

高粱肉桂酸羟化酶基因*SbC4H1*降低拟南芥的木质素合成

闫丽^{1,2}, 夏光敏¹, 黄应华^{3,*}, 赵双宜^{1,*}

¹山东大学生命科学学院, 植物细胞工程与种质创新教育部重点实验室, 济南250100; ²临沂大学生命科学学院, 山东临沂276000; ³USDA-ARS Plant Science Research Laboratory, Stillwater, OK 74075, USA

摘要: 肉桂酸羟化酶(C4H)是苯丙烷代谢通路的关键酶, 其活性和含量直接影响木质素合成的效率。本文研究通过高粱*bmr*突变体的抑制差减杂交筛选、克隆到了一个C4H基因*SbC4H1*。半定量RT-PCR发现, *SbC4H1*在多个*bmr*突变体中上调表达。将*SbC4H1-GFP*融合基因转化拟南芥原生质体进行瞬时表达, 发现*SbC4H1*表达产物蛋白定位于细胞质。*SbC4H1*在拟南芥中的异源表达明显降低其茎的木质素含量, 并且下调了拟南芥*4CL1*、*F5H*和*HCT*等木质素合成基因的表达。这些结果表明, 高粱*SbC4H1*抑制了拟南芥木质素的合成。

关键词: 高粱; 肉桂酸4-羟化酶; 木质素合成; 生物能源

Cinnamic Acid 4-Hydroxylase of Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] Gene *SbC4H1* Restricts Lignin Synthesis in *Arabidopsis*

YAN Li^{1,2}, XIA Guang-Min¹, HUANG Ying-Hua^{3,*}, ZHAO Shuang-Yi^{1,*}

¹The Key Laboratory of Plant Cell Engineering and Germplasm Innovation, Ministry of Education, Shandong University, Jinan 250100, China; ²College of Life Sciences, Linyi University, Linyi, Shandong 276000, China; ³USDA-ARS Plant Science Research Laboratory, Stillwater, OK 74075, USA

Abstract: Cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) is the first hydroxylase enzyme of phenylpropanoid pathway, and its content and activity affects the lignin synthesis. In this study, we isolated a C4H gene *SbC4H1* from the suppression subtractive hybridization library of *brown midrib* (*bmr*) mutants of *Sorghum bicolor*. Semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR) analysis showed that *SbC4H1* was up-regulated in most of *bmr* mutants. The transient expression assay in *Arabidopsis* protoplast indicated *SbC4H1* was mainly located in the cytoplasm. Ectopic overexpression of *SbC4H1* significantly lowered the content of lignin in *Arabidopsis*. sqRT-PCR indicated that several genes in phenylpropanoid pathway such as *4CL1*, *F5H1* and *HCT* were down-regulated in *Arabidopsis*. These results showed that, *SbC4H1* played an inhibitory effect on the synthesis of lignin.

Key words: sorghum (*Sorghum bicolor*); cinnamic acid 4-hydroxylase; lignin synthesis; bioenergy

随着世界能源危机的加重, 以生物能源为代表的的新能源研究备受关注, 其中以纤维素为原料的第二代酒精生产技术研究是其核心, 这不但可以保证粮食、油料等食品生产的安全, 还可充分利用盐碱、荒地及边际性土壤。生物质(biomass)通过物理或化学方法预处理后, 其中的纤维素可进一步被分解成葡萄糖, 再经过酒精酵母发酵产生乙醇。但在天然状态下, 细胞壁中的纤维素由于受到木质素的保护, 其水解效率仅有10%~20%左右(梁新红等2004)。木质素性质稳定, 又较耐酸碱, 因此木质素含量较高的生物质, 其预处理强度也较高, 这不但增加了生产成本又造成较大的污染。木质素水解产生的多种小分子酚类物质可抑制其后纤维素酶解过程中的纤维素酶活

性, 因此低木质素含量的生物质就有更高的纤维素-酒精转化率。最近报道利用转基因技术获得木质素含量降低的柳枝稷, 在进行酒精发酵试验时可节约30%左右的酶用量, 预处理强度也大为降低, 而酒精产量却提高30%以上(Fu等2011)。因此利用基因工程技术对能源作物进行改良, 有望降低其木质素含量, 提高纤维素-乙醇转化率, 促进纤维素乙醇产业真正走向实用化。

高粱是世界第五大粮食作物, 又是重要的饲

收稿 2013-10-08 修定 2013-11-21
资助 国家自然科学基金(31201273和31370331)和山东省博士基金(BS2010SW004)。

* 通讯作者(E-mail: syzhao@sdu.edu.cn, yinghua.huang@ars.usda.gov; Tel: 0531-88364525, 405-624-4142)。

料和酿酒原料之一。作为高效的能源作物,其抗逆性较强,生物量大,耐瘠薄,尤其是种子中的淀粉、甜高粱茎秆中的糖及秸秆中的纤维素均可通过不同的方式用于乙醇生产,其生物乙醇生产潜力已经超过玉米、甘蔗等著名能源作物(Goff等2010)。玉米、高粱的褐/黄中脉突变体(brown midrib, *bmr*)是指植株生长到5个伸展叶后,其叶片中脉和茎髓部有褐色的色素沉着而命名,与正常表型的野生型高粱相比,*bmr*突变体茎及叶中的木质素含量明显降低,其纤维素可降解率大幅提高,因此*bmr*突变体是研究木质素合成机理的重要材料,也是优质的牛羊青饲料来源之一(Yan等2012)。

