

评述与展望

Review and Prospect

木质素合成关键酶咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶的研究进展

王华美¹ 于延冲² 付春祥² 周功克² 高欢欢^{1*}

1 兰州大学生命科学学院, 兰州, 730000; 2 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 中国科学院生物燃料重点实验室和山东省能源生物资源重点实验室, 青岛, 266101

* 通讯作者, gaohh@lzu.edu.cn

摘 要 木质素是植物次生细胞壁的主要组分, 其合成涉及多个酶的参与。其中咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶(Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, CCoAOMT)是植物木质素合成中的一个关键酶, 能催化咖啡酰辅酶 A (Caffeoyl-CoA)生成阿魏酰辅酶 A (Feruloyl-CoA), 主要参与 G- 木质素的合成。本文综述了 CCoAOMT 的特征、功能及其在木质素生物合成中的调控作用, 展望了该基因的研究方法及其在生产中的应用。

关键词 咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶, 木质素, 生物合成

Progress of a Key Enzyme-Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in Lignin Biosynthesis

Wang Huamei¹ Yu Yanchong² Fu Chunxiang² Zhou Gongke² Gao Huanhuan^{1*}

1 School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, 730000; 2 Key Laboratory of Biofuels, Chinese Academy of Sciences, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences (QIBEBT-CAS), Qingdao, 266101

* Corresponding author, gaohh@lzu.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.033.000000

Abstract Lignin is a main component of plant secondary cell wall. Lots of enzymes take part in its biosynthesis. Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase (CCoAOMT) plays crucial roles in this process. It can catalyze Caffeoyl-CoA to generate feruloyl-CoA, mainly participating in the form of G-lignin. In this article, we summarize the characteristic and function of CCoAOMT, as well as its regulation on lignin biosynthesis. We also prospect the research approach of this gene and its applications in production.

Keywords Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, Lignin, Biosynthesis

木质素是一种复杂的芳香族复合物, 由苯丙氨酸代谢而来, 是由香豆醇、松柏醇和芥子醇三种单体组成的异质聚集体, 这些单体分别聚合形成对-羟基苯基木质素(H)、紫丁香基木质素(S)和愈创木基木质素(G), 聚合形成复杂的木质素(Baucher et al., 1998)。它主要存在于次生加厚细胞的细胞壁中, 能够增加植物的硬度和抗压强度, 同时赋予植物抵抗伤害, 病原体侵染, 代谢胁迫及细胞内部紊乱等生物和非生物胁迫的能力, 是植物中仅次于纤维素的一种重要大分子有机物(Whetten and Sederoff, 1995, Boerjan et al., 2003, Vanholme, et al., 2010)。然而, 饲料中的木质素不利于牲畜的消化和吸收; 造纸中木质素的消除不仅费时费力, 还会造成严重污染; 另外, 木质素

也是影响纤维素水解的一个重要因素, 其存在严重阻碍了纤维生物质能源的利用。因此, 改变木质素含量和组分是当前木质素研究的主要热点。

木质素的合成由许多酶参与, 其中咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶 CCoAOMT 是该过程中的一个关键的甲基化酶, 主要负责木质素合成中芳香环上羟基的甲基化, 与 G 型木质素的合成密切相关。

国内外通过基因克隆, 转基因等手段对 CCoAOMT 的研究取得了一定的进展。本文主要综述了 CCoAOMT 的特征, 在木质素合成中的地位以及其在调节木质素合成研究中的现状, 并展望了对 CCoAOMT 的研究在调控木质素生物合成中的作用及意义。

1 CCoAOMT 特征及表达分析

1.1 CCoAOMT 基因家族

CCoAOMT 在木质素生物合成相关的酶中发现较晚,是由 Kühnl 等(1989)和 Pakusch 等(1989)分别在胡萝卜和欧芹的细胞悬浮培养中发现的,最初认为其主要与植物的防御机制有关。1991 年 Schmitt 等(1991)首次在欧芹中克隆到 CCoAOMT 的 cDNA,但并不清楚其功能。1994 年 Ye 等(1994)在对百日草的研究中证实 CCoAOMT 基因参与木质素的生物合成,同时也发现在百日草中存在 5~10 种 CCoAOMT。1998 年 Martz 等(1998)从烟草中分离出 4 种 CCoAOMT 基因,其中两种属于组成型表达,另外两种在花器官和受到烟草花叶病毒侵染的叶片中大量表达。2004 年,赵华燕等(2004)从水稻中分离到 CCoAOMT 家族的 3 个基因。除上述植物外,在拟南芥、杨树、棉花等多种植物中先后都发现了多种 CCoAOMT 基因(魏建华等, 2001; Do et al., 2007; 吕萌等, 2010)。因此,CCoAOMT 存在多基因家族现象,这可能与木质素不同的生理功能相关。

