S/G 的含量,S/G 比值升高会对植物的生长产生不良影响,如生长停滞、花畸形、次生木质部细胞壁变薄、抵御病害能力下降等^[8]。已有大量关于 COMT 基因的研究,如在玉米^[9]、烟草^[10]、高羊茅^[11] 和苏丹草^[12] 等多种植物中,COMT 基因突变或者表达下调会导致木质素含量显著下降,植株抗倒性降低。在橡树遭遇割胶(非生物胁迫)时,橡树 *HbCOMT1* 基因表达量明显上升^[13]。番茄植株中 COMT 基因过量表达后,其在干旱胁迫的光合作用和抗氧化能力提高^[14-15]。同时有研究显示过表达 COMT 植物的木质素含量增加,且木质素组成改变,从而植物在干旱胁迫的适应能力提高^[16]。由此可见 COMT 基因对植物抗逆反应发挥着极其重要的作用,而大豆 COMT 基因的研究目前较为缺乏,仅有关于改变木质素含量从而提高大豆抗倒伏性的研究^[17]。探究大豆 COMT 编码基因 *Glyma04G227700* 的功能将对提高大豆抵御胁迫能力具有重要意义。

本研究克隆大豆 COMT 基因 *Glyma04G227700*, 利用生物信息学与实时定量荧光 PCR 方法分析该基因特征及其在不同组织中的表达量。本课题组前期对大豆抵御干旱胁迫 F-box 基因 *Glyma08G11030*^[18] 进行研究,利用酵母双杂交系统从大豆 cDNA 文库中筛选互作蛋白,发现 *Glyma04G227700* 为可能与 *Glyma08G11030* 蛋白发生互作的蛋白,本研究进一步采用酵母双杂交系统验证 *Glyma04G227700* 和 *Glyma08G11030* 蛋白是否存在互作关系,旨在为进一步研究大豆 COMT 基因的具体功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种为 Williams 82,高保真限制性内切酶 *EcoR* I 与 *Sac* I 购买自全式金公司。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、AH109 酵母感受态细胞由本实验室制备。pGADT7 载体由本实验室保存。引物合成及测序工作由上海生工生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 大豆总 RNA 提取与反转录 使用 Bio Flux 植物总 RNA 提取试剂盒分别提取水培 20 d 大豆的根、茎、叶和子叶的总 RNA。使用天根公司的 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒将提取的 RNA 反转录为 cDNA,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 基因克隆 根据 *Glyma04G227700* 序列,使用 DNAMAN 9 设计特异性引物:n04G227700-F (5'-ATGGGTTC AACAGGTGAGA-3');n04G227700-R (5'-TTAAACCTTTT T GAGAAATTCC-3')。以大豆根部 cDNA 为模板 PCR 扩增 *Glyma04G227700* 基因序列,使用全式金公司 Star Take 高保证酶试剂盒扩增,详细扩增体系参照说明书。使用天根公司的 PCR 产物纯化回收试剂盒纯化回收 PCR 扩增产物,使用 TaKaRa 公司的 pMD18-T Vector Cloning Kit 将回收产物与 pMD18-T 载体进行连接。连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,经菌液 PCR 验证为阳性菌株后送至上海生工生物公司进行测序。

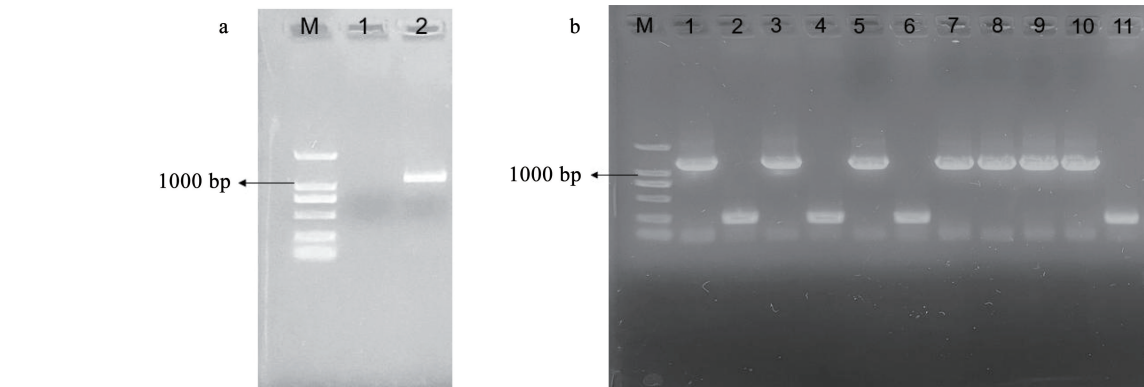
1.2.3 生物信息学分析 通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载不同物种中与 *Glyma04G227700* 同源性较高的的氨基酸序列并进行多序列比对,使用 BLAST 检索 GenBank、DNAMAN 8 与 MAGE 5 进行多序列比对和同源性分析。

