DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.02.010

毛竹肉桂酰辅酶 A 还原酶基因 PeCCR 功能初步研究

徐浩,杨克彬,朱成磊,李英,高志民*

(国际竹藤中心,竹藤资源基因科学与基因产业化研究所,国家林业和草原局/北京市竹藤科学与技术重点开放实验室,北京 100102)

摘要:[目的]为研究肉桂酰辅酶 A 还原酶 (CCR) 基因表达对竹子木质素生物合成的影响,对毛竹 (Phyllostachys edulis (Carrière) J. Houz.) 中 PeCCR 基因的表达情况进行分析,并对 PeCCR 基因功能进行研究,以期为利 用 CCR 基因在竹子中开展基因工程育种提供参考依据。[方法]采用实时定量 PCR(qRT-PCR)方法对 PeC-CR 基因在毛竹不同组织以及不同高度笋中的表达进行了分析,采用 RT-PCR 方法克隆了 PeCCR 基因的编码 区,构建了基因过量表达载体,采用蘸花法转化拟南芥 (Arabidopsis thaliana L.),采用溴乙酰法测定转基因植 株茎木质素的含量。[结果]qRT-PCR 结果表明:在毛竹实生苗根中 PeCCR 的表达量最高,其次是笋中,而未 展开叶中最低;在野外随着笋高度的增加,木质化程度加强,PeCCR 基因的表达量呈上升趋势,在 6.7 m 笋中 达到最高。克隆获得 PeCCR 编码区长度为 1 026 bp,编码一个 341 aa 的蛋白,具有家族蛋白特有的保守结构 域"NWYCYGK"。与野生型拟南芥相比,转 PeCCR 基因植株叶片明显增大,且抽苔时间提前 3~4 d。茎横切的 组织化学染色观察发现:转基因植株茎的木质部和束间纤维组织染色面积均大于野生型;木质素含量测定表 明,2个过表达 PeCCRI 转基因椎系中的木质素含量均明显高于野生型,分别为野生型对照的 123.1% 和 116.7%。[结论]PeCCR 基因在毛竹不同组织的表达存在差异,在笋中随高度增加其表达量上调。过量表达 PeCCR 促进了转基因拟南芥植株的生长发育,提高了木质素含量。 关键词:毛竹;肉桂酰辅酶 A 还原酶基因;表达分析;木质素

中图分类号: S722.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1498(2020)02-0077-08

竹子是我国最具价值的森林资源之一,在保障 生态安全、木材安全等方面均发挥着重要作用。竹 材优良的材性,是由竹子生长遗传和环境共同决定 的,不同竹种及同一竹种不同产地的竹材材性存在 着较大差异^[1-3]。虽然竹材材性不同程度地受到不 同抚育垦复措施^[4]、施肥^[5-6]、钩稍^[7]等栽培措施的 影响,但遗传差异是决定材性的主要内在因素。木 质素含量是影响木材材性的重要因素,木质素生物 合成涉及多种结构基因、调节基因和 miRNA^[8-10]。 人们已经从遗传角度来研究竹子的材性特征,并开 始借助分子生物学手段研究竹材材性的生物合成调 控,如参与竹子木质素生物合成的基因 CoCOMT^[11]、 PePAL1^[12]、C4H^[13] 和 PeLAC^[14] 等,参与纤维素合 成的 PeCesA1~7^[15],参与木聚糖合成的 PeIRX9 和 PeIRX10^[16] 等。虽然对这些基因仅是初步研究,但 对认识竹子木质素的生物合成以及竹材材性的遗传 调控分子机制具有重要意义。

肉桂酰辅酶 A 还原酶 (CCR) 是木质素合成的 特异途径中的关键酶之一, 该酶以 3 种羟基桂酸的 辅酶 A 酯 (香豆酰辅酶 A、阿魏酰辅酶 A、芥子酰 辅酶 A) 作为底物,催化生成相应的肉桂醛,在木 质素生物合成中起主导作用^[17]。关于 CCR 基因及

基金项目:国际竹藤中心基本科研业务费专项资金项目(1632019008)