木质素是较为复杂的酚类聚合物,在植物细胞壁中的含量较高。木质素的合成是由苯丙氨酸/酪氨酸(禾谷类等)裂解开始,经肉桂酸、香豆酸、咖啡酸、阿魏酸、芥子酸,转变为香豆醛、松柏醛、芥子醛,进一步氧化为香豆醇、松柏醇、芥子醇,成为G、S、H型木质素单体,这些不同单体再经聚合就形成各种木质素(Whetten和Sederoff 1995; Boerjan等2003)。肉桂酸4-羟化酶(cinnamic acid 4-hydroxylase, C4H)是苯丙烷代谢途径的第一个羟基化酶,可催化苯丙氨酸裂解得到的反式肉桂酸,后者再进一步氧化成对-香豆酸,对-香豆酸在不同酶的催化下进一步向木质素途径、花青素途径及类黄酮途径等分支途径转化(Hahlbrock和Grisebach 1979)。C4H是一种P450单氧化物酶,属于CYP73亚家族(Schomburg等2006)。第一个C4H是从豌豆中分离的,目前已从苜蓿、拟南芥等多种不同植物中识别、分离出C4H(Chen等2007)。植物系统发生分析结果表明,C4H是木质素合成途径中最保守的基因家族,在单子叶和双子叶植物中没有明显的分化。C4H基因在转录水平上mRNA的丰度和蛋白质水平上的酶活性能有效影响植物中木质素的合成(Ryan等2002; Millar等2007)。C4H的表达可被外界的化学物质、UV线、真菌和伤害所诱导(Bell-Lelong等1997),其mRNA积累水平的变化趋势与PAL、4CL的mRNA趋于一致(Whetten和Sederoff 1992; Osakabe等1996)。诱导烟草C4H表达的实验中所测定到的C4H活性通常比PAL的活性低得多,这表明在植物丙烷代谢途

径中C4H可能是比PAL更为有效的限速步骤(Sewalt等1997)。因为抑制PAL的表达,只有达到相当的程度,才能表现出对木质素合成的抑制,这也许是植物有多个PAL所致,因为它们的功能在相当程度上可能是冗余的。而抑制C4H的表达则可极显著地抑制木质素的合成(Sewalt等1997)。酵母菌体内蛋白质互作实验表明,苯丙烷代谢途径中的C4H与PAL、4CL可以互作,其酶活性可相互调控(Koopmann等1999)。因此,C4H对木质素合成代谢的调控和应用研究还需更深入的探索。

本研究从高粱中克隆了*SbC4H1*,分析了该基因在高粱*bmr*突变体中的表达,确定了基因表达产物的亚细胞分布,分析了*SbC4H1*拟南芥过表达系的木质素含量及分布,检测了木质素合成途径主要基因的转录活性,为进一步研究*SbC4H1*调控木质素生物合成的机理及应用提供了依据。

材料与方法

1 植物材料

高粱[*Sorghum bicolor* (L.) Moench]选用已经完成测序的高粱BTx623以及该基因型经EMS (ethyl methane sulfonate)诱变得到的13个*bmr*突变体(*bmr*、*bmr6*、*bmr12*、*bmr29*、*bmr30*、*bmr31*、*bmr32*、*bmr33*、*bmr34*、*bmr35*、*bmr36*、*bmr45*和*bmr49*)。高粱种植于山东大学生命科学学院温室及试验田中,自然光照,常规管理。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, Columbia)种植于MS培养基或人工育苗基质中,22~23 °C,每天光照时间为16 h。

2 *SbC4H1*基因的克隆及过表达载体的构建

根据高粱BTx623和其13个*bmr*突变体叶片mRNA混合池抑制性差减文库(SSH)的芯片分析结果(Yan等2012),本研究选择了其中一个C4H(*SbC4H1*)片段,通过搜索高粱基因组得到该基因完整编码区核酸和蛋白质序列信息,对NCBI (National Center for Biotechnology Information)、PDB (RCSB Protein Data Bank)和Phytozome数据库搜索获得同源基因序列,利用MEGA v4.1进行进化树分析。

根据*SbC4H1*序列设计正反义引物,2个引物5'端都添加了*Xba*I酶切位点(下划线部分)和保护碱

基(*SbC4H1*-F, 5' ATCTAGACCTCCAGCATGGA-CCTCGTG 3'; *SbC4H1*-R, 5' ATCTAGAGCGTG-CGCATTGATCTAGGC 3'), 利用该引物进行RT-PCR, 高保真扩增得到*SbC4H1*全长cDNA。具体PCR条件如下: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸2 min, 共35循环; 72 °C终

延伸 10 min。PCR产物连接pMD18-T载体测序, 测序正确后用*Xba*I酶切后回收片段连接入经同样酶切的pSTART载体, 获得含目的基因的植物表达载体pSTC4H1 (图1), 用*Bam*HI酶切验证插入方向(该基因5'端及pSTART多克隆位点均有一*Bam*HI位点, 正向插入片段为919 bp, 反向插入片段为607 bp)。