1.2 保守性及同源性分析

CCoAOMT 具有多基因家族现象,其家族具有高度保守性。Joshi 和 Chiang (1998)对该基因家族进行分析,发现 CCoAOMT 的氨基酸序列有 8 个保守序列元件,其中 3 个为植物甲基化酶的共有元件,即 A (LVKVGGLIG)、B (VAPPDAPLRKY) 和 C (ALAVDPRIEICM),其余 5 个为 CCoAOMT 所特有,分别为 D (TSVYPREPEPMKELRELT)、E (KLINAKNTMEIGVYTGYSLLATA)、F (PVIQKAGVAHKIEF)、G (DFIFVDADKDNV) 和 H (GDGITLCRR)。然而,不同物种的基因也有其特异性,基因之间的同源性也会有所差异。赵华燕等(2004)从水稻中分离的 3 个 CCoAOMT 与其他植物中同类 CCoAOMT 基因同源性为 75.43%,其中 OsCOA1 与玉米的 CCoAOMT 有较近的亲缘关系,而其余两个基因——OsCOA20 和 OsCOA26 则属于另外的分支(赵华燕等,2004,科学通报,49(14): 1390-1394)。绿竹的 BoCCoAOMT1 与禾本科植物水稻的 CCoAOMT 类基因有较高的一致性,达到 90.0% (李雪平等, 2008)。而慈竹与绿竹的 CCoAOMT1 基因亲缘关系最近,仅在第 10 个位点发生了缺失,5 个位点发生了变异(吴晓宇等, 2012)。洪艳云等(2011)从南荻中克隆得到的 CCoAOMT,发现其预测蛋白与玉米的 CCoAOMT 酶蛋白同源性高达 94%,系统进化树分析也表明该基因与玉米的

CCoAOMT 亲缘关系最近。Pagadala 等(2009)将从银合欢中分离到的两种 CCoAOMT 进行三维结构分析,表明 CCoAOMT1 和 CCoAOMT2 只有氨基酸不同,不存在功能冗余,精细结构分析表明 CCoAOMT1 含有 9 个 α -螺旋和 6 个 β -折叠而 CCoAOMT2 含有 10 个 α -螺旋和 7 个 β -折叠。近年来,在苔藓中也发现了类似木质素的复合物,Pilipetskii (2013)研究了小立碗藓中与咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶类似的 Pp-OMT1 和 Pp-OMT2,经过底物特异性分析,并与拟南芥 AtCCoAOMT1 相比较,发现其中 Pp-OMT2 可能是真正的 CCoAOMT。对照该基因的进化树(图 1),发现同一属的植物 CCoAOMT 基因的同源性较高,而种属之间的同源性差异较大,这与不同物种中该基因的不同生理功能密切相关,可能也与植物长期的进化趋势密不可分。

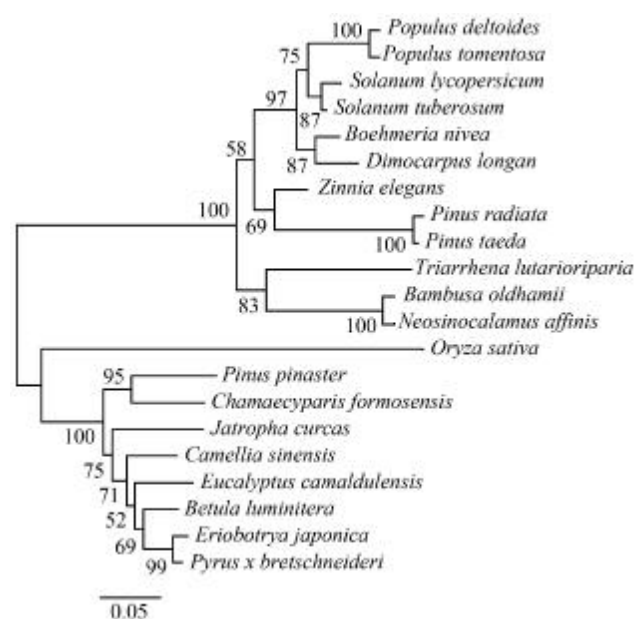


图 1 几种植物 CCoAOMT 基因编码氨基酸的聚类分析
Figure 1 Phylogenetic tree of the coded amino acid sequences of CCoAOMT genes of several plants

