



异源表达菊芋 *HtHCT* 基因对受体植物木质素 相关生理生化指标的影响

张新业^{1,2,3}, 苏彦苹¹, 朱 姝¹, 王聪艳^{1,2}, 侯晓强¹, 李文静^{1,2,3}

(1. 廊坊师范学院 生命科学学院, 河北廊坊 065000; 2. 河北省动物多样性重点实验室, 河北廊坊 065000;

3. 廊坊市细胞工程与应用研究重点实验室, 河北廊坊 065000)

摘 要 羟基肉桂酰辅酶 A:莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶(HCT)是木质素合成过程中的关键酶之一。本研究构建了菊芋 *HtHCT* 基因的植物表达载体 pCambia1390-*HtHCT*, 分别对拟南芥和本氏烟进行遗传转化, 并对转基因植株进行生理生化指标测定。PCR 和 RT-PCR 结果表明, *HtHCT* 基因已经插入到受体植物基因组中, 并能进行转录; 转基因植株生理生化指标检测表明, *HtHCT* 基因能够调节拟南芥和本氏烟中木质素的含量及组成, 并对受体材料的类黄酮合成亦有一定的影响。

关键词 菊芋; *HtHCT* 基因; 木质素; 类黄酮; 功能研究

中图分类号 Q782; Q789

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2022)01-0063-09

木质素是植物体内重要的大分子高聚物, 含量仅次于纤维素, 是维管植物细胞壁的重要成分。木质素是植物由水生向陆生进化的重要标志, 在支撑植物体, 保持细胞内的水分, 长距离运输水分和营养物质及抵御干旱、病原微生物等方面具有重要的生物学功能^[1-4]。然而, 木质素的存在却不利于植物资源的利用。在造纸工业中, 纸浆内木质素的去除, 不仅高能耗、高成本, 而且污染环境。木质素含量过高还会影响牲畜对饲草植物的消化及木质纤维生产燃料乙醇的效率。因此, 植物资源木质素含量的改良越来越受到重视^[3,5]。

木质素通常由 3 种木质素单体—对羟基苯基木质素(H 型木质素)、愈创木基木质素(G 型木质素)和紫丁香基木质素(S 型木质素)氧化聚合而成^[6]。羟基肉桂酰辅酶 A:莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶(HCT)是一种酰基转移酶, 其以香豆酰辅酶 A(p-coumaroyl CoA)为底物, 将苯丙烷代谢引入木质素单体的合成^[7]。到目前为止, 已有多个物种内的 *HCT* 基因被鉴定, *HCT* 基因在植物体内多以基因家族的形式出现, 其蛋白结构中通常含有保守基序 HXXXD 和 DFGWG^[4,8-10]。由于物种的不同, *HCT* 基因家族成员数目会有

所差异。如 Ma 等^[9]从苹果(*Malus × domestica*)、桃(*Prunus persica*)、草莓(*Fragaria vesca*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和梨(*Pyrus bretschneideri*)基因组中分别鉴定到 90、60、72、50 和 82 个 *HCT* 基因。茄科植物的 *HCT* 基因数目较少, 烟草(*Nicotiana tabacum*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)和辣椒(*Capsicum annuum*)中分别存在 4、2 和 6 个 *HCT* 基因^[4]。最近, Chao 等^[11]从毛果杨(*Populus trichocarpa*)中鉴定到 10 个 *HCT* 基因家族成员。功能研究表明, *HCT* 基因能够参与并调节木质素的合成, 其下调表达能够显著降低木质素含量并改变木质素单体的组成^[9]。

菊芋(*Helianthus tuberosus*)是菊科、向日葵属的一种多年生草本植物, 又名洋姜、鬼子姜。菊芋抗盐碱、抗旱、抗寒能力较强, 且具有较好的防风固沙作用^[12]。目前关于菊芋的研究主要集中在种质资源收集评价、生物能源开发、饲草营养品质、抗逆生理及糖类代谢等方面^[13-14], 而关于菊芋木质素代谢相关基因的研究鲜见报道。此外, 菊芋中木质素含量较高, 亦不利于其在造纸、饲料及生物能源等领域的应用^[15-17]。廊坊师范学院植物

收稿日期:2021-01-28 修回日期:2021-03-07

基金项目:河北省高等学校科学技术研究项目(BJ2018044);廊坊市科技支撑计划项目(2019012003)。

第一作者:张新业, 男, 博士, 讲师, 从事植物分子育种研究。E-mail:zhigancan@126.com

通信作者:李文静, 女, 博士, 副教授, 主要从事分子生物学研究。E-mail:liwenjing@lfnu.edu.cn

分子遗传学研究室前期从菊芋品种‘廊芋 8 号’中克隆了 *HCT* 基因—*HtHCT*, 其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长 1 293 bp, 编码 430 个氨基酸, *HtHCT* 在菊芋茎中的表达量显著高于其他被测组织, 且能响应干旱、盐胁迫处理^[18]。本试验构建 *HtHCT* 基因的植物表达载体, 并对拟南芥和本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 进行遗传转化, 初步研究其对木质素及类黄酮合成的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

野生型拟南芥 (Col) 种子经 5% 的次氯酸钠溶液消毒后, 接种到 MS 培养基上, 4 °C 春化 48 h, 置于人工气候室中 (22 °C、光照 16 h/黑暗 8 h、光照强度 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 萌发生长。选取萌发后 7~10 d 的健壮幼苗, 移栽到营养土中 [V(泥炭): V(蛭石): V(珍珠岩) = 2: 7: 1], 继续培养, 条件同上。