收稿日期: 2019-07-29 修回日期: 2020-01-20

^{*} 通讯作者: 高志民, 博士, 研究员. 研究方向: 竹藤生长发育分子基础. Email: gaozhimin@icbr.ac.cn

其编码蛋白的研究,已在拟南芥 (Arabidopsis thaliana L.)、水稻 (Oryza sativa L.)、小麦 (Triticum aestivum L.) 和玉米 (Zea mays L.) 等多种植物中开 展^[18]; 而对竹子 CCR 基因的研究仅有 2 例报道, 即从七彩红竹 (Indosasa hispida M. cv. Rainbow) 克 隆了 IhCCR-1^[19]和从巴拉圭瓜多竹 (Guadua paraguavanan) 中得到了 GpCCR 基因,并研究了 GpCCR 在不同组织中的表达模式^[20]。然而,对于 竹子 CCR 基因功能研究尚未得到深入开展。本研 究以毛竹 (Phyllostachys edulis (Carrière) J. Houz.) 为 研究对象, 克隆 PeCCR 基因, 利用实时定量 PCR 技术对其在不同组织中以及不同高度笋中的 表达情况进行了分析,并利用在拟南芥异位表达的 方法对其功能进行了初步研究,以期为揭示 CCR 基因在竹子木质素生物合成中的功能以及对 竹材材性形成的影响提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究以毛竹为对象,分别以实生苗(0.5 a)和野外毛竹为材料,其中,前者是用购买自广西 桂林的毛竹种子在实验室条件下播种培养(培养基 质为腐殖土:蛭石=6:4,温度≈25℃,光照强度≈ 300 µmol·m⁻²·s⁻¹)的毛竹,取不同组织样品用于基 因表达组织特异性分析;后者是直接采取江西南 昌(28°45'58" N,115°45'39" E,海拔 399.0 m)野外 生长的毛竹,选取不同发育阶段的竹笋(0.2、1.0、 3.0、6.7 m),取笋基部(生根节的上部约1 cm 处切取竹壁,约1 cm×1 cm)为样品,一部分用 FAA 固定液固定,用于切片观察;另一部分用液 氮淬冻处理后用干冰运回实验室,存放于-80℃冰 箱,用于 RNA 提取。

1.2 不同高度笋切片观察

取上述经 FAA 固定液固定的毛竹笋样品,按 照文献 [21] 方法,用聚乙二醇(PEG)将材料固 定,制作切片(厚度 10~15 μm),用 0.05%的甲苯 胺蓝 O (TBO) 染液染色后镜检观察,拍照记录。

1.3 RNA 分离与 cDNA 的合成

将上述所取毛竹实生苗不同组织样品和野外毛 竹笋的样品,在液氮中研磨成粉末,采用 Trizol 试 剂,按照文献 [22] 方法提取各样品的总 RNA,按 照反转录试剂盒操作说明书 (Promega 公司) 合成 cDNA,存-20℃ 用于基因表达模式分析和克隆。

1.4 基因定量表达分析

根据毛竹 *CCR* 基因 (PH01001334G0240) 序列 设计定量引物 qPeCCR-F 和 qPeCCR-R(表 1)。以毛 竹 *PeNTB* 作为内参基因^[23],分别以毛竹实生苗不 同组织样品和野外毛竹笋不同样品的 cDNA 为模 板,进行 *PeCCR* 基因表达的定量分析。采用 Roche Light Cycler[®]480 SYBR Green I Master 试剂 盒在耶拿公司 QTower 仪器上进行 qRT-PCR 实 验,反应体系 (10 µL) 为: 5.0 µL 的 2×SYBR Green I Mastermix, 0.8 µL cDNA,正向引物和反向引物 各 0.2 µL(10 µmol·L⁻¹),加 ddH₂O 至反应总体积为 10.0 µL。qPCR 程序: 95°C10 min; 95°C 10 s; 60°C10 s;共40个循环。并应用 2^{-ΔΔCt} 算法^[24]分 析实验结果。另外,利用前期本实验室毛竹叶、早 花期花序、晚花期花序、地下茎、根、笋 20 cm 及