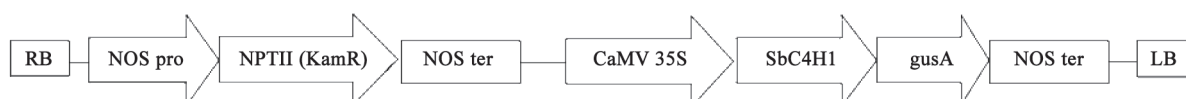


图1 植物表达载体pSTC4H1的构建

Fig.1 The construction of plant expression vector pSTC4H1

3 *SbC4H1*在高粱BTx623与*bmr*突变体中的表达分析

高粱BTx623及13种*bmr*突变体温室生长至7叶期后, 收集叶片经液氮速冻, 研磨后用TRIzol法提取RNA, 以反转录的cDNA为模板, 高粱*Actin*基因为对照, 半定量RT-PCR检测*SbC4H1*在*bmr*突变体中的表达。*SbC4H1*及*Actin*引物序列分别为: *SbActin*-qF, 5' AGATGGTGTTCAGCCACACTG 3'; *SbActin*-qR, 5' CGAGCTTCTCCTTCATGTCC 3'; *SbC4H1*-qF, 5' GACTGTGCGAGAGCTTCGAG 3'; *SbC4H1*-qR, 5' ATCACCTTCTTGCGTTCCTG 3'。PCR条件如下: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共30~35个循环; 72 °C终延伸10 min。

4 *SbC4H1*蛋白的亚细胞定位

以5'端加*Xba*I酶切位点及保护碱基的引物(C4H-*Xba*I-cF1, 5' GCTCTAGAATGGACCT-CGTGCTC CTGGAG 3'; C4H-*Xba*I-cR1, 5' GCTCTAGAGGCCTCGAGGGGCTTGCAGA 3')扩增*SbC4H1*基因完整编码区(已去除终止密码), PCR条件与上述*SbC4H1*的克隆相同。PCR产物经*Xba*I酶切, 回收*SbC4H1*片段并连入到瞬时表达载体p326GFP的*Xba*I位点, 经*Bam*HI酶切验证插入方向后, 获得35S启动的*SbC4H1*-GFP融合蛋白亚细胞定位载体。在PEG介导下转化拟南芥原生质体, 短暂培养后, 经共聚焦显微镜(LSM700, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany)检测(Sakamoto等2003), 绿色荧光信号即显示*SbC4H1*-GFP融合蛋白的亚细胞定位即*SbC4H1*的亚细胞定位。

5 *SbC4H1*基因对拟南芥的遗传转化

所构建的*SbC4H1*双元表达载体用浸花法转化拟南芥(Clough和Bent 1998), T₁代转基因拟南芥在50 mg·L⁻¹卡那霉素的MS培养基平板上筛选阳性植株, 进一步筛选转基因T₂代的单拷贝插入株系(分离比为3:1), T₃代性状不分离的纯系用于功能验证。

6 *SbC4H1*转基因拟南芥纯系木质素含量测定

选取生长6周的转基因拟南芥, 距基部莲座叶1 cm左右的茎段进行冷冻横切片, Wiesner法染色, 定性观察木质素的含量及分布情况(Pomar等2002)。

溴乙酰法测定茎中木质素含量(Yan等2012), 具体方法为: 每10株生长6周的转基因拟南芥茎为一组, 取距基部莲座叶3 cm长的茎, 液氮速冻后研磨成极细的粉末, 40目过筛, 真空冻干。取10 mg冻干粉, 分别用2 mL的无水乙醇、95%乙醇和纯净水洗涤, 去除可溶性物质。风干后以1:3体积比加入溴乙酰和醋酸(共2 mL), 70 °C恒温水浴加塞保温30 min, 随后依次加入0.9 mL 2 mol·L⁻¹ NaOH、3 mL 醋酸和0.1 mL 7.5 mol·L⁻¹ 羟胺盐酸终止反应。离心取上清液, 加水稀释25倍后测定280 nm吸光度, 实验重复3次。

7 *SbC4H1*转基因拟南芥木质素合成相关基因的表达分析

提取*SbC4H1*转基因拟南芥2个纯系及对照生长6周茎叶总RNA, 经逆转录成cDNA后, 通过半定量RT-PCR分析转基因拟南芥中与木质素合成相关的苯丙烷途径基因的表达情况, 具体引物见表1, PCR条件见上文第3节。