本氏烟种子经 5% 的次氯酸钠溶液消毒后, 接种到 MS 培养基上, 置于人工气候室中 (23 °C、光照 16 h/黑暗 8 h、光照强度 $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 萌发生长, 待长出 2~3 片叶后, 将幼苗移至培养瓶中, 并在同一条件下继续培养。

含 *HtHCT* 基因 CDS 序列的原核表达载体 pET-28a-*cHtHCT* 及植物表达载体 pCAMBIA1390 (含 *CaMV* 35S 启动子、卡那霉素抗性、潮霉素筛选标记) 均由廊坊市细胞工程与应用研究重点实验室保存。

1.2 植物表达载体的构建

以原核表达载体 pET-28a-*cHtHCT* 为模板, 利用含有酶切位点 *Pst* I、*Eco*R I 的引物对 HCT4F/HCT4R 进行 PCR 扩增, 利用限制性内切酶 [宝生物工程 (大连) 有限公司] 对 PCR 扩增产物和植物表达载体 pCAMBIA1390 分别进行双酶切, 利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (北京庄盟科技有限公司) 回收纯化目的基因片段和 pCAMBIA1390 载体骨架, 二者经 Ligation high (日本 TOYOBO 公司) 连接后, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Trans 10 感受态细胞, 经双酶切鉴定后送出测序, 获得重组植物表达载体 pCAMBIA1390-*HtHCT*。

1.3 植物遗传转化及转基因植株鉴定

将植物表达载体 pCAMBIA1390-*HtHCT* 导入根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 感

受态细胞 GV3101 中, 经菌落 PCR 鉴定后, 阳性克隆用于遗传转化。利用蘸花法^[19]转化拟南芥 (Col), 收获 T_0 代种子。 T_0 代种子经消毒后, 点播到 1/2MS 培养基上 (含 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素), 进行抗性筛选, 提取抗性苗基因组 DNA 进行 PCR 鉴定, 得到的阳性苗进一步提取 RNA, 并进行 RT-PCR 检测 (表 1), 收获 T_1 代阳性植株的种子。 T_1 代种子继续使用潮霉素抗性平板筛选, 抗性苗移栽到营养土中, 利用 PCR 进行进一步鉴定, 获得 T_2 代阳性植株, 长至开花期后, 将 T_2 代阳性植株按 T_1 代来源混收茎秆, 用于生理生化指标测定。

用手术刀将生长至 4~5 周的本氏烟无菌苗叶片切成小块, 利用叶盘法^[20]进行遗传转化, 提取 T_0 代植株 DNA, 进行 PCR 检测, 获得的阳性苗进一步利用 RT-PCR 鉴定 (表 1), 阳性植株自交收种。将 T_0 代种子按株系点播于营养土中, 长至 3~4 叶时, 提取叶片 DNA, 进行 PCR 鉴定, 剔除阴性苗, 保留 T_1 代阳性植株, 将生长约 7~8 周的 T_1 代阳性植株按 T_0 代来源混收茎秆, 用于生理生化指标测定。

1.4 转基因植株生理生化指标测定

将上述混收的植物材料 105 °C 杀青 15 min, 70 °C 烘干至恒量, 粉碎后过 80 目筛, 用于以下性状的测定 (江苏三泰生物科技有限公司)。

1.4.1 总木质素含量测定 采用乙酰溴法^[23]测定总木质素含量。称取 50 mg 样品, 加入 1 mL 70 % 的乙醇, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液; 加入 1 mL 氯仿/甲醇 (1: 1) 溶液重悬沉淀, 离心后弃上清液; 加入 1 mL 丙酮混匀, 干燥后再加入 1.5 mL 0.1 mol · L⁻¹ pH 5.0 的醋酸缓冲液, 80 °C 加热 20 min; 加入 10 μL 0.01 % 的叠氮化钠、10 μL 0.1 mg · mL⁻¹ 淀粉酶和 10 μL 1.10~1.30 g · mL⁻¹ 普鲁兰酶, 37 °C 过夜; 加热至 100 °C 终止反应, 离心弃上清液, 加水清洗沉淀; 加入 1 mL 丙酮, 混匀并干燥丙酮。称取约 1 mg 上述沉淀, 加入 100 μL 乙酰溴 (25%) 溶液, 50 °C 加热 3 h; 然后加入 400 μL 2 mol · L⁻¹ 氢氧化钠和 70 μL 0.5 mol · L⁻¹ 盐酸羟胺, 混匀后, 用乙酸定容至 2 mL, 取 200 μL 于 280 nm 波长下测定吸光值。总木质素含量计算公式为: 总木质素含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) = $[\Delta\text{OD}_{280}/(C \times L)] \times (V/m) \times 100\% \times 10$, 其中 C 为吸光系数 15.69, L 为光程 0.539 cm, V 为反应体积 2 mL, m 为样

品质量。

1.4.2 木质素单体含量测定 称取 10 mg 样品,加入 500 μL 硫解液(2.5%三氯化硼、10%乙硫醇、87.5%二氧六环);100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 4 h;加入 300 μL 0.4 mol $\cdot$ L⁻¹ 碳酸氢钠,混匀后加入 0.2 mL

水和 0.3 mL 乙酸乙酯;14 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min,取上清液;干燥后加入 150 μL 吡啶(含内标反式肉桂酸)和 50 μL 三甲基硅烷,60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h 后,10 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min,取上清液利用 Agilent7820A-5977B 气质联用仪^[24] 进行测定。

