

## 高粱 *SbCAD4* 基因的克隆与序列分析及原核表达分析

王丽华, 李杰勤\*, 詹秋文, 樊飞飞

(安徽科技学院农学院, 安徽 凤阳 233100)

**摘 要:** 以高粱品系早亨加利为材料, 通过 RT-PCR 扩增, 克隆高粱 *SbCAD4* 基因。测序结果表明, 克隆的 *SbCAD4* 基因与 NCBI 基因库中高粱 IS11861 品系只在编码序列第 548 位有 1 个碱基的差异, 而二者的氨基酸序列完全一致。进化树分析结果表明, *SbCAD4* 与拟南芥、水稻、玉米的木质素合成 CAD 基因位于同/L1 个群中。比对分析结果表明, *SbCAD4* 与木质素合成基因具有相同的结构域。将构建正确的重组质粒(pMAL-SbCAD4)转化入大肠杆菌菌种 BL21 中进行诱导表达的结果表明, IPTG 的最佳诱导浓度为 0.5 mmol/L。经 Amylose Resin 亲和层析柱纯化后, *SbCAD4* 融合蛋白在 SDS-PAGE 电泳分析时呈现 1 条蛋白带。利用纯化的蛋白对 *SbCAD4* 进行酶活测定, 其酶动力学参数  $K_m$  值为 5.2  $\mu\text{mol/L}$ ,  $V_{\max}$  为 5.8  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ , 表明 *SbCAD4* 具有肉桂醇脱氢酶活性。

**关 键 词:** 高粱; *SbCAD4* 基因; 基因克隆; 序列分析; 原核表达

中图分类号: S514.035

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)06-0595-07

## Cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of gene *SbCAD4* from *Sorghum bicolor*

Wang Lihua, Li Jieqin\*, Zhan Qiuwen, Fan Feifei

(College of Agriculture, Anhui Science and Technology University, Fengyang, Anhui 233100, China)

**Abstract:** Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), which catalyzes the last step of monolignol biosynthesis, is a key enzyme in the biosynthesis of lignin. In this research, the gene *SbCAD4* from *Sorghum* line Early Hegari-sart was amplified by RT-PCR and cloned into pMD18-T. There was only one base difference between the nucleotide sequence of the cloned gene and the *SbCAD4* reference gene of *Sorghum* line IS11861. But the amino acid sequence of cloned gene was consistent with IS11861. Further phylogenetic analysis revealed that gene *SbCAD4* belonged to the first group, which contained bona fide CAD genes from Arabidopsis, rice and maize. And it was also identified that *SbCAD4* possessed the same motifs with these bona fide CAD genes through the alignment analysis. By verified a constructed recombinant plasmid (pMAL-SbCAD4) and transplanted it into *Escherichia coli* BL21, we found that the best expression concentration for *SbCAD4*-fused protein induction with IPTG was 0.5 mmol/L. The electrophoretic analysis showed that there was a single band in the SDS-PAGE gel after purified with affinity chromatography. The catalytic activity of purified protein was at the  $K_m$  value  $K_{\text{mof}}$  5.2  $\mu\text{mol/L}$  and  $V_{\max}$  value of 5.8  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ .

**Keywords:** *Sorghum*; *SbCAD4*; gene cloning; sequence analysis; prokaryotic expression

高粱(*Sorghum bicolor* (L.) Moench)是禾本科一年生草本植物,具有  $C_4$  光合系统,光合效率高,具有抗旱、耐涝、耐盐碱和适应性强等特性,在世界各国广为栽培,是世界第 5 大粮食作物<sup>[1]</sup>。高粱

的籽粒和茎秆均可饲用,是一种重要的饲用作物。相对于同为  $C_4$  植物的玉米基因组(约 2 500 Mb)和甘蔗基因组(约 930~7 440 Mb),高粱的基因组较小(约 720 Mb),且已全部测序完成,因此,高粱已逐渐

收稿日期: 2015-08-11

修回日期: 2015-10-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301383); 国家星火计划项目(2012GA710076); 安徽科技学院项目(ZRC2014437); 安徽科技学院作物学重点学科项目(AKZDXK2015A03)

作者简介: 王丽华(1980—),女,河北定州人,博士研究生,主要从事分子育种研究, wanglihuaerr@126.com; \*通信作者,李杰勤,博士,副教授,主要从事分子育种研究, lijq@ahstu.edu.cn