使用 ProtParam 在线软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *Glyma04G227700* 氨基酸序列分子量、等电点和亲疏水性等理化参数。使用 PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) 在线软件预测 *Glyma04G227700* 蛋白的功能结构域。

1.2.3 *Glyma04G227700* 表达模式分析 以大豆不同组织 RNA 反转录的 cDNA 作为模板,使用全式金 PerfectSt art[®] Green qPCR SuperMix 荧光定量试剂盒进行 qRT-PCR,以 *GmCYP2* 作为内参基因。使用 DNAMAN 9 设计 *Glyma04G227700* 定量引物 qPCR-04g-F (GTGCCCCAGTACTCCCTATG), qPCR-04g-R (GGCGCAATATACGGTCCAAC),采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法^[19]对数据进行定量分析。

1.2.4 酵母双杂交 利用博迈德生物公司 2 \times Seamless Cloning Mix 同源重组试剂盒,设计带有酶切位点 *EcoR* I 与 *Sac* I 的引物,04G-AD-F(ccatggaggccag-

tgaattcATGGGTTCAACAGGTGAGACT), 04G-AD-R (tctgcagctcagcgtTTAAACCTTTTTGAGAAATTCCAT), 扩增 *Glyma04G227700* 基因序列。将复制好的片段连接到 pGADT7 载体, 构建 prey 载体 AD-*Glyma04G227700*。将 prey 载体与本实验室保存的 bait 载体 BD-*Glyma08G11030* 共转化^[20]入酵母菌株 AH109, 在 SD-Leu-*trp*、SD-Leu-*Trp*-His 和 SD-Leu-*Trp*-His-Ade 培养基上培养。以共转化 pGADT7 空载体与 pGBKT7 空载体的 AH109 菌株以及共转化 BD-*Glyma08G11030* 与 pGADT7 空载体的 AH109 菌株作为阴性对照。



注: M. DL2000 maker; a. 目的片段扩增; 1~2. *Glyma04G227700* 编码区扩增产物; b. 菌液 PCR 检测 *Glyma04G227700*-pMD18-T; 1, 3, 5, 7~10. 阳性菌株。

Note: M. DL2000 maker; a. Target fragment amplification; 1-2. Amplification products of *Glyma04G227700* coding region; b. Detection of *Glyma04G227700*-pMD18-T by bacterial fluid PCR; 1, 3, 5 and 7-10. Positive strain.