表 1 引物信息

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence	用途 Purpose
HCT4F	GGCTGCAGATGTTGATCACCGTAACAAATTCAACAAT	植物表达载体构建及 PCR 鉴定转基因拟南芥和本氏烟
HCT4R	GGGAATTCTTAGATGTCATACAAGTAGTTGCT	Construction of plant expression vector and PCR detection of positive individuals of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>Nicotiana benthamiana</i>
AtActin2sqF ^[21]	GGAAGGATCTGTACGGTAAC	转基因拟南芥中 RT-PCR 检测内参基因 <i>AtActin2</i>
AtActin2sqR ^[21]	GGACCTGCCTCATCATACT	RT-PCR detection of reference gene(<i>AtActin2</i>) in transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i>
NbL23qF ^[22]	AAGGATGCCGTGAAGAAGATGT	转基因本氏烟中 RT-PCR 检测内参基因 60S ribosomal protein
NbL23qR ^[22]	GCATCGTAGTCAGGAGTCAACC	RT-PCR detection reference gene (60S ribosomal protein) in transgenic <i>Nicotiana benthamiana</i>
HCTq1F	TTTATCAACGCTTGGTCCGA	RT-PCR 检测 <i>HtHCT</i> 基因
HCTq1R	CAGGCAACGATTTCATTGGG	RT-PCR detection of <i>HtHCT</i>

注:下划线部分分别为酶切位点 *Pst* I、*Eco* R I。

Note:The restriction site of *Pst* I and *Eco* R I is marked by underline.

1.4.3 总黄酮含量测定 采用亚硝酸钠-氯化铝法测定总黄酮含量^[25]。称取 50 mg 样品于 2 mL 离心管中,加入 1 mL 甲醇,60 $^{\circ}\text{C}$ 抽提 4 h。取 50 μL 提取物,加入 950 μL 甲醇和 4 mL 水,再加入 300 μL 5%亚硝酸钠溶液,室温静置 5 min。加入 300 μL 10%氯化铝溶液,静置 6 min。加入 2 mL 1 mol $\cdot$ L⁻¹ 氢氧化钠,最后定容到 10 mL,静置 15 min。于 510 nm 处测定吸光值。类黄酮含量测定公式:类黄酮含量 = $C \times V / M$,其中 C 为根据标准曲线计算出的结果, V 为提取液总体积, M 为样品质量。

以芦丁为标样制作标准曲线。称取芦丁 1 mg,加入甲醇配制成浓度为 0.1 mg $\cdot$ mL⁻¹、0.2 mg $\cdot$ mL⁻¹、0.4 mg $\cdot$ mL⁻¹、0.6 mg $\cdot$ mL⁻¹、0.8 mg $\cdot$ mL⁻¹、1 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的标准溶液,测定方法同上。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体构建

以引物对 HCT4F/HCT4R 扩增质粒 pET-28a-*cHtHCT*,得到长约 1 300 bp 的 *HtHCT* 基因片段,经 *Pst* I、*Eco* R I 双酶切后连入经相同内切酶酶切的 pCAMBIA1390,转化大肠杆菌后,

阳性克隆抽提质粒,经双酶切后得到长度一致的目的基因片段(图 1),酶切鉴定无误后送公司测序,从而获得重组表达载体 pCAMBIA1390-*HtHCT*。

2.2 植物遗传转化及转基因植株鉴定

分别利用蘸花法和叶盘法对拟南芥和本氏烟进行遗传转化,并获得转基因材料(图 2)。以重组质粒 pCAMBIA1390-*HtHCT* 和野生型材料分别作为阳性和阴性对照,利用引物对 HCT4F/HCT4R 对拟南芥 T₁ 代抗性植株和本氏烟 T₀ 代抗性植株进行 PCR 检测。结果表明,阳性对照和转化成功的阳性植株均扩增出长约 1 300 bp 的目的片段,说明 *HtHCT* 基因已整合到受体材料的基因组中,而阴性对照和未转化成功的材料则没有相应的扩增产物(图 3-A、C)。

分别以拟南芥 *Actin* 基因和本氏烟 60S ribosomal protein 基因作为内参,利用引物对 AtActin2sqF/AtActin2sqR 和 NbL23qF/NbL23qR 对经 PCR 检测呈阳性的 T₁ 代转基因拟南芥和 T₀ 代转基因本氏烟进行 RT-PCR 检测。结果表明,野生型拟南芥和本氏烟中均无扩增产物,而经 PCR 鉴定为阳性的植株均扩增出特异性片段,说明 *HtHCT* 基因已成功转录(图 3-B、D)。

