

苎麻木质素合成酶 CAD 基因的 cDNA 克隆及表达分析

朱伟溢¹, 陈建荣², 彭彦¹, 张学文¹, 郭清泉², 赵燕^{1*}

(1.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.长沙学院生物工程与环境科学系, 湖南 长沙 410003)

摘 要:采用 PCR 结合 RACE 技术克隆苎麻栽培种湘苎 3 号 CAD 基因全长 cDNA 序列;再运用 qRT-PCR 技术对木质素含量不同的代表性苎麻品种湘苎 1 号、湘苎 3 号、湘潭大叶白和城步青麻的 CAD 基因在其茎秆韧皮部和木质部的表达进行定量分析;使用 1%间苯三酚和 25%盐酸对 4 种苎麻茎横切片进行特异染色, 观察品种间木质素染色度。结果表明, 获得的苎麻 CAD 基因 cDNA 序列全长为 1 378 bp(GenBank 登录号, KF758396), 编码 359 个氨基酸, 推导为苎麻肉桂醇脱氢酶(*BnCAD*)。该推导蛋白质与已报道的几种植物木质素合成酶 CAD 的同源性均达 90%以上, 其中与蒺藜苜蓿的同源性达 97%。运用 qRT-PCR 方法对 *BnCAD* 基因表达的定量分析结果显示, 苎麻 CAD 基因在湘苎 1 号和湘苎 3 号的韧皮部表达水平明显高于其在木质部的表达水平, 而在城步青麻木质部的表达水平高于其在韧皮部的表达水平, 该基因在湘潭大叶白的韧皮部和木质部表达量接近。4 种苎麻茎横切片的木质素染色结果表明, 品种间木质素染色度与 CAD 基因在其韧皮部的表达量成正相关。

关 键 词: 苎麻; 木质素合成酶 CAD 基因; 克隆; 表达分析

中图分类号: S563.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)05-0481-06

cDNA cloning and expression analysis of a lignin synthetase CAD gene in ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.)

ZHU Wei-yi¹, CHEN Jian-rong², PENG Yan¹, ZHANG Xue-wen¹, GUO Qing-quan², ZHAO Yan^{1*}

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Department of Biotechnology and Environment Science, Changsha University, Changsha 410003, China)

Abstract: This study is intended to clone CAD from ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud. cv Xiangzhu 3), and analyze the expression patterns of CAD in stems from 4 representative ramie cultivar. First, the cDNA sequence of CAD were identified by analyzing the transcriptome data of ramie cultivar Xiangzhu 3 and cloned by RT-PCR combined with RACE method. Secondly, the qRT-PCR was carried out to analyze the expression levels of CAD transcripts in 4 ramie cultivars: Xiangzhu 1, Xiangzhu 3, Xiangtaidayebai and Chengbuqingma. Finally, lignin contents among different cultivars were visually analyzed by histochemical staining of transverse sections of ramie stems using the phloroglucin. The *BnCAD* cDNA sequence was 1 378 bp in length (GenBank accession number, KF758396) and could be translated into a putative protein with 359 amino acids. Blast and protein structure analysis showed that this cDNA sequence is in high homologous with other plant CAD gene, and with 97% homology compared with *Medicago truncatula*, which confirmed that this cDNA sequence was the CAD gene. qRT-PCR analysis revealed that the expressions of CAD was much higher in phloem than xylem in Xiangzhu 1 and Xiangzhu 3, while Chengbuqingma the opposite, and no obvious difference was observed in Xiangtaidayebai. Histochemical lignin assays showed that the staining degree between different cultivars is directly proportional to the quantitative expression of CAD transcripts, suggesting an important role of CAD during ramie lignin synthesis.