表1 PCR 扩增所用引物

Table 1	Primers	used in	PCR
---------	---------	---------	-----

引物名称 Primer name	引物序列 (5'~3') Primer sequence (5'~3')	用途 Application
qPeCCR-F	TCGTCCATCGGCACAGTGTAC	PeCCR定量表达分析
qPeCCR-R	CCGTCTTAGCGTAGCAGTACCAG	PeCCR quantitative analysis
PeNTB-F	TCTTGTTTGACACCGAAGAGGAG	毛竹内参基因扩增
PeNTB-R	AATAGCTGTCCCTGGAGGAGTTT	Amplification of internal reference gene in moso bamboo
PeCCR-F	ATGCCGATCGAGACAGCCGT	编码区克隆、半定量分析
PeCCR-R	TCACGAGGTGATGAGATTGTCGTG	Coding region cloning and semi-quantitative analysis
PeCCR-F1	CGGGATCCATGCCGATCGAGACAGCCGT	表达载体构建
PeCCR-R1	GCTCTAGATTACGAGGTGATGAGAATGTCGTG	Expression vector construction
AtUbiquitin-F	ATGGCTGAAGAGGATATCCAGC	拟南芥内参基因扩增
AtUbiquitin-R	GAAACACTTCATATGGACGATGG	Amplification of internal reference gene in Arabidopsis

第 50 cm 等 7 个不同组织的转录组数据^[25],分析 *PeCCR* 在不同组织中的表达情况。

1.5 基因克隆与载体构建

根据 PeCCR 序列 (PH01001334G0240) 的编码 区序列和植物表达载体 pC1301-35S-OCS^[26] 的多克 隆位点,设计基因克隆引物 (PeCCR-F 和 PeCCR-R) 和添加酶切位点 (BamH I 和 Xba I) 的载体构建引 物 (PeCCR-F1 和 PeCCR-R1)(表 1)。以毛竹笋 cDNA 为模板,用 PeCCR-F 和 PeCCR-R 扩增,获 得编码区的片段。经测序验证正确后,以测序正确 的质粒为模板用 PeCCR-F1 和 PeCCR-R1 扩增,采 用 BamH I 和 Xba I 双酶切将 PeCCR1 连接到植物 表达载体 pC1301-35S-OCS 的多克隆位点,形成植 物过量表达载体。

1.6 转基因拟南芥植株的筛选与分子鉴定

将过量表达载体 pC1301-35S-PeCCR-OCS 质 粒转入农杆菌 (Agrobacterium tumefaciens Smith & Townsend)菌株 GV3101中,培养并获得阳性克隆 菌株。经菌液 PCR 验证正确后,对单克隆阳性菌 株进行培养,按照蘸花法^[27]转化模式植物拟南芥 (Col-0),并收获种子 (T0代)。用潮霉素 (Hyg, 50 μg·mL⁻¹)对 T0 代种子进行筛选,获得抗性植株 并用 PCR 进行检测验证,继续用潮霉素筛选至纯 合的转基因植株作为后续实验的材料。采用半定 量 RT-PCR 方法验证在转基因拟南芥中的表达情 况,同时以拟南 AtUbiquitin (NM180850)为内参基 因^[28]。

1.7 转基因拟南芥的表型分析与木质素含量测定

播种纯合的转基因拟南芥株系,直接观察植株 生长的表型变化。取生长 6 周的植株基部莲座叶以 上 2 cm 的拟南芥茎,用 7% 琼脂固定后,进行切 片制作 (厚度约 40 μm),经用 0.05% 的 TBO 染色 后制作临时切片,观察拟南芥茎中木质素的 情况。

另外,取基部莲座叶以上3 cm 的拟南芥茎, 用溴乙酰法测定其中木质素的含量,参照齐一生物 科技(上海)有限公司的木质素含量检测试剂盒(货 号:QYS-237008)说明书进行,同时以同期的野 生型拟南芥作为对照。按照以下公式计算木质素 含量(mg·g⁻¹):

木质素 =
$$\frac{(\Delta A - 0.006 \ 8) \times V_{\text{反意}} \times 10^{-3} \times 7}{0.027 \ 76 \times W}$$

式中: Δ*A* 为测定管 *OD*₂₈₀ 值-空白管 *OD*₂₈₀ 值; *V*_{反总}为反应总体积 2.04 mL; *W* 为样本质量; *T* 为稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 PeCCR 克隆与分析

用引物 PeCCR-F和 PeCCR-R进行 PCR扩 增,产物电泳结果显示:约在1.0kb 出现1条特异 条带,与预期目的基因大小一致,回收、克隆并送 公司测序。测序结果表明:目的基因序列长度为 1026 bp,序列与毛竹基因组数据库中 PH01001334 G0240 和 NCBI 数据库中毛竹 cDNA(FP099901.1) 的编码区完全一致,命名为 PeCCR。该基因编码 一个 341 aa 的蛋白,该蛋白包含肉桂酰辅酶 A 还 原酶家族蛋白特有的保守结构域"NWYCYAK", 以及植物 CCR 特有的 NAD(P) 结合位点和识别区^[17] (图 1)。