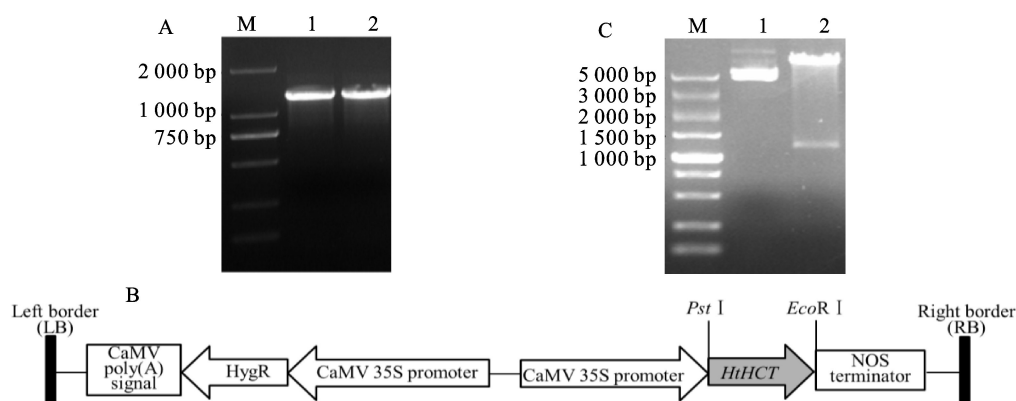
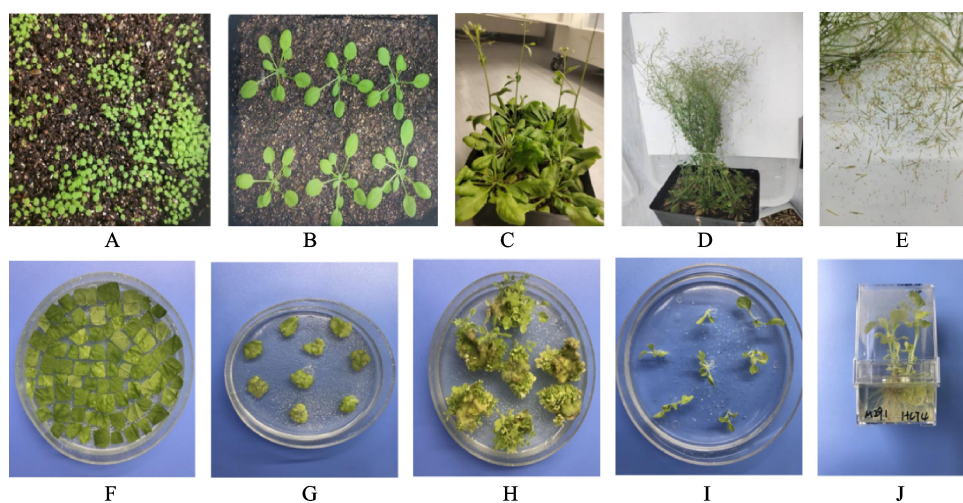


图 1 *HtHCT* 基因片段的 PCR 扩增; M. DL2000; 1~2. *HtHCT* 基因片段; B. 植物表达载体 pCambia1390-*HtHCT* 构建示意图; C. 植物表达载体 pCambia1390-*HtHCT* 的双酶切鉴定; M. DL5000; 1. pCambia1390-*HtHCT*; 2. *Pst*I/*Eco*R I 的双酶切产物

A. PCR amplification of *HtHCT*; M. DL2000; 1~2. *HtHCT* fragment; B. Schematic diagram of pCambia1390-*HtHCT*; C. Double digestion of pCambia1390-*HtHCT*; M. DL5000; 1. pCambia1390-*HtHCT*; 2. Double digest products of pCambia1390-*HtHCT*

图 1 植物表达载体 pCambia1390-*HtHCT* 构建

Fig. 1 Construction of plant expression vector pCambia1390-*HtHCT*



A~E. 拟南芥转化流程; A. 种子萌发; B. 幼苗移栽; C. 花序侵染; D. 转基因植株生长发育; E. 种子采集; F~J. 本氏烟转化流程; F. 侵染后共培养; G. 愈伤诱导; H. 愈伤筛选及幼苗分化; I. 幼苗生根; J. 幼苗移栽

A—E. Genetic transformation of *Arabidopsis thaliana*; A. Seed germination; B. Seedling transplantation; C. Inflorescence infection; D. Development of transgenic plants; E. Seed harvesting; F—J. Genetic transformation of *Nicotiana benthamiana*; F. Coculture after infection; G. Callus induction; H. Callus screening and seedling differentiation; I. Seedling rooting; J. Seedling transplantation

图 2 拟南芥和本氏烟的遗传转化

Fig. 2 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana*

2.3 转基因材料生理生化指标测定

2.3.1 转基因材料总木质素含量测定 将载体 pCambia1390-*HtHCT* 转入拟南芥和本氏烟中,分别测定野生型和转基因株系的总木质素含量。

在拟南芥中,转基因株系 AtL4 和 AtL5 的总木质素含量高于野生型,其中株系 AtL5 与野生型之间差异极显著。而转基因株系 AtL8 的总木

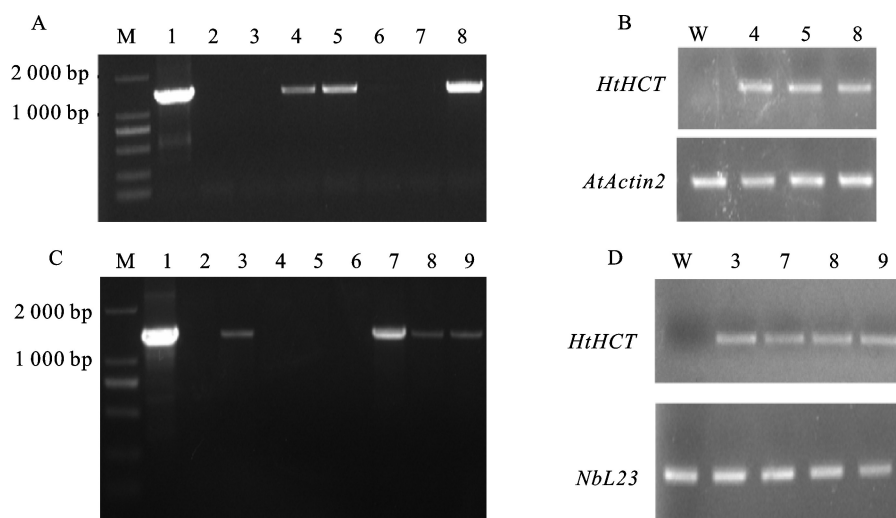
质素含量则极显著低于野生型。在本氏烟中,转基因株系 NbL3 和 NbL7 的总木质素含量极显著地高于野生型,株系 NbL9 的含量则低于野生型(表 2)。以上结果表明,*HtHCT* 基因能够影响木质素的合成。