Key words: ramie; lignin synthase CAD gene; cloning; expression analysis

收稿日期: 2014-03-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071457); 湖南省科技计划项目(2012NK3062); 长沙市科技计划项目(K1309014-31)

作者简介: 朱伟溢(1989—), 女, 湖南常德人, 硕士研究生, 主要从事分子细胞生物学研究, 258077287@qq.com; *通信作者, zhaoyan0585@163.com

苎麻(*Boehmeria nivea* (Linn.) Gaud.)属荨麻科苎麻属草本植物,其纤维是重要的纺织原料,近年来木质纤维被用于生物燃料乙醇发酵^[1],是具有较大经济利用价值的纤维植物。低木质素的木质纤维更有利于苎麻作为纺织原料、水土保持植物以及生物燃料等,而研究其木质素合成、组成和代谢的分子生物学规律,可以指导低木质素含量苎麻的选育和对其代谢调控的人工干预。通过对模式植物拟南芥的研究,木质素合成的代谢具体途径已有了较清晰的认识^[2],其以苯丙酸为起始,经过一系列生化反应生成木质素化学单体,单体进一步氧化聚合生成相应的木质素。这些木质素通过多种键型连接在一起,随机形成复杂的木质素聚合体,随后该大分子聚合体在植物体内执行相应的生物学功能^[3]。

肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)是木质素生物合成途径的最后一个关键酶,分离苎麻肉桂醇脱氢酶(BnCAD)是研究木质素生物合成及代谢途径的基础。利用基因工程技术,降低烟草^[4]、拟南芥^[5]、黑麦草^[6]CAD 基因的表达量,能够获得木质素含量降低或者单体组分改变的植株。

苎麻木质素生物合成代谢途径中的关键酶 *CCoAOMT*、*COMT* 基因已有报道,陈建荣等^[7-8]克隆了 *CCoAOMT* 基因 cDNA 全长序列,并利用苎麻 *CCoAOMT* 基因进行表达干扰导致转基因植株生长势有不同程度的减弱。但关于苎麻中 CAD 基因的研究尚未见报道。本研究以苎麻栽培种湘苎 3 号为材料,拟通过对其转录组测序信息分析,设计引物,采用 PCR 结合 RACE 技术克隆其 CAD 基因全长 cDNA 分子。对湘苎 1 号,湘苎 3 号,湘潭大叶白,城步青麻等 4 个具有代表性的^[9]苎麻品种的 CAD 基因在韧皮部和木质部的表达进行分析,同时对 4 种苎麻茎切片进行染色,以进一步分析木质素与 CAD 基因表达量的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试苎麻

供试苎麻品种为苎麻(*Boehmeria nivea* (Linn.) Gaud.)栽培种湘苎 1 号、湘苎 3 号以及野生种湘潭大叶白、城步青麻,均由湖南农业大学苎麻资源圃提供。

1.1.2 菌株

大肠杆菌 DH5 α 由湖南农业大学细胞生物学实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 苎麻木质素合成酶 CAD 基因 cDNA 核心序列的扩增

将苎麻转录组数据(未公开)与已发表的其他植物 CAD 基因的 cDNA 进行比对,针对同源性高的核心保守区序列,运用 DNAMAN 软件设计引物 CAD-up(5'-CAGGGAAGTTGGGATTGACGATG-3'),CAD-dn(5'-CGTTAGCGGAACAGAAGTCTAGCAT-3'),以扩增 CAD 基因的 cDNA 核心序列。

取成熟期的湘苎 3 号茎秆,用 SV Total RNA 试剂盒(Promega 公司)提取总 RNA,用 PrimeScriptTM II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)进行反转录,得到 cDNA 作为核心序列扩增的模板。PCR 反应体系为: cDNA 模板 1 μ L、dNTPs(2.5 mmol/L) 2 μ L、10 \times Buffer 2.5 μ L、CAD-up 引物 1 μ L、CAD-dn 引物 1 μ L、TaqDNA 聚合酶(2.5U/ μ L) 0.5 μ L、ddH₂O 17 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s、56 $^{\circ}$ C 退火 40 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终末延伸 10 min。PCR 产物用胶回收试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)回收后,连接至 pMD18-T 载体(TaKaRa),并转化大肠杆菌 DH5 α ,通过 Amp 抗性筛选和 X-gal/IPTG 蓝白斑筛选,挑取白色阳性克隆进行菌落 PCR 检测(检测所用引物是 CAD-up 和 CAD-dn)和酶切检测(酶切所使用的酶是 *Pst* I、*Eco* RI,均购自 Fermentas)。将检测的阳性单菌落摇菌并提取质粒送上海铂尚生物技术公司测序。