表1 木质素合成相关基因的所用引物序列

Table 1 Sequences of primers used for lignin synthesis related genes

引物名	序列
AtPAL1-F	5' acagagcttttgaccggaga 3'
AtPAL1-R	5' cacttcacagacaatcattg 3'
AtC4H-F	5' gcaagctgaattgtccacct 3'
AtC4H-R	5' cacatcctgaaagctgagca 3'
At4CL1-F	5' ctccggtgtctggtatcaact 3'
At4CL1-R	5' gaaatctggtctgctctcctc 3'
AtHCT-F	5' cttcactctttccccttc 3'
AtHCT-R	5' gtcccatcctcttgatt 3'
AtC3H1-F	5' cacgcttgagctcttcacac 3'
AtC3H1-R	5' gttagcaacgcatcaacgaa 3'
AtCCoAOMT1-F	5' catcatcgaccaatggagaa 3'
AtCCoAOMT1-R	5' tcgatcaaagctgtggta 3'
AtCCR1-F	5' tcttcacacggtctctct 3'
AtCCR1-R	5' aaagactggcgttgatcgtc 3'
AtF5H1-F	5' cttaggagcctgagacca 3'
AtF5H1-R	5' agagtgggcttaacggagt 3'
AtCOMT-F	5' cgtcgcagacaactttgatg 3'
AtCOMT-R	5' tgatctccacatgtcatcg 3'
AtCAD6-F	5' cgagtctctcaaacgcagtg 3'
AtCAD6-R	5' gttagtgaggatcggtcaca 3'
AtActin-F	5' actaccgagaacgggaaat 3'
AtActin-R	5' catctgttgaaggtgctga 3'

实验结果

1 *SbC4H1*基因的克隆及同源性分析

通过高粱BTx623和*bmr*突变体SSH和基因芯片分析,从差异表达基因中筛选出高粱的一个*C4H*片段,该基因编码一个细胞色素P450 CYP2亚家族蛋白(PLNO2394),对应高粱的Sb02g010910,命名为*SbC4H1*。*SbC4H1*基因组序列长4 374 bp,有3个外显子和2个内含子(图2)。cDNA序列2 094 bp, ORF为1 506 bp,编码一个502氨基酸残基蛋白质,分子量57.1 kDa,等电点8.85。其氨基酸序列的进化树分析表明,*SbC4H1*与多个物种中的*C4H*具有较高的相似性,特别是与禾本科的柳枝稷、粳稻等同源性最高,与棉花、杨树、大白菜、苜蓿及

高粱*C4H-Like1*等的同源性次之,与火炬松、杉木、小立碗藓及江南卷柏*C4H*等的同源性较远;与蓖麻、菜豆、毛果杨及高粱*C4H-Like2*等同源性更远(图3)。

2 *SbC4H1*基因产物的亚细胞定位

p326GFP-*SbC4H1*载体经PEG法转化拟南芥原生质体,瞬时表达结果如图4所示,在35S启动子的驱动下,*SbC4H1-GFP*产物的绿色荧光在拟南芥原生质体中的细胞质和细胞核中均有分布,与对照35S::GFP中出现的荧光信号相似,这些结果表明*SbC4H1*的产物定位于细胞质和细胞核。

3 *SbC4H1*在转基因拟南芥中的过表达

用浸花法将*SbC4H1*基因转化野生型拟南芥(Col-0),经过卡那霉素筛选及PCR验证,获得纯合的转基因阳性T₃代株系。RT-PCR检测表明,已经整合到拟南芥基因组的外源*SbC4H1*可以正常表达(图5),且*SbC4H1*在*SbC4H1-OE2*中的表达水平略高于*SbC4H1-OE1*; *GUS*由于插入的*SbC4H1*含有终止子而不能表达,无扩增产物;不含目的基因的空载体转基因后代则可以检测到*GUS*基因的表达。野生型对照(WT)均不能检测到上述两个基因的表达。

4 *SbC4H1*过表达拟南芥茎中的木质素含量

6周龄转基因拟南芥的茎经Wiesner染色,*SbC4H1*转基因纯系中维管束和束间纤维的染色明显浅于野生型,说明*SbC4H1*转基因纯系中的木质素含量已经降低(图6)。

6周龄转基因拟南芥的茎木质素含量结果(图7)显示,2个拟南芥*SbC4H1*过表达株系的木质素含量与野生型拟南芥相比明显降低,经统计检验差异达到显著水平,更加证实茎切片木质素的染色结果的真实性。

5 拟南芥转基因植株木质素合成Marker基因的表达

与木质素合成相关的苯基丙烷合成途径基因表达结果(图8)显示,4*CL1*、5*F5H1*和*HCT*等基因的表达在*SbC4H1*过表达拟南芥中受到不同程度的抑制。