1.3 CCoAOMT 基因的表达特性

许多研究表明基因的表达特异性与其生理功能紧密相关。Ye 等(1994)的研究表明 CCoAOMT 在百日草的根、茎和花蕾中表达较多,而叶中较少,在很多双子叶植物中 CCoAOMT 优先分布在管状分子,木纤维和韧皮纤维等木质化组织中,在木射线和硬化的髓中也有积累(Ye, 1997)。赵华燕等在毛白杨中通过 Northern 杂交手段分析表明 CCoAOMT 在生长的次生木质部中表达水平较高,而且丰度与树木的木质化相进程一致(赵华燕, 2001),这与 Meng 和Campbell

(1995)对美洲黑杨 CCoAOMT 的分析研究结果一致。赵华燕等(2004)从水稻中分离的 3 个 CCoAOMT 基因在水稻的各个组织中均有表达,但在木质化程度较高的厚壁组织和维管束中表达量较高。龙眼的 DLCCoAOMT 基因在根、茎、叶中均有表达,且随着低温胁迫时间延长,DLCCoAOMT 在各组织的表达量也发生明显变化,表明其可能参与响应低温胁迫(陈虎等, 2012)。慈竹的 NaCCCoAOMT1 基因主要集中在较幼嫩的组织中表达,其在未展开的叶、笋的中上部,茎的中上部表达量较高,而在完全展开的叶、笋和茎的下部表达量较低,茎下部的表达量更低(吴晓宇等, 2012)。吕萌等用半定量 RT-PCR 方法研究发现陆地棉中 CCoAOMT 基因在根、茎和花瓣中表达较强,而在叶、胚珠中表达很少,而 CCoAOMT2 则在子叶中有较高的表达量(吕萌等, 2010)。在拟南芥的 7 个 CCoAOMT 基因中,CCoAOMT1 在所有组织中均有表达,且表达量最高,CCoAOMT5 和 CCoAOMT7 也是组成型表达,但后者在茎发育的后期表达量增加,CCoAOMT4 和 CCoAOMT5 在茎发育过程中均有表达,而 CCoAOMT2,CCoAOMT3 和 CCoAOMT6 只在茎发育的后期表达(Raes et al., 2003)。常瑞娜等对五节芒中 CCoAOMT 的表达分析表明其在幼苗期、抽穗期的茎节、成熟叶片、幼穗都有表达,并与木质素的合成呈相关性(常瑞娜等, 2012)。本实验室用荧光定量实时 PCR 方法分析南荻(*Miscanthus lutarioriparius*)不同组织中 MICCoAOMT 的表达,发现其在叶鞘中表达量最高,地下茎和老茎比幼嫩的茎的表达量高(未发表)。由以上实验结果不难看出,CCoAOMT 的表达存在明显的组织特异性和时期特异性,大多与木质素合成的进程相一致,表明 CCoAOMT 参与木质素的生物合成。

2 CCoAOMT 在木质素生物合成途径中的作用与调控

2.1 木质素的生物合成及几个关键酶的功能

木质素的生物合成过程十分复杂,从苯丙氨酸起始,经过苯丙烷途径,及木质素合成特异途径,再通过一系列复杂的脱氨基、甲基化、羟基化、连接、还原等反应,生成三种单体,分别聚合形成 G- 木质素, S- 木质素和 H- 木质素,这些木质素最后聚合在一起形成聚合体(Guo et al., 2001)。

许多国内外综述表明,在这一过程中,涉及到许多酶的参与。在木质素单体合成的起始反应中,苯丙

氨酸经 PAL 催化形成肉桂酸,再经 C4H 催化生成香豆酸。羟基化反应中涉及两个酶:其中 C3H 催化香豆酸生成咖啡酸;而羟基化酶 F5H 在木质素合成途径中能催化松柏醛和松柏醇生成 S- 木质素单体。在两个甲基化酶中,目前普遍认为 COMT 在木质素生物合成中能够将咖啡酸、5- 羟基松柏醛和 5- 羟基松柏醇分别催化生成阿魏酸、芥子醛和芥子醇;而 CCoAOMT 可将咖啡酰 CoA 催化生成阿魏酰 CoA。连接酶 4CL 也是木质素合成中的关键步骤,肉桂酸可在 4CL 的催化作用下生成相应的 CoA 酯,但其具体的功能仍需大量研究来证实。在参与还原反应的两个酶中,CCR 能将 3 种羟基肉桂酸的 CoA 酯通过还原反应生成相应的肉桂醛,再由 CAD 将其分别还原成 3 种肉桂醇(魏建华等, 2001)。这些酶共同作用,经过一系列的复杂反应,最终形成木质素聚合体。