1.2.2 苎麻木质素合成酶 CAD 基因 cDNA 末端序列的扩增

以获得的 CAD 基因核心序列为模板,设计 5'RACE 巢式 PCR 引物 CAD 5'-GSP1(5'-ATGGTTGAAGGTGTAAACGG-3')、CAD 5'-GSP2(5'-CTGCAAGAGTTGACGTAAGTTC-3')及 3'RACE 巢式 PCR 引物 CAD 3'-GSP1(5'-CCTACGTGTCCCTGTTGAAGAC-3')、CAD 3'-GSP2(5'-TGCTAGACTTCTGTTCGCTAAC-3')。用 5'-Full RACE Kit with TAP (TaKaRa)和 3'-Full RACE Core Set with PrimeScriptTM

(TaKaRa)分别进行 3'端和 5'端的 RACE 反应。

将上述 RACE 产物回收、纯化,分别连接 pMD18-T 载体并转化大肠杆菌 DH5 α ,通过 Amp 抗性筛选和 X-gal/IPTG 蓝白斑筛选,挑取白色阳性克隆进行菌落 PCR 检测(检测引物为 5'RACE、3'RACE 巢式 PCR 引物)和酶切检测(用 *Pst* I、*Eco* RI 进行双酶切检测),将检测为阳性的单菌落摇菌并提取质粒送上海铂尚生物技术公司测序。

1.2.3 苎麻木质素合成酶 CAD 基因拼接序列分析

利用 DNAMAN 软件进行序列比对、拼接,用序列处理在线工具包(SMS)进行 ORF 查找、翻译。在 NCBI 上进行 BLAST 和蛋白质序列的 CDD 搜索。利用 MEGA5.1 软件构建 CAD 蛋白分子系统发育树。

1.2.4 苎麻木质素合成酶 CAD 基因在不同品种的苎麻中的表达

取田间栽种的成熟期苎麻茎秆中部为材料,按以上方法分别提取湘苎 1 号、湘苎 3 号、湘潭大叶白、城步青麻 4 个苎麻品种茎秆的韧皮部和木质部组织的总 RNA 和 cDNA。以苎麻高度保守的内源肌动蛋白 *Actin1* 为内参基因, *BnCAD* 为目的基因同时进行荧光定量 PCR 反应。用于 *BnCAD* 基因扩增的引物为 Up(5'-GGCATGAGATTGTTGGAATTG-3')和 Dn(5'-CATGGTTGAAGGTGTAACGG-3')。用于苎麻 *Actin1* 扩增的引物为 *Actin1*-up(5'-CTCGTCTGCGACAATGGTAC-3')和 *Actin1*-dn (5'-GACAATACCGTGTTCAATGGG-3')。利用 LightCycler 480 System 进行荧光定量 PCR 反应,具体步骤参照 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex TaqTM试剂盒进行。

1.2.5 苎麻茎秆切片及显微观察

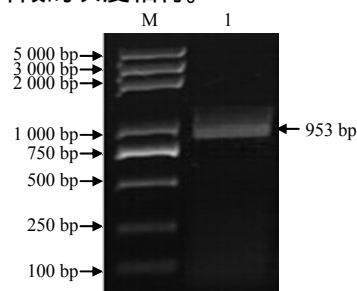
于 8:00-9:00 分别取湘苎 1 号、湘苎 3 号、湘潭大叶白、城步青麻 4 种苎麻茎秆的上、中、下部,利用 leitz1400 型滑走切片器切片,用 1%间苯三酚和 25%盐酸染色后置于 BX51 型 OLYMPUS 研究显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 苎麻 CAD 基因的克隆