2.3.2 转基因材料木质素单体含量测定 木质素单体含量的测定结果表明,拟南芥和本氏烟中的木质素单体均以 G 型木质素和 S 型木质素为

主,而 H 型木质素含量最低。在拟南芥中,*HtHCT* 基因的导入对 G 型木质素含量的影响最大,S 型木质素次之,而对 H 型木质素含量的影响最小。在本氏烟中,仅有转基因株系 NbL7 的木质素单体组成与野生型之间存在显著差异,表明 *HtHCT* 基因对本氏烟木质素单体构成的影响较小。无论在拟南芥还是本氏烟中,G 型木质素的

含量一般与 S 型木质素的含量呈负相关,而 H 型木质素含量变化规律不明显(表 2)。

2.3.3 转基因材料的类黄酮含量测定 鉴于 HCT 与查尔酮合成酶均可以香豆酰辅酶 A 为底物,并分别将苯丙烷代谢引入木质素单体合成及类黄酮合成途径^[6]。因此,本研究也测定了转基因材料的类黄酮含量。



A. T_1 代转基因拟南芥的 PCR 检测; M. DL2000; 1. 重组质粒 pCAMBIA1390-*HtHCT*; 2. 野生型; 3~8. 转基因拟南芥植株; B. T_1 代转基因拟南芥的 RT-PCR 检测; W. 野生型; 4,5,8. 转基因拟南芥植株; C. T_0 代转基因本氏烟的 PCR 检测; M. DL2000; 1. 重组质粒 pCAMBIA1390-*HtHCT*; 2. 野生型; 3~9. 转基因本氏烟植株; D. T_0 代转基因本氏烟的 RT-PCR 检测; W. 野生型; 3,7,8,9. 转基因本氏烟植株

A. PCR detection of T_1 transgenic *Arabidopsis thaliana*; M. DL2000; 1. pCAMBIA1390-*HtHCT*; 2. Wild type; 3-8. Transgenic plants; B. RT-PCR detection of T_1 transgenic *Arabidopsis thaliana*; W. Wild type; 4,5,8. Transgenic plants; C. PCR detection of T_0 transgenic *Nicotiana benthamiana*; M. DL2000; 1. pCAMBIA1390-*HtHCT*; 2. Wild type; 3-9. Transgenic plants; D. RT-PCR detection of T_1 transgenic *Nicotiana benthamiana*; W. Wild type; 3,7,8,9. Transgenic plants

图 3 转基因材料的分子检测

Fig. 3 Molecular detection of transgenic plants

以吸光度值为横坐标,不同浓度的芦丁标准品为纵坐标,进行线性回归,得到标准曲线的回归方程为 $y = 31.625x - 1.3302$ ($R^2 = 0.9966$)。据此,对类黄酮含量进行测定。结果表明,拟南芥转基因株系 AtL4 和 AtL8 的类黄酮含量均极显著地低于野生型,本氏烟中亦有 2 个转基因株系 (NbL3、NbL9) 的类黄酮含量显著或极显著低于野生型含量(表 2)。

3 讨论

木质素是重要的植物代谢产物,通过现代生物技术手段调节植物木质素代谢已成为研究热点,这不仅有利于抗倒伏植物新品种的培育,而且有利于植物资源在造纸、生物能源等方面的应用。

HCT 是将苯丙烷代谢产物香豆酰辅酶 A 引入木质素单体合成的关键节点,在木质素合成过程中具有重要作用^[26]。*HCT* 基因表达量的变化对植物木质素的含量及组成具有重要影响。拟南芥 *HCT* 基因沉默后,叶片颜色加深,S 型木质素含量降低,植株生长受抑制,部分材料出现不育现象,但类黄酮含量增加。本氏烟 *HCT* 基因沉默后,木质素含量降低,木质素组成亦发生改变(S 型木质素减少,H 型木质素增多),其部分植株矮化^[7,27]。紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) *HCT* 基因的下调表达,会显著降低木质素含量并改变其组成,但却提高了类黄酮含量、紫花苜蓿消化率及其对逆境胁迫的抗性^[28-29]。为解析菊芋 *HtHCT* 基因的功能,本研究构建了植物表达载体 pCAM

表 2 转基因植株生理生化指标测定

Table 2 Determination of physiological and biochemical indicators of transgenic plants