图1 *Glyma04G227700* 基因克隆

Fig.1 Cloning of *Glyma04G227700* gene

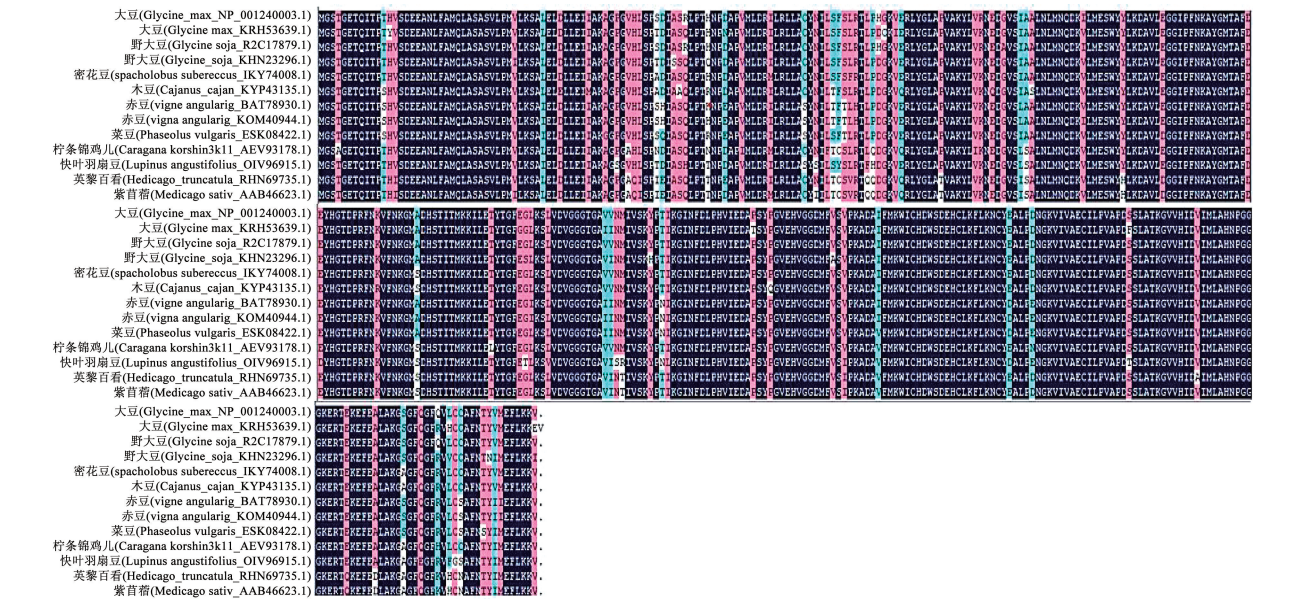


图2 *Glyma04G227700* 蛋白与其他植物的高同源蛋白多序列比对

Fig.2 Multiple sequence alignment of *Glyma04G227700* protein with other plant proteins

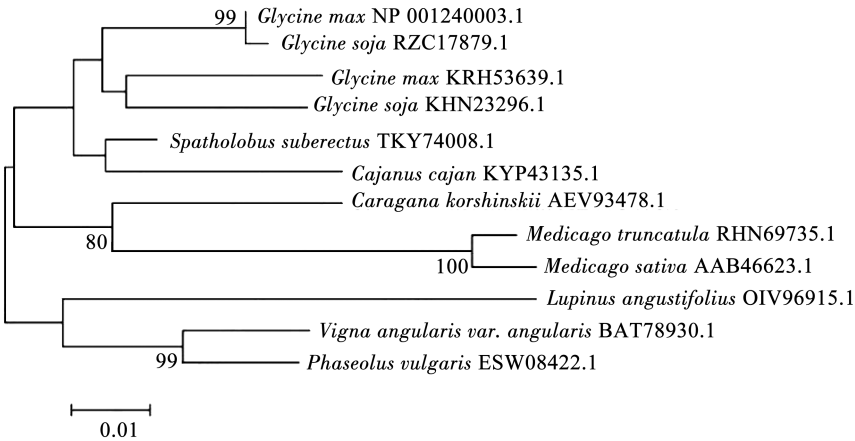


图 3 Glyma04G227700 蛋白与其他植物的高同源蛋白进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of Glyma04G227700 protein and high homology proteins of other plants

编码蛋白的理化性质分析结果表明, Glyma04G227700 蛋白为 365 个氨基酸, 分子量为 39 949.31 kD, 等电点为 5.74。序列中共 20 种氨基酸, 其中 Leu 含量最高, 为 10.1%, Trp 含量最低, 为 0.8%。负电荷残基(Asp + Glu)42 个, 正电荷残基

(Arg + Lys) 33 个。该蛋白偏酸性, 脂肪系数为 93.75, 不稳定指数为 31.8, 属于不稳定蛋白质。PROSITE 在线软件预测显示, Glyma04G227700 蛋白在 3 ~ 153 位存在 1 个高度保守的 SAM 结构域(图 4)。