图2 *SbC4H1*基因的结构Fig.2 Structure analysis of *SbC4H1*

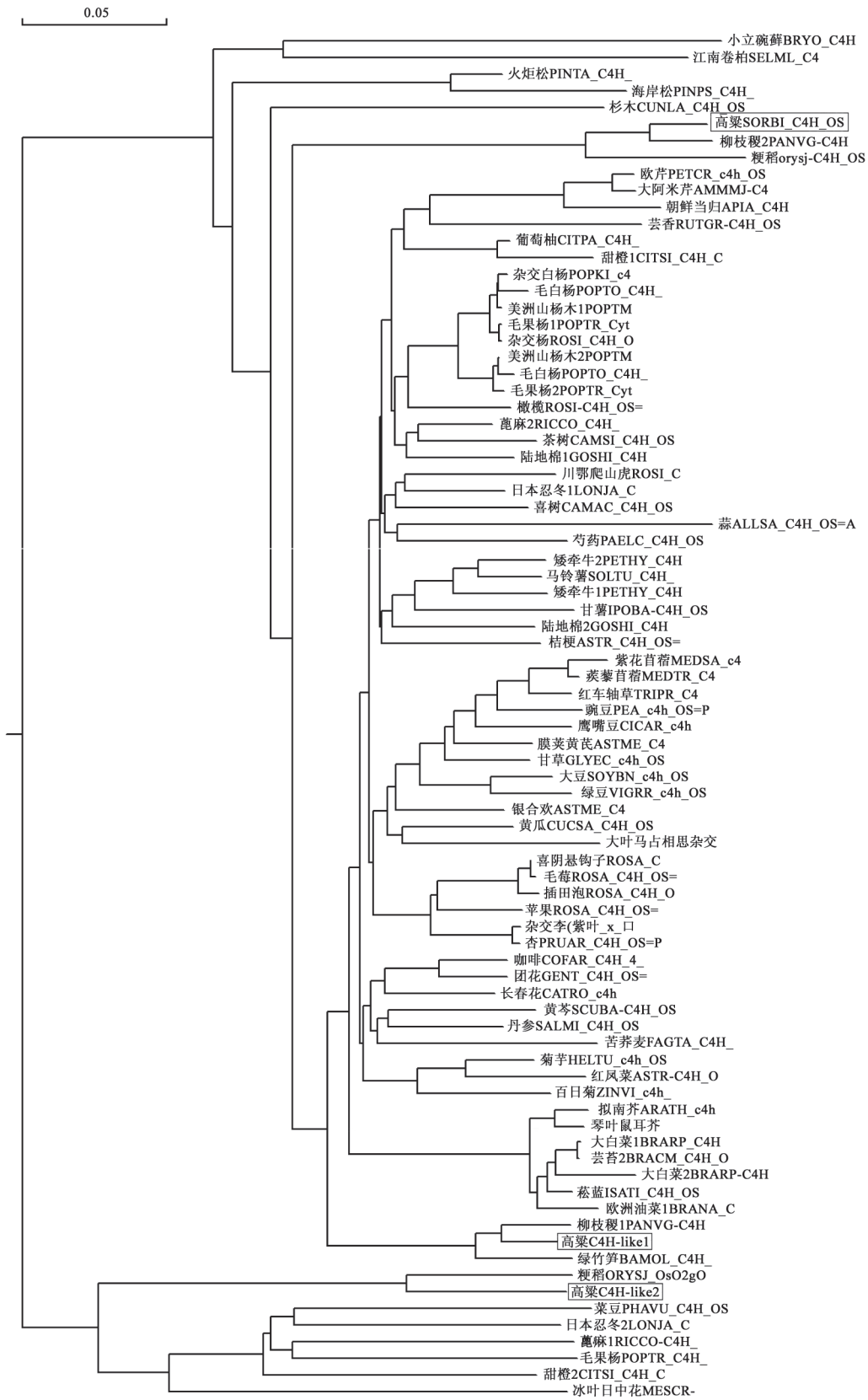
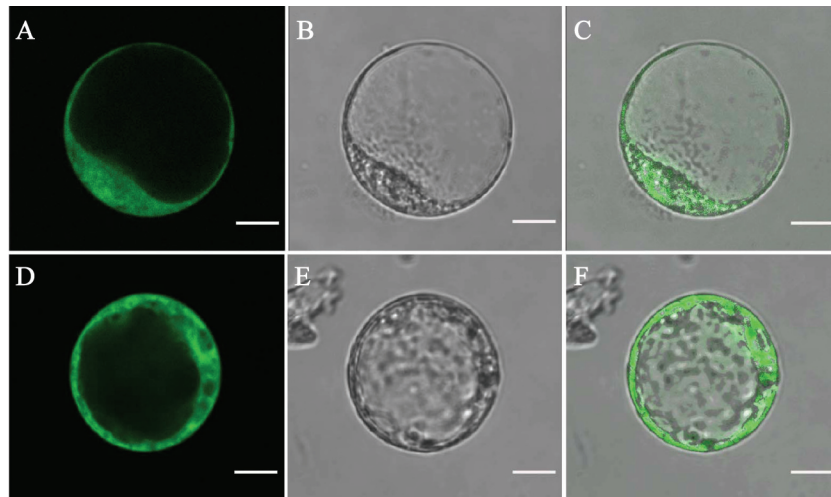
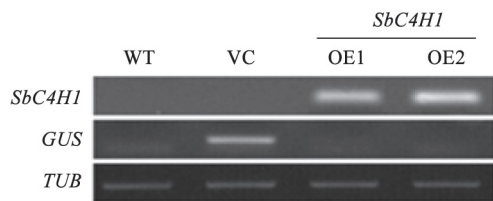