物种 Species	样品名称 Name	总木质素含量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) Content of lignin	木质素单体含量/% Content of monolignols			类黄酮含量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) Content of flavonoids
			H	G	S	
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	WT	125.57 $\pm$ 3.78	1.47 $\pm$ 0.28	62.44 $\pm$ 0.10	36.09 $\pm$ 0.21	8.39 $\pm$ 0.11
	AtL4	129.58 $\pm$ 1.68	1.72 $\pm$ 0.01	61.80 $\pm$ 0.07**	36.48 $\pm$ 0.06	7.77 $\pm$ 0.08**
	AtL5	145.26 $\pm$ 2.64**	5.05 $\pm$ 1.41**	70.62 $\pm$ 0.20**	24.33 $\pm$ 1.56**	8.35 $\pm$ 0.19
	AtL8	102.63 $\pm$ 4.48**	1.43 $\pm$ 0.03	64.60 $\pm$ 0.06**	33.97 $\pm$ 0.05*	7.46 $\pm$ 0.16**
本氏烟 <i>Nicotiana benthamiana</i>	WT	84.04 $\pm$ 2.04	0.25 $\pm$ 0.02	35.23 $\pm$ 4.13	64.53 $\pm$ 4.11	3.12 $\pm$ 0.17
	NbL3	96.08 $\pm$ 1.45**	0.26 $\pm$ 0.01	32.70 $\pm$ 0.52	67.04 $\pm$ 0.52	2.85 $\pm$ 0.01*
	NbL7	111.75 $\pm$ 1.09**	0.00 $\pm$ 0.00**	40.09 $\pm$ 0.32*	59.91 $\pm$ 0.32*	3.19 $\pm$ 0.09
	NbL9	82.68 $\pm$ 2.05	0.25 $\pm$ 0.00	36.08 $\pm$ 0.36	63.66 $\pm$ 0.36	2.09 $\pm$ 0.10**

注: * 表示差异显著($P<0.05$); ** 表示差异极显著($P<0.01$)。

Note: * and ** indicate significant differences at level of 5% and 1%, respectively.

BIA1390-*HtHCT*,并分别转化了拟南芥和本氏烟草。与野生型拟南芥相比,3个转基因株系的总木质素含量表现不一,其中两个株系含量升高,而 AtL8 却显著降低。本氏烟草中亦有两个株系含量增加,一个株系(NbL9)含量降低。说明 *HtHCT* 基因的导入能够影响受体木质素代谢,与前人研究结果^[27-28,30]一致。与野生型相比,拟南芥转基因株系 AtL8 和烟草转基因株系 NbL9 的木质素含量呈现下降趋势,可能是外源 *HtHCT* 基因的表达抑制了拟南芥和本氏烟中自身 *HCT* 基因的表达而出现了共抑制现象^[31],与韩伯涛等^[32]的研究结果相近。从木质素组成看,转入 *HtHCT* 基因后,拟南芥和本氏烟的木质素组成均发生了不同程度的改变,且 G 型和 S 型木质素含量之间存在此消彼长的负相关关系,而 H 型木质素含量变化规律不明显。*HCT* 基因通常以基因家族的形式存在于植物基因组中,且不同物种间 *HCT* 基因家族成员的数目亦有不同^[9]。本试验在前期同源克隆‘廊芋 8 号’*HtHCT* 基因的基础上,对该基因进行初步功能研究。由于菊芋是向日葵属六倍体物种($2n=6x=102$),其基因组大小及全基因组序列均未知^[33],对全基因鉴定和分析菊芋 *HCT* 基因造成了极大困难,并导致有关菊芋 *HCT* 基因数目、结构、染色体分布及表达特性的信息十分匮乏。因此,在以后的研究中,可以借助转录组测序及其他已公布基因组序列的向日葵属物种信息来挖掘更多的菊芋 *HCT* 基因,并结合基因表达分析和 *HCT* 酶活分析,筛选在木质素合成过程中发挥主要作用的 *HCT* 基

因^[9]用于菊芋木质素含量的遗传改良。查尔酮合成酶也可以香豆酰辅酶 A 作为底物,从而将苯丙烷代谢引向类黄酮物质的合成,因此其与 *HCT* 间可能存在一定的底物竞争,故本研究也测定了转基因植物中的类黄酮含量。除本氏烟转基因株系 NbL7 外,在其余的拟南芥和本氏烟转基因材料中,类黄酮含量较野生型材料均发生不同程度的下降,这与 Besseau 等^[7]在 *HCT* 基因发生沉默的拟南芥株系中测得较高的类黄酮含量结果相近。木质素合成过程复杂,受多种酶的调控及时间、空间和外界环境的影响^[34],而相较于单个酶基因的调节,同时调节多个木质素合成相关酶基因对木质素的改良效果更明显^[35]。此外,植物木质素含量的调节应在一定的范围内,既要保证植物的正常生长,还要兼顾实际生产中对木质素含量和组成的要求^[36]。

本研究在拟南芥和本氏烟中异源表达菊芋 *HtHCT* 基因,初步探明了该基因在木质素合成过程中的作用。在后续的研究中,笔者将继续挖掘菊芋木质素代谢相关基因,建立和完善菊芋的遗传转化体系,以期对菊芋木质素含量的遗传改良奠定基础。

参考文献 Reference:

[1] 李 伟,熊 瑾,陈晓阳. 木质素代谢的生理意义及其遗传控制研究进展[J]. 西北植物学报,2003,23(4):675-681.
LI W,XIONG J,CHEN X Y. Advances in the research of physiological significances and genetic regulation of lignin metabolism[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*,2003,23(4):675-681.
[2] BOERJAN W,RALPH J,BAUCHER M. Lignin biosynthe-