2.2 CCoAOMT 在木质素合成中的作用

最初人们认为,在木质素前体的单体合成的甲基化反应中,咖啡酸氧 - 甲基转移酶(COMT)参与 C5 位置的甲基化,进而参与 S- 木质素的合成;CCoAOMT 通过参与 C3 位置的甲基化,参与 G 木质素的合成。但最近在拟南芥突变体的研究中表明,COMT 和 CCoAOMT 共同参与 C3 位置的甲基化反应(Do et al., 2007)。另外,也有研究表明,CCoAOMT 除参与 G- 木质素合成外,在 S- 木质素底物合成中也起重要作用(Ye et al., 2001)。这些发现大大丰富了我们木质素单体合成中甲基化途径的认识,作为木质素合成过程中甲基化的关键酶,CCoAOMT 不仅可以催化咖啡酰辅酶 A (Caffeoyl-CoA)生成阿魏酰辅酶 A (Feruloyl-CoA),参与 G- 木质素的合成,与 S- 木质素的合成密切相关(Schmitt et al., 1991)。另外,研究表明 COMT1 反义抑制的转基因烟草中,CCoAOMT 的表达受到影响(Martz et al., 1998)。而 CCoAOMT 反义抑制的转基因烟草中,COMT1 的表达也会受到抑制(Pinçon et al., 2001)。这些结果进一步证明了,CCoAOMT 与木质素合成途径中另一个重要的甲基化酶 COMT 共同作用,且两者之间的作用存在补充机制(Parvathi et al., 2001)。因此,CCoAOMT 在木质素合成中具有十分重要的作用。但对 CCoAOMT 究竟是否与 S- 木质素的合成相关,还存在一些争议,需要更多的实验结果来验证。

2.3 CCoAOMT 对木质素生物合成的调控

利用纤维生物质原料生产第二代生物燃料被认为是一种非常有前景的生物燃料发展路线,亦是燃料乙醇产业未来发展的主体和必然趋势,因而已经成为世界各国发展的清洁能源的战略重点。然而,木质纤维生物质通过长期的自然进化而使其空间结构与组成更加复杂化,最终形成其具有抗微生物和酶攻击的天然屏障。目前需要通过复杂的预处理、酶或酸催化水解过程才能将其转变为单糖被下游工业生物技术利用,大大增加了木质纤维生物质的利用成本,而这也正是目前困扰木质纤维生物质能源化利用的关键瓶颈之一。为突破这一瓶颈,国际上总的研究态势是从两方面寻找解决办法:一方面是在转化技术方面的创新;另一方面是通过生物技术调控木质纤维生物质结构与组成,从而提高木质纤维生物质的转化效率。因此,通过基因工程手段抑制 CCoAOMT 的表达,降低木质素含量,改变木质素结构,从而影响木质纤维生物质结构与组成,这对木质纤维生物质资源的高效利用具有十分重要的意义。

作为木质素合成途径中重要的甲基化酶之一,CCoAOMT 基因缺失或者抑制 CCoAOMT 的表达,可以有效降低木质素的含量。在拟南芥中,CCoAOMT 的 T-DNA 插入突变体与野生型相比,茎要略小,木质部元件塌陷,茎中木质素含量降低,且 G-木质素含量降低,S/G 升高(Do et al., 2007)。在 CCoAOMT 下调的转基因亚麻中,木质素的含量降低了,并且 S/G 比值也发生了变化,且伴有木质部组织结构的变化(Day et al., 2009)。对烟草、苜蓿、杨树等的研究表明,CCoAOMT 的表达受到抑制时,木质素的含量降低,并且 S/G 升高,说明 CCoAOMT 与木质素的含量与组分的调控密切相关(Zhong et al., 1998; Zhong et al., 2000; Guo et al., 2001)。而且用傅立叶转换红外光谱法分析 CCoAOMT 的表达受抑制的转基因杨树时,发现其木质素含量下降,很可能与其木质素的结构变得疏松,键间的连接相对松散有关(Zhong et al., 2000)。这个结果也证明了 CCoAOMT 的变化会导致木质素相关结构的改变。

利用基因工程的手段,研究木质素合成的调控,能够有目的的改变植物木质纤维生物质的特性,使其朝着我们需要的方向发展,提高其利用价值。相对于其它木质素合成相关酶,CCoAOMT 的发现相对较晚,但随着研究技术的发展,研究方法的成熟,CCoAOMT 在木质素合成过程中的调控作用也日益