成为了研究  $C_4$  作物基因功能的模式作物<sup>[2]</sup>。木质素是由聚合芳香醇构成的一类高聚物,是地球上总量最大的一类次生物,占植物总生物量的 30%。对饲用作物而言,总木质素含量和木质素单体的组成比例对细胞壁的可消化性影响较大<sup>[3]</sup>。与普通饲用高粱相比,低木质素含量高粱品系的消化率有大幅度提高,其适口性更好,各种放牧家畜特别喜食,同样的饲喂量可获得更高的经济效益<sup>[4]</sup>,因此,通过基因工程技术控制木质素合成途径来改良高粱的饲用品质受到了关注。

近年来,关于拟南芥木质素单体合成基因的克隆与功能分析的研究较多,而关于高粱木质素单体合成相关基因的克隆与原核表达的研究尚少。肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)依赖于 NADPH 催化还原肉桂醛及其衍生物,它催化了愈创木基型木质素(Guaiacyl lignin, G 型木质素)、对-羟苯基型木质素(*p*-hydroxyphenyl lignin, H 型木质素)和紫丁香基型木质素(Syringyl lignin, S 型木质素)。木质素单体合成的最后一步,是木质素合成的限速酶<sup>[5]</sup>。CAD 基因最早从烟草中克隆,然后在火炬松等多种植物中被克隆和研究<sup>[6-8]</sup>。前人的研究表明,高粱 *SbCAD4* 基因与拟南芥中负责木质素合成的 *AtCAD-C* 和 *AtCAD-D* 基因具有很高的同源性<sup>[9-10]</sup>,因此, *SbCAD4* 是高粱木质素单体合成的关键酶基因。笔者以高粱品系早亨加利为试验材料,通过 RT-PCR 扩增并克隆 *SbCAD4* 基因,对其编码的蛋白序列进行生物信息学分析,实现了在大肠杆菌细胞中表达该蛋白,并在体外进行纯化和酶活测定,确认该蛋白具有肉桂醇脱氢酶活性。现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

高粱品系早亨加利在田间种植 3 周后,取其幼嫩叶片提取 RNA。

供试大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  菌株、*Escherichia coli* BL21 菌株、pMAL 质粒由南京农业大学水稻研究所提供。

### 1.2 主要试剂与仪器

RNA 提取试剂盒、TIANprep 质粒小提中量试剂盒均购自天根公司。MD18-T 载体、所有限制性内

切酶、PrimeScript 反转录酶、*T4* DNA 连接酶、DNA marker、DNA 回收试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。KOD 聚合酶购自东洋纺(上海)有限公司。SDS、IPTG、X-gal、氨苄青霉素、琼脂糖、溴化乙锭、丙烯酰胺、胰蛋白胍和酵母提取物等购自生工生物工程(上海)有限公司。Amylose Resin 层析柱购自 NEB 公司。其他试剂均为国产化学纯。

SpectraMax M3 多功能酶标仪为美谷分子仪器有限公司生产。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 高粱总 RNA 的制备及 *SbCAD4* 基因的扩增

取高粱嫩叶约 1 g,液氮速冻、磨碎后提取总 RNA。用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,并取 1  $\mu$ g 总 RNA 于 1% 琼脂糖凝胶检测。cDNA 合成反应体系为:5 $\times$ PrimeScript 缓冲液 4  $\mu$ L, PrimeScript 反转录酶混合液 1  $\mu$ L, 100 mmol/L Oligo dT 引物 1  $\mu$ L, 总 RNA 1  $\mu$ g, 10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L, 加 DEPC 处理的无菌水至 20  $\mu$ L。42  $^{\circ}$ C 反转 1 h, 70  $^{\circ}$ C 终止反应, 10 min 后于 -20  $^{\circ}$ C 保存, 备用。