2.2 PeCCR基因的组织表达特异性分析

根据毛竹转录组数据^[28]中 PH01001334G0240 的 RPKM 值,分析发现: PeCCR 在毛竹鞭、20 cm 笋和 50 cm 笋中没有检测到表达,在根和叶中表达 的 RPKM 值分别为 2.380 64 和 1.832 46。由此表 明,在不同组织中的表达存在明显差异。利用 qRT-PCR 方法对实验室毛竹实生苗不同组织中 PeCCR 的基因表达分析表明: PeCCR 在各个组织 中均有表达,但表达量差异明显,其中,在茎中的 表达最低,根中表达量最高,其次是笋芽和叶片, 在叶鞘和未展开叶中的表达量比较相近且相对较 低(图 2)。这与转录组数据 PeCCR 在根中的 RPKM 值最高相一致,但不同于笋中没有检测到表达。

2.3 竹笋木质化程度与 PeCCR 表达分析

对毛竹笋样品的 TBO 染色镜检观察表明:随着毛竹笋高度的增加,维管束的染色加深区域明显逐渐扩大,尤其是厚壁细胞颜色明显逐渐加深,表明笋的木质化程度逐渐加强(图3)。笔者推测 PeCCR 的表达与竹子的木质化有关,参与木质素的生物合成,为此,对 PeCCR 在不同高度笋中的表达进行了定量分析。结果(图4)表明:PeCCR 在 0.2 m 笋中的表达量相对较低,在 1.0 m 笋中迅速上升(约是 0.2 m 笋中的 16 倍), 3.0 m 笋中基本保持 1.0 m 笋中的水平,而 6.7 m 笋中 PeCCR 的表达量又有所上升,约是 0.2 m 笋中的 18 倍。由此

表明, PeCCR 基因的表达随着笋高度的增加呈上升趋势,这与竹笋的木质化程度逐渐加深相一致。

1 ATGCCGATCGAGACAGCCGTGCCGGCCCTCCCCGGCCACGGCCGCACGGTGTGCGTCACC M P I E T A V P A L P G H G R T V C V 61 GGCGCCGGCGGCTTCATCGCGTCGTGGCTCGTGAAGCGCCTCCTCGAGAAGGGCTACACC G F А SWL V K Т R L Е GTGCGCGGCACCGTCCGGAACCCTGCTGACCCTAAGAATGACCACCTGAGAGCGCTCGAT 121 R G T V R N P A D P K N D H L R A L D V 181 GGCGCCGCCGACCGCCTCGTCCTCCGCGCCGACCTGCTCGATCCCGGCAGCCTCGTC G A A D R L V L L R A D L L D P G S L V 241 GCGGCGTTCGCCGGCTGCGAGGGCGTCTTCCACGCCGCCTCCCCCGTCACCGATGACCCT A A F A G C E G V F H A A S P V T D D P 301 GAGAAGATGATCGAGCCGGCGATCCGGGGGGACGAGGTACGCGATCACGGCAGCCGCCGAC E K M I E P A I R G T R Y A I T A A A D ACCGGCATCAAGCGCGTGGTGTTCACGTCGTCCATCGGCACAGTGTACATGAACCCCTAC 361 T G I K R V V F T S S I G T V Y M N P Y 421 CGGGACCCCAACAAGCCGGTCGACGACACCTGCTGGAGTGACCTCGACTACTGCAAGAGG R D P N K P V D D T C W S D L D Y C K R 481 ACAGAGAACTGGTACTGCTACGCTAAGACGGTGGCCGAGCAGGGCGCGTGGGAGGTGGCG TE<u>NWYCYAK</u>TVAEQGAWEVA 541 AGGAAGCGCGGCGTGGACCTGATCGTGGTGAACCCGGTGCTGGTGCTCGGCCCGCTGCTG R K R G V D L I V V N P V L V L G P L L 601 CAGCCGACGGTGAACGCGAGCACGGAGCACGTGATGAAGTACCTGACGGGGTCGGCCAAG P T V N A S T E H V M K Y L T G S A K 661 Y V N A A Q A Y V H V K D V A E A H V Т CGCGTGTACGAGGCCCCGGCCGCGCACGGCCGCTACATCTGCGCCGAGAGCACCCTCCAC 721 R V Y E A P A A H G R Y I C A E S T L H 781 CGCGGCGAGCTCTGCCGCGTCCTCGCCAAGCTCTTCCCCGAGTACCCCGTACCCAACG R G E L C R V L A K L F P E Y P V P T K TGCAAGGACGAGGTGAGCCCTCCGGTGAAAGGGTACAAGTTCACGAACCAGAGGCTCAAG 841 C K D E V S P P V K G Y K F T N Q R L K 901 GACCTGGGGATGGACTTCGTGCCGGTGCTGCAGTGCCTATACGAGACTGTGAAGAGCCTC D L G M D F V P V L Q C L Y E T V K S L 961 CAGGAGAAAGGCATGCTGCCCATGCTCCCGCCCAACGACCACCACGACATTCTCATCACC QEKGMLPMLPPNDHHDILIT 1021 TCGTGA