PCR 检测结果表明,从湘苎 3 号茎秆扩增出 953 bp 的核心片段(图 1),与预期目的片段长度相符。根据核心序列使用 3'和 5'RACE 法,扩增到 400 bp

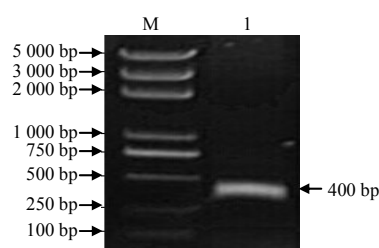
的 3'端片段(图 2)和 500 bp 的 5'端片段(图 3),均与预期目的片段的长度相符。



M 2 kb DNA 相对分子质量标准(北京全式金生物技术有限公司); 1 中间片段扩增产物。

图 1 *BnCAD* 中间片段扩增结果

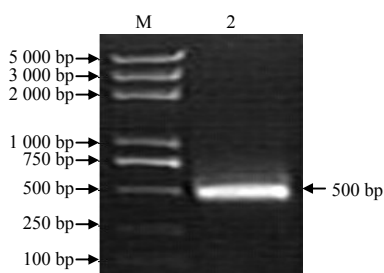
Fig.1 PCR results for intermediate fragment of *BnCAD*



M 2 kb DNA 相对分子质量标准; 1 3'RACE 扩增产物。

图 2 *BnCAD* 基因 3' RACE 扩增结果

Fig.2 Results of *BnCAD* 3' RACE amplification



M 2 kb DNA 相对分子质量标准; 2 5'RACE 扩增产物。

图 3 *BnCAD* 基因 5' RACE 扩增结果

Fig.3 Results of *BnCAD* 5' RACE amplification

2.2 苎麻 CAD 基因拼接结果

用 DNAMAN 软件将核心片段和 3'端及 5'端序列进行拼接,得到长 1 378 bp 的 cDNA 序列,其中 5'端非翻译区长 134 bp、开放阅读框(ORF)长 1 077 bp、3'端非翻译区长 167 bp。NCBI 比对结果显示,本试验成功克隆了 *BnCAD* 基因序列,并命名为 *BnCAD1*。将该基因登录到 GenBank,登录号为 KF758396。

与 GenBank 已报道的拟南芥、毛白杨、蒺藜苜蓿等种植物的 CAD1 蛋白序列进行系统进化关系分析,结果(图 4)显示,苎麻肉桂醇脱氢酶 CAD 与其他植物的 CAD1 蛋白差异不大,进一步说明该蛋

白质属于 CAD1 蛋白家族。相对于单子叶植物, *BnCAD1* 与来源于双子叶植物的 CAD 蛋白家族成

员亲缘关系更近, 其中与蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 的亲缘关系最近, 同源性达 97%。