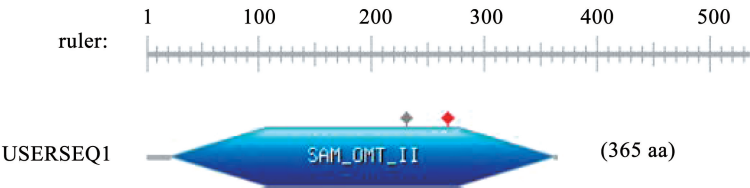


图 4 Glyma04G227700 蛋白结构域分析

Fig. 4 Analysis of Glyma04G227700 protein domain

2.2 大豆不同部位的 *Glyma04G227700* 表达量分析

荧光定量 PCR 检测结果表明, 大豆水培 20 d 后, 根和茎中 *Glyma04G227700* 基因表达量较高, 叶次之, 子叶中表达量最低(图 5)。

2.3 酵母双杂交

如图 6 所示, AD-*Glyma04G227700* 分别与 pGBKT7 载体及 BD-*Glyma08G11030* 共转化的 AH109 菌株在 SD-Leu-trp 培养基和 SD-Leu-Trp-His 培养基上均能正常生长, 而在 SD-Leu-Trp-His-Ade 培养基上无法生长。BD- *Glyma08G11030* 与 pGADT7 载体共转化的 AH109 菌株只能在 SD-Leu-Trp 培养基上生长, 在 SD-Leu-Trp-His 培养基及 SD-Leu-Trp-His-Ade 培养基上均无法生长。而 pGADT7 载体与 pGBKT7 载体共转化的 AH109 菌株在 SD-Leu-Trp 培养基上可以正常生长, 在 SD-Leu-Trp-His 培养基及 SD-Leu-Trp-His-Ade 培养基上均无法生长。推断 Glyma04G227700 蛋白与 Glyma08G11030 蛋白并不存在互作关系。

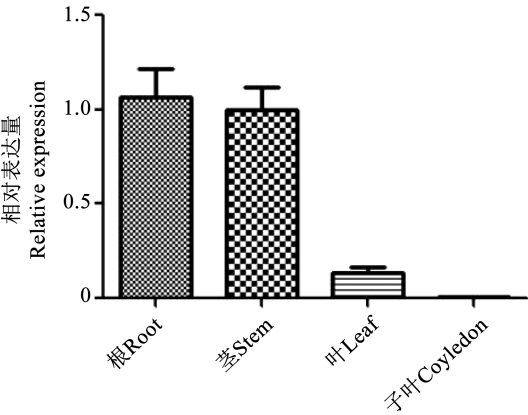
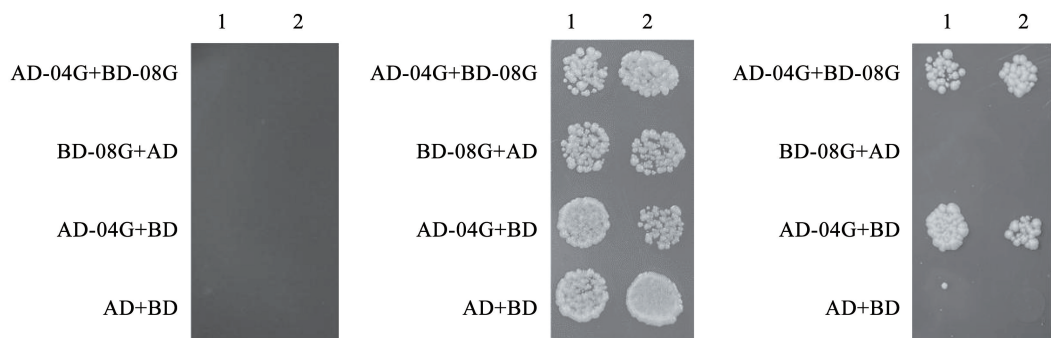


图 5 大豆不同部位的 *Glyma04G227700* 基因表达量分析

Fig. 5 Analysis on relative expression of *Glyma04G227700* gene in different soybean tissues



注：a. SD-Leu-Trp；b. SD-Leu-Trp-His；c. SD-Leu-Trp-His-Ade。
Note: a. SD-Leu-Trp；b. SD-Leu-Trp-His；c. SD-Leu-Trp-His-Ade.

图6 酵母双杂结果
Fig. 6 Results of yeast two-hybrid

3 讨论

COMT 基因作为木质素单体生物合成的关键酶基因,它的主要功能是调控不同类型的木质素单体从而改变植物抗性。COMT 基因在植物不同组织部位的表达不同,直接影响不同部位木质素构成的差异。兴安落叶松的 COMT 基因在根、茎、针叶中均有表达,但在茎中的表达量最高,这与茎中需要合成更多的木质素来维持机械化强度相对应^[21];砵山酥梨的 COMT 基因,开花后 47 d 在果中部表达量最高,63 d 在近果核部表达量最高,且基因总表达量在开花后呈现先升高后降低的趋势,并在 63 d 达到最大值,这与其石细胞的发育规律有很大的相关性^[22];丹参 COMT 基因在茎中表达最丰富,其次是叶中,而根中表达量最低,这与其机械支持和保护功能相符^[23]。在本研究中同属 COMT 基因的大豆 *Glyma04G227700* 基因在根、茎、叶和子叶中都有表达,而在根和茎中表达量最高,这与根和茎在生长过程中需要更多的木质素来维持疏导组织和维持机械支持相对应。在调控植物抗性方面,Zhang 等^[24]过表达白颖藎草中的 *CrCOMT* 基因,转基因植物在盐胁迫下表现出更强的生长和生理性能,如侧根数量、脯氨酸水平和叶绿素含量等均显著提高。过表达 *SICOMT1* 使番茄内源褪黑素的含量和耐盐性提高,同时使干旱胁迫下番茄植株的光合作用和抗氧化能力提高,诱导了胁迫相关信号基因的表达,使番茄抗旱能力提高^[15]。