- sis[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 54: 519-546.
- [3] 李 桢,王宏芝,李瑞芬,等. 植物木质素合成调控与生物质能源利用[J]. *植物学报*, 2009, 44(3): 262-272.
- LI ZH, WANG H ZH, LI R F, *et al.* Lignin biosynthesis and manipulation in plants and utilization of biomass energy [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2009, 44(3): 262-272.
- [4] 李 倩,盖江涛,白蓓蓓,等. 茄科植物中 *HCT* 基因家族的鉴定及进化和表达分析[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(19): 65-68.
- LI Q, GAI J T, BAI B B, *et al.* Identification, evolution and expression analysis of *HCT* gene family in Solanaceae plants[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(19): 65-68.
- [5] 石海燕,张玉星. 木质素生物合成途径中关键酶基因的分子特征[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(5): 288-291.
- SHI H Y, ZHANG Y X. Molecular characterization of key enzyme genes related to the pathway of lignin biosynthesis [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(5): 288-291.
- [6] YE H S Y, HUANG F C, HOFFMANN T, *et al.* FaPOD27 functions in the metabolism of polyphenols in strawberry fruit (*Fragaria* sp.) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 518.
- [7] BESSEAU S, HOFFMANN L, GEOFFROY P, *et al.* Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19: 148-162.
- [8] 谢素霞,程 琳,曾 威,等. 茶树 *HCT* 基因的克隆及表达 [J]. *东北林业大学学报*, 2013, 41(6): 19-22, 37.
- XIE S X, CHENG L, ZENG W, *et al.* Molecular cloning and expression of *HCT* gene from *Camellia sinensis* [J]. *Journal of Northeast of Forestry University*, 2013, 41(6): 19-22, 37.
- [9] MA C, ZHANG H, LI J, *et al.* Genome-wide analysis and characterization of molecular evolution of the *HCT* gene family in pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2017, 303: 71-90.
- [10] HU L, XU Z, WANG M, *et al.* The chromosome-scale reference genome of black pepper provides insight into piperine biosynthesis [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4702.
- [11] CHAO N, QI Q, LI S, *et al.* Characterization and functional analysis of the hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase (*HCT*) gene family in poplar [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e10741.
- [12] 高洁铭,杨世鹏,孙雪梅,等. 菊芋种质资源鉴定及 DNA 指纹图谱的构建 [J]. *西南农业学报*, 2019, 32(8): 1892-1897.
- GAO J M, YANG SH P, SUN X M, *et al.* Identification of *Helianthus tuberosus* L. germplasm resources and construction of DNA fingerprint [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 32(8): 1892-1897.
- [13] 赵孟良,王紫莹,赵文菊,等. 菊芋块茎浸提液对生菜种子萌发生长的化感作用 [J]. *生态学杂志*, 2020, 39(7): 2205-2213.
- ZHAO M L, WANG Z Y, ZHAO W J, *et al.* Allelopathic effects of extracts from *Jerusalem artichoke* tuber on seed germination and growth of *Lactuca sativa* L. [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2020, 39(7): 2205-2213.
- [14] 闻奋亮,隆小华,岳 杨,等. 菊芋蔗糖代谢相关产物与关键酶基因对高温的响应 [J]. *生态学杂志*, 2020, 39(1): 82-92.
- WEN F L, LONG X H, YUE Y, *et al.* Responses of related products and key enzyme genes in sucrose metabolic pathway to high temperature in *Jerusalem artichoke* [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2020, 39(1): 82-92.
- [15] JUNG H G, ALLEN M S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants [J]. *Journal of Animal Science*, 1995, 73: 2774-2790.
- [16] KIM S, PARK J M, KIM C H. Ethanol production using whole plant biomass of *Jerusalem artichoke* by *Kluyveromyces marxianus* CBS1555 [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169: 1531-1545.
- [17] SONG Y, WI S G, KIM H M, *et al.* Cellulosic bioethanol production from *Jerusalem artichoke* (*Helianthus tuberosus* L.) using hydrogen peroxide-acetic acid (HPAC) pretreatment [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 214: 30-36.
- [18] 张新业,王聪艳,苏彦苹,等. 菊芋木质素合成相关基因 *HtHCT* 的克隆及表达分析 [J]. *植物生理学报*, 2020, 56(5): 1023-1032.
- ZHANG X Y, WANG C Y, SU Y P, *et al.* Cloning and expression analysis of lignin biosynthesis related gene *HtHCT* from *Helianthus tuberosus* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2020, 56(5): 1023-1032.
- [19] CLOUGH S J, BEN A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735-743.
- [20] HORSCH R B, FRY J E, HOFFMANN N L, *et al.* A simple and general method for transferring genes into plants [J]. *Science*, 1985, 227(4691): 1229-1231.
- [21] BAO Y, WANG C, JIANG C, *et al.* The tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-like family protein SEVEN IN ABSENTIA 2 (SINA2) promotes drought tolerance in an ABA-dependent manner in *Arabidopsis* [J]. *New Phytologist*, 2014, 202: 174-187.
- [22] LIU D, SHI L, HAN C, *et al.* Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(9): e46451.
- [23] LIU W, HUSSAIN S, LIU T, *et al.* Shade stress decreases stem strength of soybean through restraining lignin biosynthesis [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019,