注: 单下划线: NAD(P) 结合区; 双下划线: NADP 特异性; 波浪下划线: CCR 催化基序。

S

Notes: NAD (P) binding region; Double underline: NADP specificity; Wavy underline: CCR catalytic motifs.

图 1 PeCCR 的核酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *PeCCR*

2.4 PeCCR 载体构建与验证

以测序正确的 PeCCR 质粒为模板,用 PeCCR-F1 和 PeCCR-R1 扩增的结果表明,获得了预期目的片段(图略)。回收、克隆并送公司测序表明,目的片段包含了酶切位点 BamH I 和 Xba I 序列及 PeCCR 的编码区序列。采用 BamH I 和 Xba I 双酶切将 PeCCR 连接到植物表达载体,形成过量表达载体 pC1301-35S-PeCCR-OCS(图 5A),质粒酶切(图 5B)进一步证明获得了正确的 PeCCR 植物过量表达载体。

2.5 转 PeCCR 拟南芥检测与表型分析

将 pC1301-35S-PeCCR-OCS 质粒转入农杆菌, 并转化拟南芥。对获得的纯合株系表型分析发现, 与野生型相比,转 PeCCR 基因植株叶片明显增 大,且抽苔时间提前 3~4 d,由此表明:过量表达 PeCCR 促进了转基因株系的生长发育。利用 RT-



注: 1: 茎; 2: 未展开叶; 3: 根; 4: 叶片; 5: 笋; 6: 叶鞘。 Notes: 1: Stem; 2: Undeveloped leaf; 3: Root; 4: Leaf blade; 5: Shoot; 6: Leaf sheath.

图 2 PeCCR 在毛竹不同组织中表达分析

Fig. 2 Expression analysis of *PeCCR* in different tissues of moso bamboo



注: A: 0.2 m; B: 1.0 m; C: 3.0 m; D: 6.7 m。标尺: 100 µm。pc: 薄壁细胞; sc: 厚壁细胞; mv: 后生木质部导管。 Notes: A: 0.2 m; B: 1.0 m; C: 3.0 m; D: 6.7 m. Scale bar: 100 µm. pc: parenchyma cells; sc: sclerenchymatous cells; mv: metaxylem vessel.

图 3 毛竹不同高度笋维管束的横切面

Fig. 3 Transverse sections of vascular bundle in bamboo shoot with different heights.

PCR 对获得转基因植株中 PeCCR 表达进行了半定量分析,电泳结果(图 6)显示:在 2 个转基因株系中均检测到 PeCCR 基因表达,而野生型拟南芥中未检测到 PeCCR 基因表达,且 2 个转基因株系







图 5 PeCCR 过量表达载体 (A) 及其酶切检测 (B) Fig. 5 Overexpression vector of PeCCR (A) and its detection with enzyme digestion (B) (Line1 和 Line2) 中 *PeCCR* 基因的表达量不同,转基因株系 Line1 中的表达量高于 Line2。

茎的横切组织化学染色观察显示:转 PeCCR 基因植株中木质部和束间纤维组织的染色面积均大 于野生型(图 7),说明转基因植株茎中的木质素多 于野生型植株。采用乙酸-溴乙酰法对 PeCCR1转 基因株系木质素含量测定结果(图 8)表明:2个 过表达 PeCCR转基因株系中的木质素含量均明显 高于野生型,L1和L2分别为对照的123.1%和 116.7%,且L1高于L2,这与组织化学染色法取得 的结果相一致,也和2个株系中 PeCCR的表达量 相一致。由此表明,过表达 PeCCR 基因促进木质 素的生物合成,木质素含量增加达到显著性水平 (p<0.01)。