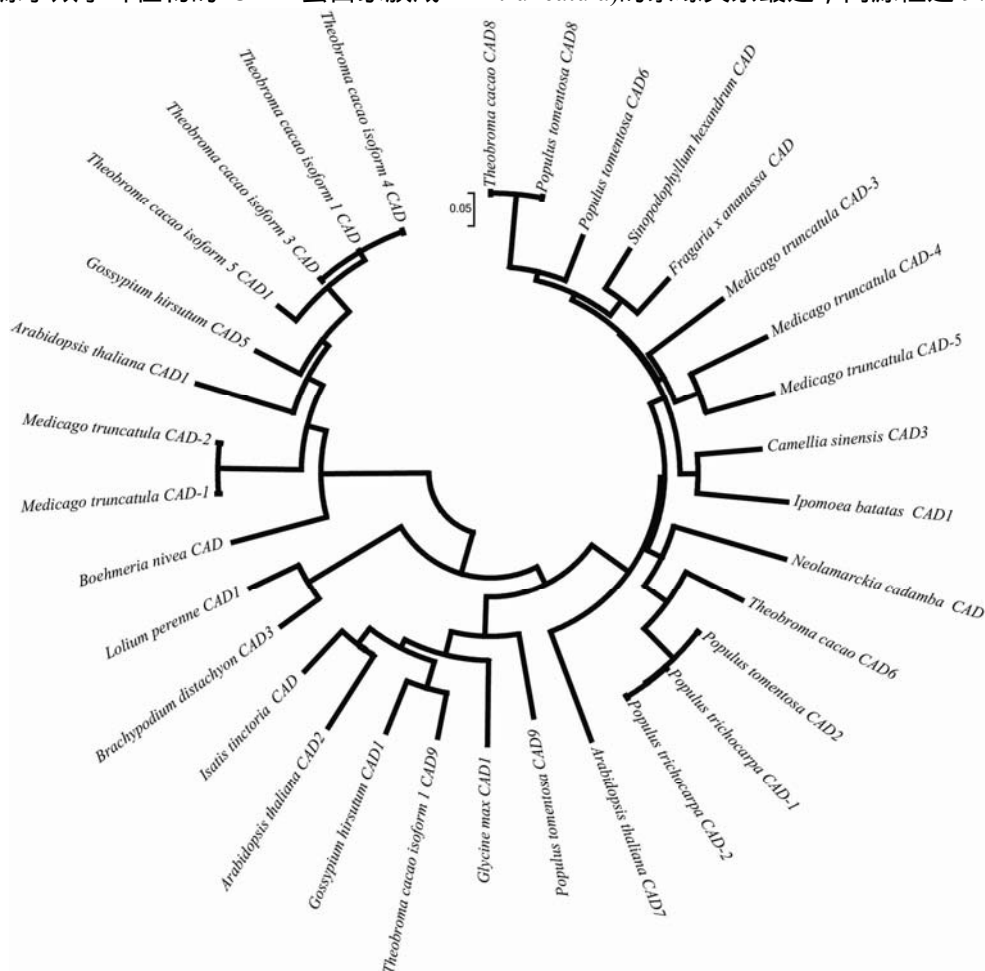


图 4 植物中 CAD 蛋白质氨基酸序列的进化分析结果

Fig.4 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of CAD proteins from plants

2.3 苧麻 CAD 基因在 4 种代表性苧麻品种中的表达

选择苧麻 *Actin1* 为内参基因, 从生长中期的苧麻中提取茎木质部和韧皮部总 RNA, 进行 qRT-PCR。结果(图 5)显示, 在 4 种苧麻的木质部

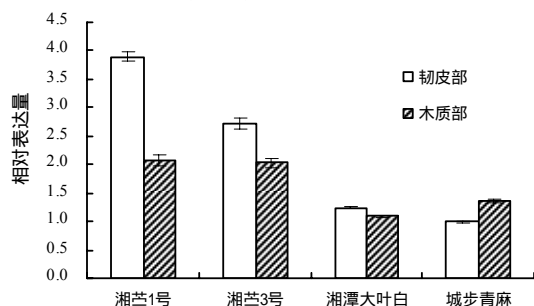


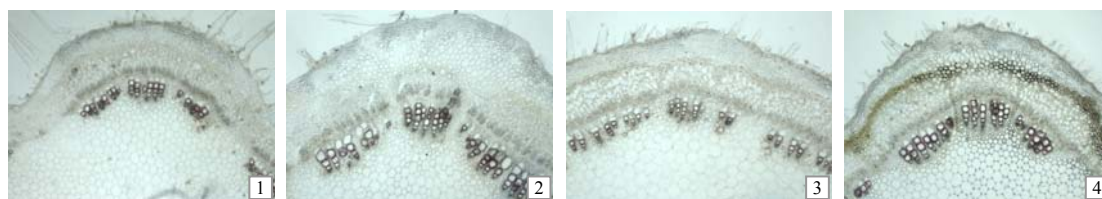
图 5 CAD 基因在 4 种苧麻韧皮部和木质部中表达的荧光定量 RT-PCR 分析结果