根据 NCBI 中预测的 *SbCAD4* 基因序列在编码区外设计扩增引物(AB288109.1)。上游引物序列为 5'-CTCCGTCGTCGTGTTCCCC-3', 下游引物序列为 5'-ACAGACCATCCTTCAACTCAT-3'。*SbCAD4* 基因 PCR 扩增体系为 30  $\mu$ L: 2 $\times$ KOD Buffer 15  $\mu$ L, 2 mmol dNTP 6  $\mu$ L, 引物 5  $\mu$ L, KOD 酶 0.6  $\mu$ L, DNA 3  $\mu$ L 和 ddH $_2$ O 0.4  $\mu$ L。PCR 扩增反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68  $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 36 个循环; 68  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收。回收的 PCR 产物经 *Taq* DNA 聚合酶处理, 在 3' 端加 A。加 A 反应: PCR 产物 20  $\mu$ L, 2 mmol/L dNTP 6  $\mu$ L, 10 $\times$ *Taq* DNA 聚合酶缓冲液 12  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶 1  $\mu$ L, 加 ddH $_2$ O 81  $\mu$ L, 72  $^{\circ}$ C 反应 10 min。反应完成后用 DNA 回收试剂盒回收。

加 A 回收的 PCR 产物与 pMD18-T 载体进行连接反应 2 $\times$ DNA 连接预混液 2.5  $\mu$ L, PCR 产物 2  $\mu$ L, pMD18-T 载体 0.5  $\mu$ L, 16  $^{\circ}$ C 连接 8 h。5  $\mu$ L 连接反应液全部用于大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞的转化。挑取 10 个单菌落提取质粒检测, 挑选连接的阳性质粒送测序。将测序正确的重组质粒命名为 pMD18-*SbCAD4*。

### 1.3.2 高粱 *SbCAD4* 多序列联配与分子进化树的构建

高粱 CAD 基因按照 NCBI 中登录号的大小进行命名。分子进化树利用 Mega 5.1 软件构建。构建方法为邻近法。检验方法为 Bootstrap。重复 1 000 次<sup>[10]</sup>。比对分析利用 Bioedit 中的 ClustalW 命令, 用 Bioedit 软件输出比对结果。

### 1.3.3 *SbCAD4* 基因原核表达载体的构建

根据 pMAL-c2x 载体与 *SbCAD4* 基因序列, 选择合适的酶切位点, 合成加酶切位点的引物。上游引物序列为 5'-CCGGAATTTCATGGGGAGCCTGGCG-3' (加 *EcoR* I); 下游引物序列为 5'-CCCAAGCTTGTGCTCGGCGCATC-3' (加 *Hind* III)。扩增程序、方法同前。用试剂盒提取 pMAL 质粒。pMAL 质粒和扩增产物分别用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后回收连接。双酶切总体系为 40  $\mu$ L: 质粒或扩增片段 20  $\mu$ L, *EcoR* I 酶 3  $\mu$ L, *Hind* III 酶 3  $\mu$ L, 10 $\times$ M 缓冲液 4  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu$ L。酶切过夜后用 1% 琼脂糖电泳, 回收, 再用 *T4* 连接酶连接。*T4* 连接体系为 10  $\mu$ L: 10 $\times$ *T4* 连接酶缓冲液 1  $\mu$ L, *T4* 连接酶 1  $\mu$ L, 双酶切扩增片段 6  $\mu$ L, 双酶切质粒 2  $\mu$ L。连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑选单菌落提取重组质粒, 并用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定, 并将被鉴定为阳性的克隆进行测序。将测序正确的重组质粒命名为 pMAL-SbCAD4。

### 1.3.4 *SbCAD4* 基因的原核表达与融合蛋白的纯化

利用碱裂解法制备 pMAL-SbCAD4 质粒, 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞。挑取单菌落接种于 1 mL LB 液体培养基中(含 50 mg/L 的氨苄青霉素), 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养过夜。第 2 天按 1% 的接种量接种于 10 mL 新鲜 LB 培养基中(含 50 mg/L 的氨苄青霉素), 振荡培养至对数生长期( $OD_{600\text{ nm}}$  为 0.6 ~ 0.8)进行分组培养: IPTG 终浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L。30  $^{\circ}$ C 诱导培养 4 h, 12 000 r/min 离心, 收集菌体, 用 ddH<sub>2</sub>O 洗 2 遍后, 10 mmol/L PBS 缓冲液悬浮, 用 10% 的 SDS-PAGE 检测。

优化表达条件下, 将过夜的菌液按 1% 的比例接种于 100 mL LB 液体培养基(含 50 mg/L 的氨苄青霉素), 37  $^{\circ}$ C 振荡培养至菌液  $OD_{600\text{ nm}}$  为 0.6 ~ 0.8, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达, 30  $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h。4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 5 min, 收集