- 18(1):43-53.
- [24] 宋 银,武玉翠,张 媛,等. 丹参木质素及其单体含量的测定[J]. 分析科学学报,2011,27(5):586-590.
- SONG Y, WU Y C, ZHANG Y, *et al.* Determination of lignin content and lignin monomer composition in *Salvia miltiorrhiza* Bge. [J]. *Journal of Analytical Science*, 2011,27(5):586-590.
- [25] 靳 磊,张延龙,牛立新,等. 3 种百合鳞茎中多酚类物质的抗氧化活性分析[J]. 西北植物学报,2014,35(5):995-1001.
- JIN L, ZHANG Y L, NIU L X, *et al.* Antioxidant activity of polyphenolic compounds in bulbs of three *Lilium* species[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014, 35(5):995-1001.
- [26] LI X, BONAWITZ N D, WENG J K, *et al.* The growth reduction associated with repressed lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* is independent of flavonoids[J]. *The Plant Cell*, 2010,22:1620-1632.
- [27] HOFFMANN L, BESSEAU S, GEOFFROY P, *et al.* Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 2004,16:1446-1465.
- [28] SHADLE G, CHEN F, SRINIVASA REDDY M S, *et al.* Down-regulation of hydroxycinnamoyl CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase in transgenic alfalfa affects lignification, development and forage quality[J]. *Phytochemistry*, 2007,68:1521-1529.
- [29] GALLEGÓ-GIRALDO L, JIKUMARU Y, KAMIYA Y, *et al.* Selective lignin downregulation leads to constitutive defense response expression in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *New Phytologist*, 2011,190:627-639.
- [30] WAGNER A, RALPH J, AKIYAMA T, *et al.* Exploring lignification in conifers by silencing hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyltransferase in *Pinus radiata* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007,104(28):11856-11861.
- [31] 李琳玲,程 华,许 锋,等. 转银杏查尔酮合成酶基因烟草叶片黄酮含量和成分的变化[C]. 全国第十八次银杏学术研讨会论文集,2009.
- LI L L, CHENG H, XU F, *et al.* Changes of flavonoid content and components in transgenic tobacco plants by sense and antisense of chalcone synthase gene from *Ginkgo biloba* [C]. Proceedings of the 18th National Seminar on Ginkgo, 2009.
- [32] 韩伯涛,盖 颖,蒋湘宁. 正义、反义、干涉调控肉桂酰辅酶A脱氢酶基因对烟草的影响[J]. 广东农业科学,2013(11):140-144,156.
- HAN B T, GAI Y, JIANG X N. Regulation of Cinnamoyl-CoA reductase by sense, antisense and RNAi method to tobacco [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013(11):140-144,156.
- [33] ZHANG A, HAN D, WANG Y, *et al.* Transcriptomic and proteomic feature of salt stress-regulated network in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) root based on de novo assembly sequencing analysis[J]. *Planta*, 2018, 247:715-732.
- [34] 胡 可,严雪锋,栗 丹,等. 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.
- HU K, YAN X F, LI D, *et al.* Genetic improvement of perennial ryegrass with low lignin content by silencing genes of CCR and CAD [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, 22(5):72-83.
- [35] 赵华燕,魏建华,宋艳茹. 木质素生物合成及其基因工程研究进展[J]. 植物生理与分子生物学学报,2004,30(4):361-370.
- ZHAO H Y, WEI J H, SONG Y R. Advances in research on lignin biosynthesis and its genetic engineering [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004,30(4):361-370.
- [36] 魏建华,宋艳茹. 木质素生物合成途径及调控的研究进展[J]. 植物学报,2001,43(8):771-779.
- WEI J H, SONG Y R. Recent advances in study of lignin biosynthesis and manipulation [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001,43(8):771-779.

Effect of Heterologous Expression of *HtHCT* Gene from *Helianthus tuberosus* on Lignin-related Physiological and Biochemical Indicators of Recipient Plants

ZHANG Xinye^{1,2,3}, SU Yanping¹, ZHU Shu¹, WANG Congyan^{1,2},
HOU Xiaoqiang¹ and LI Wenjing^{1,2,3}

(1. College of Life Science, Langfang Normal University, Langfang Hebei 065000, China;

2. Hebei Key Laboratory of Animal Diversity, Langfang Hebei 065000, China;

3. Langfang Key Laboratory of Cell Engineering and Application, Langfang Hebei 065000, China)

Abstract Hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase (HCT) is one of the key enzymes involved in lignin synthesis. In this study, the plant expression vector pCAM-BIA1390-*HtHCT* of *HtHCT* gene from *Helianthus tuberosus* was constructed, and then the recombinant expression vector was transformed into *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana*, respectively. At last, physiological and biochemical indicators of transgenic lines and wild type were measured. The PCR and RT-PCR results indicated *HtHCT* gene had been integrated into the genome of recipient material and transcribed successfully. The analysis of physiological and biochemical indicators results showed that *HtHCT* could regulate the lignin content and composition in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana*. In addition, the flavonoids content of recipient plants was also affected by the introduction of *HtHCT*.

Key words *Helianthus tuberosus*; *HtHCT*; Lignin; Flavonoids; Functional analysis

Received 2021-01-28

Returned 2021-03-07

Foundation item Science and Technology Research Project for Colleges and Universities in Hebei Province (No. BJ2018044); Langfang Science and Technology Support Project (No. 2019012003).

First author ZHANG Xinye, male, Ph. D, lecturer. Research area: plant molecular breeding. E-mail: zhigancao@126.com

Corresponding author LI Wenjing, female, Ph. D, associate professor. Research area: molecular biology. E-mail: liwenjing@lfnu.edu.cn

(责任编辑:潘学燕 Responsible editor: PAN Xueyan)