蛋白质在生物体机制中是必不可少的,生命活动的每时每刻都存在着蛋白质间的相互作用^[25]。目前有关蛋白质互作的方法有很多,包括酵母双杂交、免疫共沉淀 (Co-IP)、双分子荧光互补 (BiFC)、pull-down 等^[20]。本研究酵母双杂交检验结果表明 *Glyma08G11030* 与 *Glyma04G227700* 并不

互作。酵母双杂交系统虽具有简单易行、筛选效率高等优点,是筛选互作蛋白最常用的方法^[26],但需要结合其他方法来进一步确定结果。*Glyma08G11030* 与 *Glyma04G227700* 是否互作仍有待采用其他方法进一步研究。

4 结论

本研究从大豆中克隆了 *Glyma04G227700* 基因,全长 1 095 bp,编码 366 个氨基酸,与野大豆 (RZC17879. 1 *Glycine soja*) 亲缘关系较近。*Glyma04G227700* 在大豆的根、茎、叶、子叶中有表达,且根和茎中 *Glyma04G227700* 基因表达量较高,子叶中表达量最低。酵母双杂结果表明 *Glyma08G11030* 与 *Glyma04G227700* 蛋白不存在互作。研究结果为进一步研究该家族基因功能奠定了基础。

参考文献

[1] 蔺占兵, 马庆虎, 徐洋. 木质素的生物合成及其分子调控 [J]. 自然科学进展, 2003, 13(5): 455-461. (LIN Z B, MA Q H, XU Y. Biosynthesis and molecular regulation of lignin [J]. Progress in Natural Science, 2003, 13(5): 455-461.)

[2] BOERJAN W, RALPH J, BAUCHER M. Lignin biosynthesis [J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54(1): 519-546.

[3] 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. (LI B, NI Z Y, WANG J, et al. Research progress of caffeic acid-O-methyltransferase gene (COMT), a key enzyme in lignin biosynthesis [J]. Molecular Plant Breeding, 2010, 8(1): 117-124.)

[4] LU N, MA W J, HAN D H, et al. Genome-wide analysis of the *Catalpa bungei* caffeic acid-O-methyltransferase (COMT) gene family: Identification and expression profiles in normal, tension, and opposite wood [J]. PeerJ, 2019, 7: e6520.

[5] 陈安琪, 宋思敏, 邓楷煜, 等. 拟南芥 COMT 基因家族的全基因组分析 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(19): 6388-6396.