图3 *SbC4H1* 基因进化分析

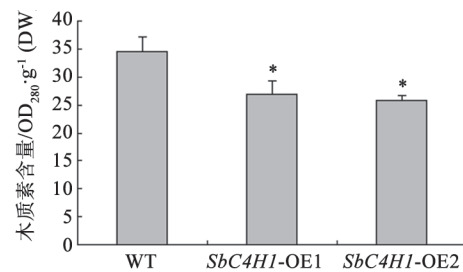
Fig.3 Phylogenetic analysis of *SbC4H1*

图4 *SbC4H1*的亚细胞定位Fig.4 Subcellular localization of the *SbC4H1*

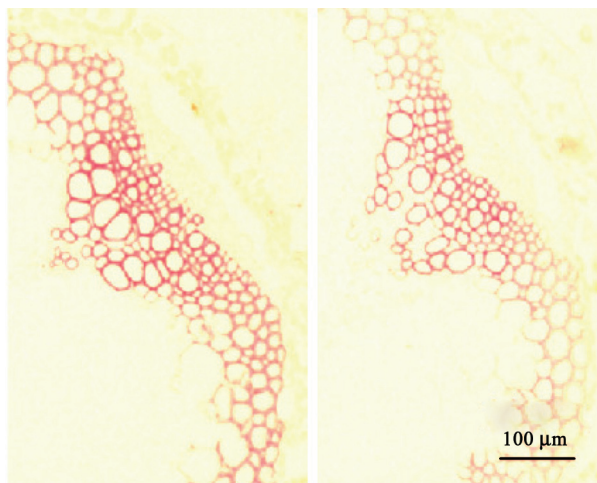
A、B、C: *SbC4H1*-GFP融合蛋白表达, 荧光信号在细胞质和细胞核中; D、E、F: GFP对照载体的表达, 荧光信号在细胞质和核中均有分布。A、D: 激发光下绿色荧光信号; B、E: 自然光下拟南芥原生质体; C、F: 荧光信号和自然光下信号组合; 标尺 10 μm 。

图5 拟南芥*SbC4H1*转基因植株的RT-PCR分析Fig.5 RT-PCR analysis of *SbC4H1* in transgenic *Arabidopsis*

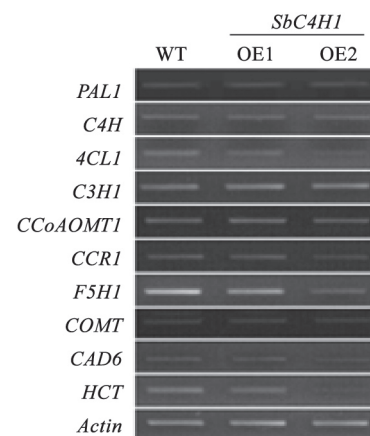
WT: 野生型拟南芥Col-0; VC: 转入空载体对照的拟南芥; OE-1和OE-2: 拟南芥转基因过表达植株T₃代株系。

图7 *SbC4H1*过表达拟南芥中木质素含量Fig.7 Lignin contents of transgenic *Arabidopsis* over-expression of *SbC4H1*

*表示差异达显著水平($P < 0.05$)。

图6 *SbC4H1*过表达拟南芥茎横切Wiesner染色Fig.6 Lignin content as shown by Wiesner's staining of a stem section of transgenic *Arabidopsis* over-expression of *SbC4H1*

左: 野生型拟南芥; 右: *SbC4H1*过表达拟南芥; 标尺 100 μm 。

图8 *SbC4H1*拟南芥过表达植株中木质素

合成相关Marker基因的表达

Fig.8 RT-PCR analysis of lignin biosynthesis marker genes in transgenic *Arabidopsis* over-expression of *SbC4H1*

Fig.8 RT-PCR analysis of lignin biosynthesis marker genes in transgenic *Arabidopsis* over-expression of *SbC4H1*

讨 论

与PAL不同, *C4H*的数量和酶活性均不及PAL, 虽然它们的产物均是苯基丙烷途径起始的关键酶。很多植物的*C4H*由一个或两个, 少数由一个小的基因家族(Anterola和Lewis 2002)构成, 大多数植物的PAL是多拷贝且其产物活性较强。因为诱导*C4H*表达的酶活性通常比PAL的酶活性低得多, *C4H*可能是控制木质素等次生代谢合成的主要限速酶之一(Sewalt等1997), 而抑制PAL的活性只有达到一定程度, 才能降低木质素等次生代谢产物的积累。Lauer等在2001年首次报道高粱*C4H* (Sb02g010910) cDNA序列, Xu等提出高粱基因组中共有3个*C4H*序列(Xu等2009), 但至今对这三个基因的功能研究尚无报道, 对其注释也均为假想蛋白, 因此研究高粱*C4H*的功能, 确证其在植物木质素等次生代谢途径中的作用有重要的意义。

双子叶植物的*C4H*可分为两类(class I和class II), 二者序列相似性约60%, 但功能可能不尽相同。在多数物种中(例如拟南芥等) *C4H*仅有一类(Costa等2003), 而在苜蓿、玉米、橙子、豌豆、长春花、杂交杨等中为一个小的基因家族, 在美洲山杨中有两类共4个*C4H*, 毛果杨中有3个。从多种植物*C4H*的进化树可以看出, 拟南芥等所在的第一类*C4H*可能比较古老, 因为在该类群中有原始的苔藓类、裸子植物, 它们应是陆生被子植物的祖先, 值得重视的是禾本科植物的柳枝稷、粳稻和高粱有2个*C4H*均属于第一类, 但结构均有一定的分化, 彼此属于不同的亚类, 高粱的第3个*C4H*则属于第二类型。由此可见, 在进化过程中*C4H*在结构和功能等方面已经开始有一定的分歧。拟南芥的*C4H*定位在内质网(Ro等2001, 2002), 有些第二类*C4H*因其N端含有一个非典型的丝氨酸/苏氨酸富集序列, 而不能定位于内质网上(Ehltling等2006); 例如在葡萄果肉中表达的*C4H*主要在质体和细胞核中(Chen等2006)。高粱*SbC4H1-GFP*在拟南芥原生质体中瞬时表达时, 其产物定位于细胞质和细胞核中, 是否与细胞质中的内质网共定位还需进一步精细的研究。这说明在不同物种及不同器官, *C4H*在亚细胞中的定位不同, 其表现的功能也可能有所分化。