Fig.5 The fluorescence quantitative RT-PCR analysis of the expression of CAD in the phloem and xylem in the 4 ramie cultivars

中 CAD 基因在湘芷 1 号和湘芷 3 号的表达量略高于城步青麻和湘潭大叶白, 而在韧皮部中湘芷 1 号的表达量最高, 其次是湘芷 1 号, 在城步青麻中的表达量最低, 而且湘芷 1 号、湘芷 3 号、湘潭大叶白这 3 种苧麻韧皮部 CAD 基因的表达量比木质部 CAD 基因的表达量要高。

2.4 4 种代表性苧麻品种茎横切面的染色观察

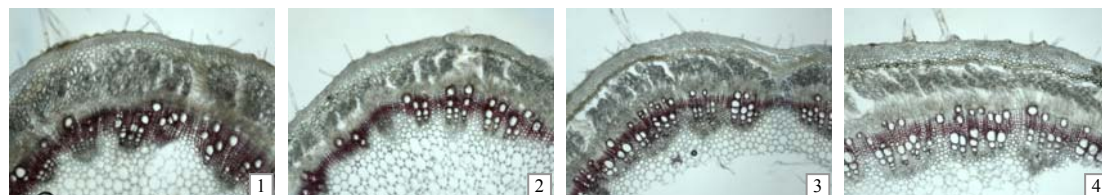
染色观察结果显示, 茎上部的茎横切面染色(图 6)结果区别不大, 这是由于木质部还处于发育早期, 木质素含量均较低, 其着色较浅。茎中部横切面染色(图 7)差别较大, 其中湘芷 1 号染色最深, 其次是湘芷 3 号、湘潭大叶白, 而城步青麻的染色最浅。而茎下部由于木质素在木质部形成沉积, 4 个苧麻品种的茎横切面染色(图 8)均较深且无明显差异。



1 湘芷 1 号; 2 湘芷 3 号; 3 湘潭大叶白; 4 城步青麻。

图 6 4 种代表性苎麻茎上部的木质部染色

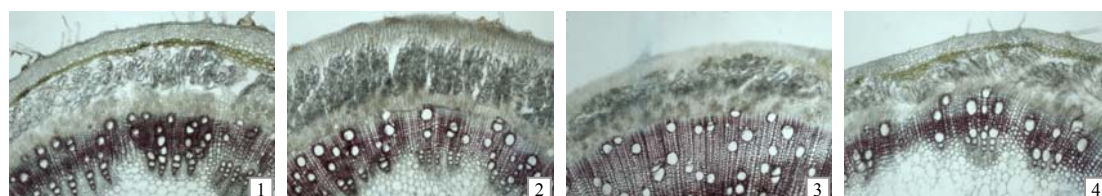
Fig. 6 The stain of lignin in top stem of the 4 ramie cultivars