- (CHEN A Q, SONG S M, DENG K Y, et al. Genomic analysis of COMT gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(19): 6388-6396.)
- [6] YANG W J, DU Y T, ZHOU Y B, et al. Overexpression of *TaCOMT* improves melatonin production and enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(3): 652.
- [7] 刘裕峰, 朱天辉, 刘应高, 等. 板栗咖啡酸氧甲基转移酶基因 *CmCOMT* 的克隆及原核表达 [J]. 西北植物学报, 2017, 37(12): 2332-2341. (LIU Y F, ZHU T H, LIU Y G, et al. Cloning and prokaryotic expression of caffeic acid O-methyltransferase gene *CmCOMT* from *Castanea mollissima* Bl. [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2017, 37(12): 2332-2341.)
- [8] BATE N J, ORR J, NI W, et al. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate determining step in natural product synthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(16): 7608-7612.
- [9] PIQUEMAL J, CHAMAYOU S, NADAUD I, et al. Down-regulation of caffeic acid-O-methyltransferase in maize revisited using a transgenic approach [J]. Plant Physiology, 2002, 130(4): 1675-1685.
- [10] NI W, PAIVA N L, DIXON R A. Reduced lignin in transgenic plants containing a caffeic acid-O-methyltransferase antisense gene [J]. Transgenic Research, 1994, 3(2): 120-126.
- [11] CHEN L, AUH C K, DOWLING P, et al. Transgenic down-regulation of caffeic acid O-methyltransferase (COMT) led to improved digestibility in tall fescue (*Festuca arundinacea*) [J]. Functional Plant Biology, 2004, 31(3): 235-245.
- [12] LI Y, LIU G, LI J, et al. Acid detergent lignin, lodging resistance index, and expression of the caffeic acid O-methyltransferase gene in brown midrib-12 sudangrass [J]. Breeding Science, 2015, 65(4): 291-297.
- [13] 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. (QI J Y, FANG Y J, LONG X Y, et al. Cloning and expression analysis of a caffeic acid methyltransferase (COMT) gene from *Hevea rubica* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2013, 21(7): 838-846.)
- [14] LI W, LU J, LU K, et al. Cloning and phylogenetic analysis of *Brassica napus* L. caffeic acid-O-methyltransferase 1 gene family and its expression pattern under drought stress [J]. PLoS One, 2016, 11(11): 165975.
- [15] 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. (SUN S S, HAN Y P, YAN Y Y, et al. Overexpression of caffeine-O-methyltransferase gene (*COMT1*) regulates physiological response of Tomato seedlings to drought stress [J]. Chinese Journal of Plant Physiology, 2019, 55(8): 1109-1122.)
- [16] CAROCHA V, SOLER M, HEFER C, et al. Genome-wide analysis of the lignin toolbox of *Eucalyptus grandis* [J]. New Phytologist, 2015, 206(4): 1297-1313.
- [17] 殷静. 大豆茎倒伏突变体基因定位、转录组测序及 2 个木质素合成基因的克隆研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013. (YIN J. Gene mapping, transcriptome sequencing and cloning of two lignin synthesis genes in soybean stem lodging mutant [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.)
- [18] 张承琪, 王怡, 夏成林, 等. 大豆 F-box 基因 *Glyma08g11030* 启动子克隆及植物表达载体构建 [J]. 大豆科学, 2018, 37(2): 179-184. (ZHANG C Q, WANG Y, XIA C L, et al. Cloning and expression vector construction of *Glyma08g11030* in soybean F-box gene [J]. Journal of Soybean Science, 2018, 37(2): 179-184.)
- [19] 倪志勇. 大豆抗逆相关 miR169c 及其靶位点 GmNFYA3 和 miR394a 的功能研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013. (NI Z Y. Study on the function of miR169c and its target sites GmNFYA3 and miR394a in soybean [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.)
- [20] 盛慧, 陈姗姗, 艾聪聪, 等. 利用酵母双杂交技术筛选卵菌效应因子互作蛋白概述 [J]. 山东农业大学学报 (自然科学版), 2019, 50(3): 357-360. (SHENG H, CHEN S S, AI C C, et al. A review of interaction proteins of oomycete effectors screened by yeast two hybrid system [J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition), 2019, 50(3): 357-360.)
- [21] 乔明星, 林晓飞, 张文波. 兴安落叶松咖啡酸-O-甲基转移酶基因的克隆及特性分析 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(7): 1684-1690. (QIAO M X, LIN X F, ZHANG W B. Cloning and characterization of caffeic acid-O-methyltransferase gene from *Larch gmelinii* [J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(7): 1684-1690.)
- [22] 程敏, 尹梅, 邹鹤伟, 等. 砀山酥梨果实 COMT 基因的克隆和表达分析 [J]. 核农学报, 2015, 29(3): 454-461. (CHENG M, YIN M, ZOU H W, et al. Cloning and expression analysis of COMT gene of Dangshan pear [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2015, 29(3): 454-461.)
- [23] 宋银, 王东浩, 吴锦斌, 等. 丹参咖啡酸-O-甲基转移酶基因 (*SmCOMT1*) 的克隆及其分析 [J]. 植物研究, 2012, 32(4): 437-443. (SONG Y, WANG D H, WU J B, et al. Cloning and analysis of *Salvia miltiorrhiza* caffeine-O-methyltransferase gene [J]. Plant Research, 2012, 32(4): 437-443.)
- [24] ZHANG K, CUI H T, CAO S H, et al. Overexpression of *CrCOMT* from *Carex rigescens* increases salt stress and modulates melatonin synthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Reports, 2019, 38(12): 1501-1514.
- [25] 黄大辉, 张增艳, 辛志勇. 利用酵母双杂交系统研究植物与病毒蛋白相互作用的进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(4): 477-483. (HUANG D H, ZHANG Z Y, XIN Z Y. Study on the interaction between plant and viral proteins using yeast two-hybrid system [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2006, 7(4): 477-483.)
- [26] BRAUN P, AUBOURG S, LEENE J V, et al. Plant protein interactomes [J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 161-187.