在异源物种中表达*C4H*可产生不同的结果,

正义过表达*C4H*可能导致该酶活性的上调, 但并不一定必然导致木质素合成的增加, 有时可能会导致其它次生代谢产物的积累, 例如在朝鲜当归(*Angelica gigas*)中过表达*C4H*会导致其转基因毛状根中积累过量的紫花前胡醇当归酯decursinol angelate (Park等2012)。在番茄中正义表达*C4H* (CYP73A24)时, 转基因番茄虽呈现出4种不同的表型, 但其木质素含量全部降低, S/G的比值下降, 芦丁和柚皮素含量有所上调(Millar等2007)。苜蓿的*C4H*在烟草中正义和反义表达, 转基因植株中*C4H*活性出现了上升和降低两种情况, 其中一株苜蓿*C4H*正义过表达株, 其*C4H*酶活性可增加2倍, 但是木质素的含量却没有发生变化, 另一株正义表达植株的*C4H*酶活性虽有所下降, 但木质素含量却反而增加; 其它2株正义和2株反义表达株均表现对该酶活性的抑制, 木质素含量也普遍降低(Sewalt等1997)。部分正义过表达菜豆*C4H* (CYP73A15)及反义表达该基因的转基因烟草后代均表现对木质素合成的抑制(Blee等2001)。这些结果也表明过表达*C4H*并不一定能提高木质素的合成, 也可能会提高花青素/类黄酮或者其它次生代谢产物的积累, 控制各个次生代谢分支的关键步骤位于该基因下游。与此相反, 抑制该基因的表达往往会产生预期的结果, 即降低木质素的合成; *C4H*部分正义序列的表达也可表现为对木质素合成的抑制, 这可能是该基因的部分正义抑制作用(partially sense suppression)所致, 但详细机理并不明确。

在拟南芥过表达*SbC4H1*时, 转基因拟南芥6周龄时茎的木质素含量也降低, 部分木质素合成相关基因表达也受到一定的抑制。但高粱*SbC4H1*的组成型表达并未影响拟南芥本身*C4H*的表达(图5和图8), 因此这似乎并不是发生了正义抑制的结果, 或者由转基因导致的RNAi结果。当过表达苯丙烷途径中的某种酶, 使木质素含量降低的现象也有报道, 当过表达苯丙烷途径有关的细胞色素P450时, 可降低木质素的含量(Ehltling等2006); *C3H*过表达的拟南芥中, 木质素含量仅有正常的60%(Abdulrazzak等2006)。虽然在多个*bmr*突变体中*SbC4H1*都呈现出上调表达的趋势, 但我们并不认为这就是高粱*bmr*突变体木质素含量的下降的直接结果, 因为其它基因表达的变化也同样影响

这些突变体木质素的合成, 例如*SbbHLH1* (Yan等2012, 2013)、*SbCYP*及*Sblim*等(未发表资料)。因此在转基因拟南芥中, 高粱*SbC4H1*的上调表达反而抑制木质素合成可能通过其它机理实现, 例如控制与苯丙烷代谢相关的不同分支代谢的分流及抑制其下游基因的活性(例如*4CL*、*CCR*、*F5H*及*HCT*等)。*PAL*和*C4H*可能对下游基因有不同的前馈影响(feed-forward effect), 因为抑制*C4H*的表达, 可使S单体含量急剧下降, G单体轻微下降, 从而导致S/G比值明显降低; 而抑制*PAL*的表达, 可使木质素含量降低, 但S/G比值升高(Sewalt等1997)。

由于木质素合成途径的复杂性, 高粱中的*C4H*又有多个家族成员, 不同*C4H*在不同生长发育阶段的表达可能存在差异, *C4H*除了主要调控木质素单体合成以外, 还参与了其它植物次生代谢途径的中间环节。因此当其中一个*C4H*的表达发生改变时, 也可能由于其产物与多个其它基因的共同作用, 影响了木质素合成途径与其它密切相关的次生代谢的分流和控制, 最终影响木质素合成的速率, 对于具体调控机理还需进一步研究。