3 讨论

目前,木材安全已经上升到我国国家战略的高度,随着天然林保护政策的实施,木材供给不足的问题日益突出。竹材已成为木材资源的重要替代



注: L1: 株系 1; L2: 株系 2; WT: 野生型 (Col-0)。 Notes: L1: Line1; L2: Line2; 3: Wild type (Col-0).

图 6 转基因植株中 PeCCR 基因表达的分析

Fig. 6 Gene expression analysis of *PeCCR1* in transgenic plants



注: co: 皮层; xy: 木质部; if: 束间纤维; ph: 韧皮部。标尺=50 μm。 Notes: co: cortex; xy: xylem; if: interfascicular fiber; ph: phloem. Bar=50 μm.

图 7 拟南芥茎横切面

Fig. 7 Transverse sections of Arabidopsis stem overexpressing PeCCR





图 8 过量表达 PeCCR 拟南芥茎木质素含量分析 Fig. 8 Lignin content analysis of Arabidopsis stem overexpressing PeCCR

品,有效缓解了木材的供需矛盾,在我国区域经济 发展和生态保护当中都发挥着不可替代的作用。研 究竹材形成的分子机制,对于未来竹子的分子育种 具有重要价值。毛竹基因组草图的发表与数据应 用^[25, 29],为从毛竹中克隆目的基因,研究其功能提 供了方便。本研究克隆了木质素生物合成途径中的 关键酶基因 PeCCR,其编码蛋白长度 (341 aa) 比七 彩红竹的 IhCCR-1 (345 aa) 和巴拉圭瓜多竹 (354 aa) 略短,但都含有 CCR 家族特有的蛋白保守结构 域,是CCR家族成员之一。毛竹CCR家族包含 17个成员^[30],在基于毛竹、水稻和拟南芥 CCR 氨 基酸序列构建的系统进化树中,毛竹各 CCR 成员 均与单子叶植物水稻聚类到较近的位置,而与拟南 芥的距离相对较远(图略),这与前期研究相一 致^[31],且 PeCCR 与水稻的 OsCCR4 (OS09G04050) 聚类在一起,二者的蛋白相似系数为88.2%,而 OsCCR4 是功能性 CCR 的候选者^[32],表明 PeCCR 与 OsCCR4 可能具有相似的功能。

基于转录组数据的表达谱和实时定量 PCR 的 结果都表明, PeCCR 在毛竹根中的表达丰度最 高,与小麦的Ta-CCR2(AY771357.1)在根中表达丰富^[33] 相类似。切片组织化学染色结果表明,毛竹笋的木 质化程度随着笋高度的增加而不断加强,且其中 PeCCR 的基因表达量呈上升趋势,这与小麦处于 木质化的根中 Ta-CCR2 高表达相一致^[33]。研究表 明,体外重组 Ta-CCR2 蛋白对阿魏酰 CoA、5-OH-阿魏酰 CoA、芥子酰 CoA 和咖啡酰 CoA 具有 几乎相似的转化效率,表明它参与愈创木基木质 素 (guaiacyllignin, G型木质素)和紫丁香基木质素 (syringyllignin, S型木质素)合成^[33]。PeCCR与Ta-CCR2的氨基酸序 (AAX08107.1)一致性为87.1%。 在拟南芥中过量表达 PeCCR,促进了转基因植株 的生长发育和开花提前,显著提高其茎中木质素含 量,进一步表明具有参与木质素生物合成的功能。 另外,研究表明,CCR基因还能通过影响微纤夹 角来影响木材材质的密度和硬度^[34]。由此表明,毛 竹材性形成过程中,PeCCR可能是通过参与调控 木质素含量、木质素单体比例等多个方面来影响其 材性的,但其在毛竹中的具体功能有待于深入 研究。

4 结 论

本研究从毛竹克隆了 PeCCR 基因,用 RT-PCT 技术证明该基因在毛竹实生苗不同组织中存在 表达差异;在野外随竹笋高度的增加,木质化程度 加强,PeCCR 基因表达量上调;在拟南芥中过量 表达 PeCCR,促进了转基因植株的生长发育,开 花提早,木质素含量增加。本研究对于深入研究竹 子木质素合成调控与竹材材性形成机制具有重要参 考价值。