菌体。用 10 mmol/L PBS 缓冲液 20 mL 悬浮, 冰上超声波破碎细胞。4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 用 Amylose Resin 层析柱纯化。纯化后的蛋白用 10% SDS-PAGE 电泳检测蛋白纯度, 并用 Millipore 浓缩柱浓缩为 1.5 mL 酶液。

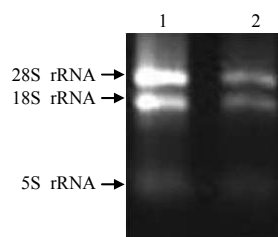
### 1.3.5 *SbCAD4* 酶活的测定

参照前人研究方法<sup>[11]</sup>对 CAD 酶活测定方法进行改进。反应体系 200  $\mu$ L: 10  $\mu$ L 的酶液(浓缩液稀释为 1 000 mg/L), 5 个不同浓度(100、200、300、400、500  $\mu$ mol)的松柏醛, 200  $\mu$ mol NADPH, 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.8)。重复 3 次。酶标仪测定  $OD_{340\text{ nm}}$  值。反应体系振荡 35 s 后测定数据。采用 Excel 2003 软件和双倒数作图法测定 CAD 的  $K_m$  和  $V_{\text{max}}$  值。

## 2 结果与分析

### 2.1 高粱总 RNA 的提取和 *SbCAD4* 基因的扩增与克隆

用同一片叶分 2 管提取高粱总 RNA, 其中 1 号样品总 RNA 量为 784  $\mu$ g/ $\mu$ L 2 号样品总量为 322  $\mu$ g/ $\mu$ L。从提取量来看, 1 号样品明显高于 2 号样品。从提取的完整性来看, 2 个样品的 28S rRNA、18S rRNA 条带清晰, 5S rRNA 较为模糊, 且亮度依次递减, 说明提取的总 RNA 降解较少, 完整性好, 质量较好(图 1)。



1 1号样品总 RNA; 2 2号样品总 RNA。

图 1 高粱总 RNA 扩增产物的琼脂糖电泳结果

Fig.1 Electrophoresis results of the extracted total RNA

以 1 号样品总 RNA 为模板反转录成 cDNA。以 1/5 体积的 cDNA 反应液为模板进行 30  $\mu$ L 的 PCR 扩增反应, 获得 1 个片段长度大于 1 000 bp、小于 2 000 bp 的单一扩增产物, 且亮度较高(图 2)。该片段大小符合预期扩增片段长度(1 300 bp), 表明扩增产物为目的基因。