1 湘芷 1 号; 2 湘芷 3 号; 3 湘潭大叶白; 4 城步青麻。

图 7 4 种代表性苎麻茎中部的木质部染色效果

Fig. 7 The stain of lignin in middle stem of the 4 ramie cultivars



1 湘芷 1 号; 2 湘芷 3 号; 3 湘潭大叶白; 4 城步青麻。

图 8 4 种代表性苎麻茎下部的木质部染色

Fig. 8 The stain of lignin in bottom stem in the 4 ramie cultivars

3 讨论

苎麻木质素主要由紫丁香基木质素(syringyl lignin, S-木质素)和愈创木基木质素(guaiacyl lignin, G-木质素)2 种化学单体聚合而成。目前已经从多种植物中克隆 CAD 基因, 并且通过转基因方法对该基因进行功能研究^[10-14]。Halpin 等^[10]报道, 在抑制 CAD 表达的转基因烟草中, 醛醇比的变化大于 S/G 值, 表明 CAD 活性降低, 抑制松柏醛还原成松柏醇的强度变大, 因此, 推测 CAD 存在不同的 CAD 同工酶。反义抑制 CAD 基因的转基因烟草植株中, 木质素含量无明显变化, 但其单体组成以及结构都发生较大改变, 使工业酸碱提取木质素和木质素作为饲料被消化更容易^[4]。Pilate 等^[15]通过反义抑制杨树 CAD 活性, 得到与转基因烟草类似结果, 即醛醇比的变化大于 S/G。除了单基因转化试验, Chabannes 等^[16]对烟草 CCR、CAD 进行双抑制, 得到的转基因烟草不仅木质素含量大幅度降低, 而且其植株表型和木质素性质结构更接近野生型。这些研究都证明了在植物木质素合成中 CAD 基因对 S-木质素和 G-木质素合成所起的关键作用。

在对拟南芥 CADs 基因的研究^[17-19]中, 发现有 9

个 CADs 基因与木质素合成相关, 但只有 *AtCAD4* 和 *AtCAD5* 的表达对木质素合成起关键性作用^[18,20], 而与 *BnCAD1* 同源性较高的 *AtCAD1* 在维管束组织中有明显表达, 且在生物代谢途径中的具体功能还未知^[20]。另一个与 *BnCAD1* 有较高同源性的基因是毛白杨 *CAD9(PtCAD9)*, 该基因经研究发现在毛白杨的叶片和木质部表达量均较高^[20], 其功能可能是响应木质素防御途径^[21]。经进化分析, 与 *BnCAD1* 亲缘关系最近的是蒺藜苜蓿(*MtCAD1*)。Qiao Zhao 等^[22]研究发现 *MtCAD1* 基因的缺失能导致细胞壁成分比例发生改变, 说明 *CAD1* 基因可能通过影响细胞壁的成分比例来改变韧皮部、木质部细胞的结构, 从而达到更易降解木质素的目的。

根据前人的研究结果, 结合本研究对 *BnCAD1* 基因在韧皮部、木质部的表达分析结果说明 *BnCAD1* 基因主要在韧皮部表达, 且在湘芷 1 号韧皮部的表达量约是在城步青麻韧皮部表达量的 4 倍。另外苎麻茎横切片的木质素间苯三酚特异性染色结果也显示, *BnCAD1* 基因在韧皮部的表达量与苎麻木质部的染色情况呈正相关。可以推测 *BnCAD1* 基因在苎麻韧皮部表达后促进木质素单体的合成, 而不同类型的单体经一定途径转移到木质

部聚集成木质素,间接验证了 *CAD* 基因在苎麻木质素合成过程中的重要性,而 *CAD* 的表达活性高低是否会影响苎麻木质素含量或单体成分的变化值得进一步的研究。本研究结果还显示 *BnCAD1* 在木质部的表达量相差不大。同时,笔者发现 4 个品种其下部茎秆的木质部染色深浅差别不明显,表明苎麻生长发育后期 *CAD* 基因的表达量差异不大,说明 *BnCAD1* 基因有与拟南芥、毛白杨等类似的 *CADs* 基因家族,可能还参与其他代谢过程或者具有其他的未知功能,并在长期进化过程中不同的基因之间存在功能分化,而单独降低 *CAD* 基因的表达水平对木质素含量的影响不大,原因则可能是由于基因家族的冗余作用,从而导致其他相关代谢产物发生改变。

参考文献:

- [1] 李江,谢天文,刘晓风.木质纤维素生产燃料乙醇的糖化发酵工艺研究进展[J].化工进展,2011,30(2):284-291.
- [2] Ruben V,Véronique S,Bartel V.A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in *Arabidopsis*[J].Plant Cell,2012,24(9):3506-3529.
- [3] Baucher M, Monties B, Van M M, et al. Biosynthesis and genetic engineering of lignin[J]. Crit Rev Plant Sci, 1998, 17(2): 125-197.
- [4] Halpin C, Knight M E, Foxon G A. Manipulation of lignin quality by down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase[J]. Plant, 1994, 6(3): 339-350.
- [5] Thévenin J, Pollet B, Letarnek B. The simultaneous repression of CCR and CAD, two enzymes of the lignin biosynthetic pathway, results in sterility and dwarfism in *Arabidopsis thaliana*[J]. Molecular Plant, 2011, 4(1): 70-82.
- [6] 胡可,严雪锋,栗丹.沉默 *CCR* 和 *CAD* 基因培育低木质素含量转基因多年生黑麦草[J].草业学报,2013,22(5):72-83.
- [7] 陈建荣,郭清泉,张学文.苎麻 *CCoAOMT* 基因全长 cDNA 克隆与序列分析[J].中国农业科学,2006,39(55):1058-1063.
- [8] 邓晶,刘峰,陈建荣,等.苎麻 *CCoAOMT* 基因干扰表达载体构建及对烟草的转化[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2008,34(2):132-135.
- [9] 李建军,郭清泉,陈建荣.21 份不同木质素含量的苎麻的 RAPD 聚类分析[J].中国麻业,2006,28(3):120-122.
- [10] Halpin C. Brown-midrib maize(*bm1*)-a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene[J]. Plant J, 1998, 14(5): 545-553.
- [11] Mackay J J, Booker F L, Sederoff R R. Inheritance, gene expression, and lignin characterization in a mutant pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase[J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94(15): 8255-8260.
- [12] Pilonel C, Mulder M M, Boon J J, et al. Involvement of cinnamyl-alcohol dehydrogenase in the control of lignin formation in *Sorghum bicolor* L[J]. Moench Planta, 1991, 185(4): 538-544.
- [13] Lapierre C, Pollet B, Toval G, et al. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping[J]. Plant Physiol, 1999, 119(1): 153-164.
- [14] Baucher M, Chabbert B, Besle J M. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility[J]. Plant Molecular Biology, 1999, 39(3): 437-447.
- [15] Pilate G, Guiney E, Holt K. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20: 607-612.
- [16] Chabannes M, Barakate A, Lapierre C, et al. Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants[J]. The Plant Journal, 2001, 28(3): 257-270.
- [17] Sibout R, Eudes A, Pollet B. Expression pattern of two paralogs encoding cinnamyl alcohol dehydrogenases in *Arabidopsis*. Isolation and characterization of the corresponding mutants[J]. Plant Physiol, 2003, 132(2): 848-860.
- [18] Kim S J, Kim K W, Cho M H. Expression of cinnamyl alcohol dehydrogenases and their putative homologues during *Arabidopsis thaliana* growth and development: Lessons for database annotations?[J]. Phytochemistry, 2007, 68(14): 1957-1974.
- [19] Tronchet M, Balagué C, Kroj T, et al. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*[J]. Mol Plant Pathol, 2010, 11(1): 83-92.
- [20] 张鲁斌,谷会,弓德强,等.植物肉桂醇脱氢酶及其基因研究进展[J].西北植物学报,2011,31(1):0204-0211.
- [21] Goffner D, Doorselaere J V. A novel aromatic alcohol dehydrogenase in higher plants: Molecular cloning and expression[J]. Plant Molecular Biology, 1998, 36(5): 755-765.
- [22] Somssich I E, Wernert P. *Arabidopsis thaliana* defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol: NADP⁺ oxidoreductase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(24): 14199-14203.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维