参考文献:

- [1] 王昌命, 王锦王, 文久木, 等. 云南主要竹材材性与制浆造纸性能分析[J]. 中国造纸, 2008, 27(8): 10-12, 22.
- Yang X Y, Fu M Y, Xie J Z, et al. Geographic variation and provenance selection for bamboo wood properties in Bambusa chungii[J]. Journal of Forestry Research, 2009, 20(3): 261-267.
- [3] 郭子武, 陈双林, 杨清平, 等. 牡竹属三竹种的秆形质量与材性比较[J]. 热带亚热带植物学报, 2011, 19(4): 328-332.
- [4] 曹碧凤. 不同经营措施对毛竹材用林竹材生物量的影响[J]. 安徽 农学通报(上半月刊), 2011, 17(19): 105-107.
- [5] 杨清平,林 华,郭子武,等.施肥对毛竹竹材物理力学性质的影响[J].中南林业科技大学学报,2013,33(8): 28-31.
- [6] 周紫球,陆媛媛,范伟青,等.肥料对5年生毛竹竹材物理力学性质 的影响[J].浙江农林大学学报,2013,30(5):729-733.
- [7] 桂仁意, 邵继锋, 俞友明, 等. 钩梢对5年生毛竹竹材物理力学性质 的影响[J]. 林业科学, 2011, 47(6): 194-198.
- [8] Lu S, Li Q, Wei H, et al. Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(26): 10848-10853.
- [9] Yoon J, Choi H, An G. Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development[J]. Journal of Integrative Plant Biology,

2015, 57(11); 902-912.

- [10] Gui J, Luo L, Zhong Y, et al. Phosphorylation of LTF1, an MYB transcription factor in *Populus*, acts as a sensory switch regulating lignin biosynthesis in wood cells[J]. Molecular Plant, 2019, pii: S1674-2052(19)30173-X.
- [11] 李雪平, 高志民, 彭镇华, 等. 绿竹咖啡酰辅酶A-O-甲基转移酶基因的克隆与分析[J]. 分子植物育种, 2008, 6(3): 587-592.
- [12] 高志民, 彭镇华, 李雪平, 等. 毛竹苯丙氨酸解氨酶基因cDNA全长的克隆及组织表达分析[J]. 林业科学研究, 2009, 22(3): 449-453.
- [13] 金顺玉, 卢孟柱, 高 健. 毛竹木质素合成相关基因*C4H*的克隆及 组织表达分析[J]. 林业科学研究, 2010, 23(3): 319-325.
- [14] 李利超, 孙化雨, 娄永峰, 等. 毛竹漆酶基因PeLAC的克隆与表达分析[J]. 植物科学学报, 2017, 35(2): 252-259.
- [15] 袁丽钗. 毛竹纤维素生物合成相关基因研究[D]. 北京:中国林业 科学研究院, 2009.
- [16] Zhang H, Ying Y Q, Wang J, et al. Transcriptome analysis provides insights into xylogenesis formation in Moso bamboo (*Phyllostachys* edulis) shoot[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 3951.
- [17] Lacombe E, Hawkins S, Van D J, et al. Cinnamoyl-CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships[J]. The Plant Journal, 1997, 11(3): 429-441.
- [18] Barakat A, Yassin N B, Park J S, et al. Comparative and phylogenomic analyses of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamoyl-CoA-reductase-like gene family in land plants[J]. Plant Science, 2011, 181(3): 249-257.
- [19] 缪福俊, 原晓龙, 陈 剑, 等. 七彩红竹*lhCCR*-1基因的克隆与分析
 [J]. 西部林业科学, 2015, 44(5): 57-61, 75.
- [20] 朱金鑫, 孙金金, 原晓龙, 等. 巴拉圭瓜多竹CCR基因的克隆与分析 [J]. 竹子学报, 2016, 35(2): 10-15.
- [21] Yang K B, Li Y, Wang S N, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the MYB transcription factor in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*)[J]. Peer J, 2019, 11(6): e6242.
- [22] Gao Z M, Li X P, Li L B, et al. An effective method for total RNA isolation from bamboo[J]. Chinese Forestry Science and Technology, 2006, 5(3): 52-54.