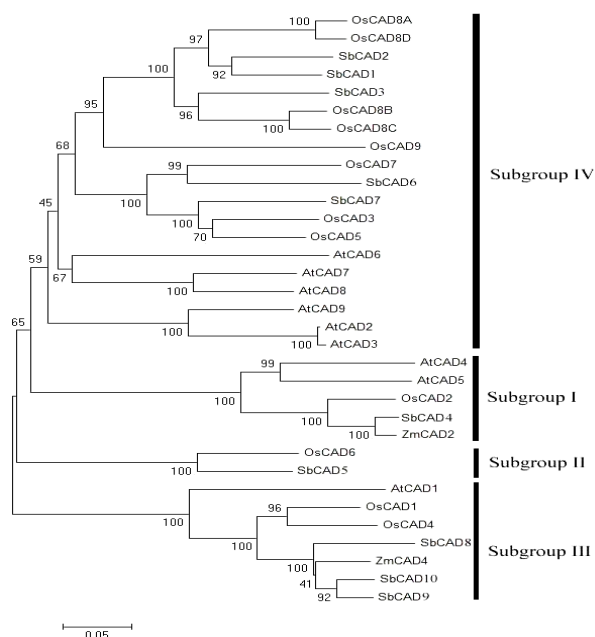
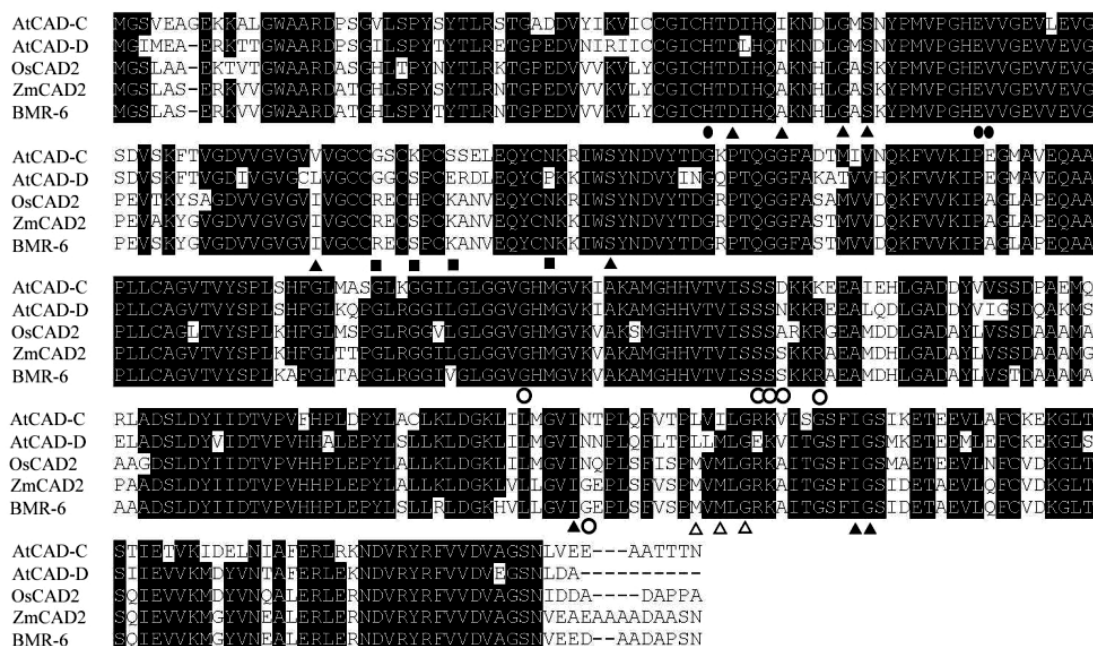


图 5 双子叶和单子叶 CAD 蛋白序列的进化树分析结果

Fig.5 Phylogenetic analysis of protein CAD sequences from monocots and dicot

结果表明，这10个CAD基因可分为4个群，其



木质素合成 CAD 蛋白序列：拟南芥 *AtCAD-C* 和 *AtCAD-D*，水稻 *OsCAD2*，玉米 *ZmCAD2* (●为  $Zn^{2+}$  结合催化位点；■为  $Zn^{2+}$  结合位点；○为 NADPH+ 结合位点；△为木质素单元结合位点 I；▲为木质素单元结合位点 II)。

图 6 *SbCAD4* 与其他物种木质素合成 CAD 的多序列联配Fig.6 Alignment from the protein sequences of *SbCAD4* and other *bona fide* lignin CAD

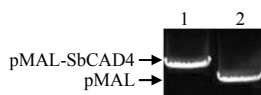
## 2.4 pMAL-SbCAD4 原核表达载体的构建及鉴定

采用双酶切再连接目的基因片断的方法构建 pMAL-SbCAD4 重组质粒。构建的重组质粒片断大于 pMAL 空质粒，表明目的基因已经插入载体中(图7)。

群I为木质素合成CAD基因，包括拟南芥的*AtCAD4* 和*AtCAD5*、水稻的*OsCAD2*、玉米的*ZmCAD2*以及高粱的*SbCAD4*；*SbCAD5* 和 *OsCAD6*属于群II；*SbCAD8*、*SbCAD9* 和 *SbCAD10* 属于群 III；*SbCAD1*、*SbCAD2*、*SbCAD3*、*SbCAD6*、*SbCAD7* 属于群IV。

为进一步研究*SbCAD4*基因与其他物种木质素合成CAD基因蛋白序列的关系，对*SbCAD4*与拟南芥、水稻和玉米中木质素合成CAD蛋白序列进行比对分析，结果(图6)表明，*SbCAD4*基因的蛋白序列与玉米*ZmCAD2*基因的相似性最高，达96%。*SbCAD4*基因具有木质素合成CAD所需要的几个结构域，包括 $Zn^{2+}$ 结合位点和催化位点、NADPH<sup>+</sup>结合位点、木质素单元结合位点I和II，因此，*SbCAD4*基因也具备木质素合成CAD的基本特征。