参考文献

- 梁新红, 严天柱, 刘邻渭(2004). 预处理方法对作物秸秆生物转化的影响. 山西食品工业, 4: 5~8
- Abdulrazzak N, Pollet B, Ehltling J, Larsen K, Asnaghi C, Ronseau S, Proux C, Erhardt M, Seltzer V, Renou JP et al (2006). A coumaroyl-ester-3-hydroxylase insertion mutant reveals the existence of nonredundant meta-hydroxylation pathways and essential roles for phenolic precursors in cell expansion and plant growth. *Plant Physiol*, 140: 30~48
- Anterola AM, Lewis NG (2002). Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry*, 61: 221~294
- Bell-Lelong DA, Cusumano JC, Meyer K, Chapple C (1997). Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*. Regulation in response to development and the environment. *Plant Physiol*, 113: 729~738
- Blee K, Choi JW, O'Connell AP, Jupe SC, Schuch W, Lewis NG, Bolwell GP (2001). Antisense and sense expression of cDNA coding for CYP73A15, a class II cinnamate 4-hydroxylase, leads to a delayed and reduced production of lignin in tobacco. *Phytochemistry*, 57: 1159~1166
- Blount JW, Korth KL, Masoud SA, Rasmussen S, Lamb C, Dixon RA (2000). Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol*, 122: 107~116
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003). Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol*, 54: 519~546
- Chen AH, Chai YR, Li JN, Chen L (2007). Molecular cloning of two genes encoding cinnamate 4-hydroxylase (C4H) from oilseed rape (*Brassica napus*). *J Biochem Mol Biol*, 40: 247~260
- Chen JY, Wen PF, Kong WF, Pan QH, Wan SB, Huang WD (2006). Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development. *J Plant Physiol*, 163: 115~127
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16: 735~743
- Costa MA, Collins RE, Anterola AM, Cochrane FC, Davin LB, Lewis NG (2003). An in silico assessment of gene function and organization of the phenylpropanoid pathway metabolic networks in *Arabidopsis thaliana* and limitations thereof. *Phytochemistry*, 64: 1097~1112
- Ehltling J, Provart NJ, Werck-Reichhart D (2006). Functional annotation of the *Arabidopsis* P450 superfamily based on large-scale co-expression analysis. *Biochem Soc Trans*, 34: 1192~1198
- Fu C, Mielenz JR, Xiao X, Ge Y, Hamilton CY, Rodriguez MJ, Chen F, Foston M, Ragauskas A, Bouton J et al (2011). Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 3803~3808
- Goff BM, Moore KJ, Fales SL, Heaton EA (2010). Double-cropping sorghum for biomass. *Agronomy*, 102: 1586~1592
- Hahlbrock K, Grisebach H (1979). Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Plant Physiol*, 30: 105~130
- Koopmann E, Logemann E, Hahlbrock K (1999). Regulation and functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from parsley. *Plant Physiol*, 119: 49~56
- Millar DJ, Long M, Donovan G, Fraser PD, Boudet AM, Danoun S, Bramley PM, Bolwell GP (2007). Introduction of sense constructs of cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A24) in transgenic tomato plants shows opposite effects on flux into stem lignin and fruit flavonoids. *Phytochemistry*, 68: 1497~1509
- Osakabe Y, Nanto K, Kitamura H, Kawai S, Kondo Y, Fujii T, Takabe K, Katayama Y, Morohoshi N (1996). Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase in tissues of *Populus kitakamiensis*. *Planta*, 200: 13~19
- Park NI, Park JH, Park SU (2012). Overexpression of cinnamate 4-hydroxylase gene enhances biosynthesis of decursinol angelate in *Angelica gigas* hairy roots. *Mol Biotechnol*, 50: 114~120
- Pomar F, Merino F, Barcelo AR (2002). O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma*, 220: 17~28
- Ro DK, Ehltling J, Douglas CJ (2002). Cloning, functional expression, and subcellular localization of multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from hybrid poplar. *Plant Physiol*, 130: 1837~1851
- Ro DK, Mah N, Ellis BE, Douglas CJ (2001). Functional

- characterization and subcellular localization of poplar (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol*, 126: 317~329
- Ryan KG, Swinny EE, Markham KR, Winefield C (2002). Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry*, 59: 23~32
- Sakamoto W, Zaltsman A, Adam Z, Takahashi Y (2003). Coordinated regulation and complex formation of yellow variegated1 and yellow variegated2, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes. *Plant Cell*, 15: 2843~2855
- Sewalt VJ, Ni W, Blount JW, Jung HG, Masoud SA, Howles PA, Lamb C, Dixon RA (1997). Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of *L*-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol*, 115: 41~50
- Schomburg D, Schomburg I, Chang A (2006). Class 1 Oxidoreductases XIEC 1.14.11-1.14.14. *Springer Handbook of Enzymes*, 26: 281~288
- Whetten RW, Sederoff RR (1992). Phenylalanine ammonia-lyase from loblolly pine: purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clones. *Plant Physiol*, 98: 380~386
- Whetten R, Sederoff R (1995). Lignin biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 1001~1013
- Xu Z, Zhang D, Hu J, Zhou X, Ye X, Reichel KL, Stewart NR, Syrenne RD, Yang X, Gao P et al (2009). Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. *BMC Bioinformatics*, 10 (Suppl 11): S3
- Yan L, Liu S, Zhao S, Kang Y, Wang D, Gu T, Xin Z, Xia G, Huang Y (2012). Identification of differentially expressed genes in sorghum (*Sorghum bicolor*) brown midrib mutants. *Physiol Plant*, 146: 375~387
- Yan L, Xu C, Kang Y, Gu T, Wang D, Zhao S, Xia G (2013). The heterologous expression in *Arabidopsis thaliana* of sorghum transcription factor SbbHLH1 downregulates lignin synthesis. *J Exp Bot*, 64: 3021~3032