- [23] Fan C, Ma J, Guo Q, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*)[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56573.
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-△△Ct} method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] Peng Z H, Lu Y, Li L B, et al. The draft genome of the fast growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*)[J]. Nature Genetics, 2013, 45(4): 456-461.
- [26] 孙化雨,陈 颖,赵韩生,等.毛竹β-胡萝卜素羟化酶基因的分子特征及其功能[J].林业科学,2015,51(10):53-59.
- [27] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 1998, 16(6): 735-743.
- [28] Yang L, Lou Y, Peng Z, et al. Molecular characterization and primary functional analysis of *PeMPEC*, a magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase gene of bamboo (*Phyllostachys edulis*)[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(11): 2001-2011.
- [29] 赵广枝,孙化雨,赵韩生,等.毛竹基因组测序及数据应用研究现状[J].世界竹藤通讯,2015,13(3):8-12.
- [30] Zhao H S, Gao Z M, Wang L, et al. Chromosome-level reference genome and alternative splicing atlas of moso bamboo (*Phyllostachys* edulis)[J]. Gigascience, 2018, 7(10): giy115.
- [31] 徐 浩,王思宁,赵韩生,等.毛竹CCR基因家族成员生物信息学和 表达模式分析[J].基因组学和应用生物学,2019,38(3):1168-1177.
- [32] Park H L, Bhoo S H, Kwon M, et al. Biochemical and expression analyses of the rice cinnamoyl-CoA reductase gene family[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 2099.
- [33] Ma Q H, Tian B. Biochemical characterization of a cinnamoyl-CoA reductase from wheat[J]. Biological Chemistry, 2005, 386(6): 553-560.
- [34] He X, Hall M B, Gallo-Meagher M, et al. Improvement of forage quality by downregulation of maize O-Methyltransferase[J]. Crop Science, 2003, 43(6): 2240-2251.

Preliminary Study on the Function of Cinnamoyl-CoA Reductase Gene *PeCCR* of Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*)

XU Hao, YANG Ke-bin, ZHU Cheng-lei, LI Ying, GAO Zhi-min

(Institute of Gene Science and Industrialization for Bamboo and Rattan Resources, International Center for Bamboo and Rattan, State Forestry and Grassland Administration / Beijing Key Open Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China)

Abstract: [Objective] To reveal the effect of cinnamoyl-CoA reductase (CCR) gene expression on bamboo lignin, the expression of *PeCCR* in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) was analyzed, and the gene function of *PeCCR* was studied, which provided a reference for bamboo breeding using genetic engineering with CCR gene. [Method] Realtime quantitative PCR (qRT-PCR) was used to analyze the expression of *PeCCR* in different tissues and the shoots with different heights of moso bamboo. The coding region of PeCCR was cloned by RT-PCR and its overexpression vector was constructed. PeCCR was transformed into Arabidopsis thaliana by floral dip method, and the content of lignin in transgenic plants was determined by bromoacetyl method. [Result] The results of qRT-PCR showed that the expression level of *PeCCR* was the highest in the roots of moso bamboo seedling, followed by the shoots, and the lowest in the unexpanded leaves. Under the natural environment, with the increase of bamboo shoot height, the degree of lignification increased, and the gene expression of *PeCCR* showed an upward trend, reaching the highest in 6.7 m bamboo shoots. The coding region of *PeCCR* was 1 026 bp, encoding a 341 as protein with a conserved domain of "KNWYCYGK" unique to the CCR family. Phenotypic analysis showed that compared with the wild type, the leaves of *PeCCR* transgenic Arabidopsis plants became larger obviously, and the bolting time was 3-4 days earlier. The histochemical staining of stem transverse sections showed that the staining area of xylem and inter-fiber tissue in transgenic plants were larger than that of wild type. The lignin measurement demonstrated that the lignin content of two transgenic lines overexpressing *PeCCR1* was significantly higher than that of wild type (123.1% and 116.7% of the wild type control, respectively). [Conclusion] *PeCCR* was differently expressed in different tissues of moso bamboo, and it was upregulated in bamboo shoots with increasing height. Overexpression of *PeCCR* promoted the growth and development of transgenic Arabidopsis plants with increased lignin content.

Keywords: Phyllostachys edulis; Cinnamoyl-CoA reductase gene; Expression analysis; Lignin

(责任编辑:张研)