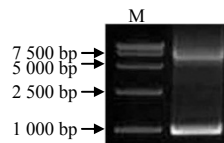
为确认已经插入目的基因，将pMAL-SbCAD4重组质粒进行双酶切检测(图8)：在1 000 bp处有 1 条明亮清晰的带，与目的基因大小(1 095 bp)一致；在5 000~7 500 bp有 1 条带，与pMAL载体大小(6 600 bp)一致。



1 重组质粒；2 空载体质粒 DNA。

图 7 pMAL-SbCAD4 重组质粒的鉴定结果

Fig.7 Identification for the recombinant plasmid of pMAL-SbCAD4



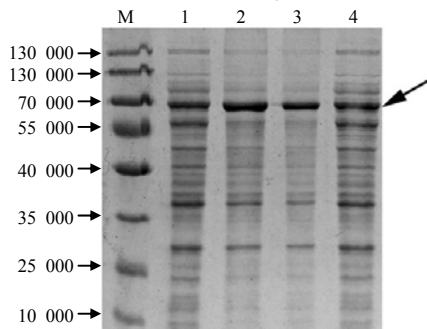
M DNA Marker ;短片段为 SbCAD4,长片段为 pMAL 载体。

图 8 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切重组质粒的电泳结果

Fig.8 Electrophoresis results from the double digestion recombinant plasmid by *EcoRI* and *HindIII*

## 2.5 pMAL-SbCAD4 融合蛋白的原核表达与纯化

从图9可知,4种浓度的IPTG都能较好地诱导出目的蛋白,其中以0.5 mmol/L IPTG的诱导效果最好,诱导出的融合蛋白量最大。

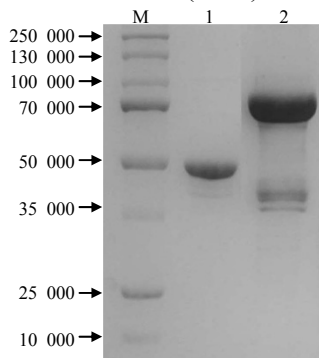


M 蛋白 Marker ; 1、2、3、4 分别表示 IPTG 的浓度 0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L。

图 9 不同 IPTG 浓度诱导 SbCAD4 融合蛋白在大肠杆菌中的表达结果

Fig.9 Induction expression results of the SbCAD4-fused protein in *E. coli* BL21

以上述最佳IPTG浓度培养100 mL菌液,超声裂解后,将上清液加载到Amylose Resin亲和层析柱纯化,再进行SDS-PAGE分析(图10)。结果表明,融



1 空 MBP 标签 2 SbCAD4 融合蛋白 M 蛋白 Marker。

图 10 纯化后的 SbCAD4 融合蛋白

Fig.10 Purification results of the SbCAD4-fused protein

合蛋白(2号)纯化的量较大,且杂带较少,而空MBP标签蛋白的量较少(1号),因此,经纯化的蛋白完全能够满足后续的试验需求。

## 2.6 SbCAD4 酶活测定分析

采用双倒数法测得纯化的SbCAD4对松柏醛的 $K_m$ 值为5.2  $\mu\text{mol/L}$ ,  $V_{\max}$ 为 5.8  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ,表明SbCAD4具有肉桂醇脱氢酶活性。

## 3 结论与讨论

肉桂醇脱氢酶是木质素合成中的关键酶,它对木质素单体的合成具有重要作用。植物CAD基因表达下调会造成植物木质素含量下降或改变木质素单体的比例构成<sup>[13-15]</sup>,CAD基因的克隆有助于改良饲用作物的品质和适口性;饲用作物中木质素的含量决定了作物的抗病性和抗倒伏能力<sup>[13,16]</sup>,因此,开展对SbCAD4基因的研究,对改良高粱饲用品质和研究其生长发育都具有重要作用。

外源目的基因的表达量受细胞生长状态、诱导培养的温度和时间、诱导剂的浓度等因素影响<sup>[17]</sup>。在本研究中,高粱SbCAD4基因的表达在IPTG浓度为500  $\mu\text{mol/L}$ 时,融合蛋白的表达量在诱导4 h后达到最高,且诱导出的蛋白大部分在上清液中。当IPTG浓度为1 000  $\mu\text{mol/L}$ 时也能诱导出较多的融合蛋白,但诱导出的蛋白大部分在沉淀中(数据未给出)。另外,在纯化的融合蛋白中存在部分降解(SDS-PAGE分析有杂带),但量较少,对后续试验影响较小。

拟南芥基因组中共有9个CAD基因,其中2个CAD基因主要负责木质素的合成<sup>[9]</sup>;在水稻基因组中共有12个CAD基因,其中OsCAD2被认为主要参与了木质素的合成<sup>[16]</sup>;OsCAD7可能也参与了木质素合成<sup>[18-19]</sup>,因此,无论是在单子叶还是双子叶植物中,可能都有2个或2个以上的CAD负责木质素合成。高粱基因组中共有10个CAD基因,只有SbCAD4基因与其他物种木质素合成的CAD分在同/L1个群,而且它也具有木质素合成典型的结构域。从酶活测定的情况来看,SbCAD4具有肉桂醇脱氢酶的催化活性,因此,SbCAD4是否为木质素合成的CAD基因需要进一步研究后才能确定。

## 参考文献:

- [1] 卢庆善. 高粱学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 1–24.
- [2] Andrew H Paterson, John E Bower, Remy Bruggmann, et al. The sorghum bicolor genome and the diversification of grasses[J]. *Nature*, 2009, 457: 551–556.
- [3] Vanholme R, Storme V, Vanholme B, et al. A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(9): 3506–3520.
- [4] Jorgenson R L. Brown midrib in maize and its lignage relations[J]. *J Am Soc Agron*, 1931, 23: 549–557.
- [5] Wyrambik D, Grisebach H. Purification and properties of isoenzymes of cinnamyl-alcohol dehydrogenase from soybean-cell-suspension cultures[J]. *Eur J Biochem*, 1975, 59(1): 9–15.
- [6] Brill E M, Abrahams S, Hayes C M, et al. Molecular characterisation and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamyl-alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne (*Medicago sativa* L.)[J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 41(2): 279–291.
- [7] Grima-Pettenati J, Feuillet C, Goffner D, et al. Molecular cloning and expression of a *Eucalyptus gunnii* cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase[J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 21(6): 1085–1095.
- [8] Li L, Cheng X F, Leshkevich J, et al. The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase[J]. *Plant Cell*, 2001, 13(7): 1567–1586.
- [9] Guo Dongmei, Ran Jinhua, Wang Xiaoquan. Evolution of the cinnamyl/sinapyl alcohol dehydrogenase (CAD/SAD) gene family: The emergence of real lignin is associated with the origin of bona fide CAD[J]. *J Mol Evol*, 2010, 71: 202–218.
- [10] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596–1599.
- [11] Palmer NA, Sattler SE, Saathoff AJ, et al. Genetic background impacts soluble and cell wall-bound aromatics in brown midrib mutants of sorghum[J]. *Planta*, 2008, 229: 115–127.
- [12] Kim S J, Kim M R, Bedgar D L, et al. Functional reclassification of the putative cinnamyl alcohol dehydrogenase multigene family in *Arabidopsis*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 1455–1460.
- [13] Baucher M, Bernard-Vailhe M A, Chabbert B, et al. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility[J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 39(3): 437–447.
- [14] Vignols F, Rigau J, Torres M A, et al. The brown-midrib3 (*bm3*) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyl transferase[J]. *Plant Cell*, 1995(7): 407–416.
- [15] Li X, Weng J K, Chapple C. Improvement of biomass through lignin modification[J]. *Plant J*, 2008, 54(4): 569–581.
- [16] Hirano K, Aya K, Kondo M, et al. *OsCAD2* is the major CAD gene responsible for monolignol biosynthesis in rice culm[J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(1): 91–101.
- [17] 马燕林, 马建忠, 王永刚. 拟南芥 *abi5* 基因的分子克隆及其在原核细胞中的表达和纯化[J]. *植物生理学报*, 2014, 50(2): 185–191.
- [18] Ma Y L, Ma J Z, Wang Y G. Molecular cloning, prokaryotic expression and purification of *abi5* gene from *Arabidopsis thaliana* L.[J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, 50(2): 185–191.
- [19] Li X, Yang Y, Yao J, et al. FLEXIBLE CULM 1 encoding a cinnamyl-alcohol dehydrogenase controls culm mechanical strength in rice[J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 69(6): 685–697.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库