清晰(表 1)。许多研究表明,通过抑制内源 CCoAOMT 基因表达,可以负调控木质素的合成。1998 年,Zhong 等(1998)在 CCoAOMT 反义抑制的转基因烟草中,木质素的含量降低了 36%~47%,其中 G-木质素含量降低得更多,S/G 比值相应增加。Meyermans 等(2000)在抑制 CCoAOMT 抑制转基因杨树中,木质素的含量降低了 12%,同时,S/G 比值也增加了 11%。Marita 等(2003)在 CCoAOMT 反义抑制的转基因苜蓿中发现,木质素含量降低了约 20%,S/G 增加。这与 Guo 等(2001)在苜蓿中的研究结果相吻合。Li 等(2013)在用 RNAi 技术将 CCoAOMT 下调的转基因玉米中,发现木质素含量降低了 22.4%,S/G 比值增加了 57.08%,并且纤维素含量增加了 23.3%。王玲等(2011 江苏农业科学, 2: 62-64) 将美洲黑杨 CCoAOMT 的 cDNA 反向导入烟草中,木质素含量也下降了 9.2%。魏建华等将从毛白杨中克隆的 CCoAOMT 基因的 cDNA 构建了反义表达载体并转入杂交杨树中,发现移栽 5~6 个月的转基因植株中有一株 Klason 木质素含量比未转基因的对照杨树下降了 17.9% (魏建华等, 2001)。此外,Wagner 等(2011)在辐射松中的研究也证明了抑制 CCoAOMT 的表达会影响木质素的含量和组分。这些研究结果表明,在苜蓿、杨树、烟草、松树等物种中,无论是正义或者反义抑制内源 CCoAOMT 的表达大都能够调控木质素的生物合成,有效降低木质素的含量,并且会对木质素的组分产生影响,大多数情况下 G、S 木质素含量都会降低,但 S/G 比值会有所增加,并且不会影响植物的正常生长。这些研究结果表明 CCoAOMT 不仅参与 G-木质素的合成,而且可能在 S-木质素的合成中也起到重要的作用。

由于木质素的生物合成过程中涉及多种途径和多种酶的参与,因此同时抑制多个基因的表达也会对木质素的合成产生影响。赵华燕等(2002, 科学通报, 47 (8):604-607)在烟草中已经研究证明,同时抑制 CCoAOMT 和 COMT 的表达,能够降低木质素的含量,最长达 35%,比分别单独抑制这两个基因的表达降低的幅度都大。进一步表明,CCoAOMT 与木质素合成的其它基因一起,共同参与木质素生物合成的调控。

3 展望

3.1 多基因共整合载体的应用

目前对于木质素合成调控的研究已经比较深入,但大多数都是改变单个基因的表达,而同时改变

表 1 转 *CCoAOMT* 基因植物中木质素变化
Table 1 Genetic manipulation of lignin by changing transgenic plants with *CCoAOMT* gene constructs

基因 Gene	转基因物种 Transgenic plants	方法 Method	酶活变化 Enzyme activity	木质素变化 Change of Lignin	文献 Reference
<i>PtCCoAOMT</i> -1B	杂交杨树 <i>Populus tremula</i> × <i>Populus alba</i>	共抑制	下降 90%	下降 12%, S/G 增加 11%	Meyermans et al., 2000
<i>TCCoAOMT</i> 1, 9	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	Cosuppression 反义抑制	Reduced by 90% 下降 79%~98%	Reduced by 12%, S/G increased by 11% 下降 36%~47%, G 木质素下降, S 木质素下降	Zhong, et al., 1998
<i>PtCCoAOMT</i>	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	Antisense inhibition 反义抑制	Reduced by 79%~98% -	Reduced by 36%~47%, G decreased, S decreased, 下降 3%~37%	刘惠荣等, 2002
<i>PtCCoAOMT</i>	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	Antisense inhibition 反义抑制	-	Reduced by 3%~37% 下降 9.2%	王玲等, 2011, 江苏农业科学, 2: 62-64
<i>PtCCoAOMT</i>	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	Antisense inhibition 反义抑制	-	Reduced by 9.2% 下降 17.9%	赵华燕, 2001
<i>MsCCoAOMT</i>	杂交杨树 <i>Populus tremula</i> × <i>Populus alba</i> 紫花苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	Antisense inhibition 反义抑制	Antisense inhibition 下降 96%	Reduced by 17.9% 下降 17%, G 木质素下降, S/G 增加	Guo et al., 2001
<i>NtCCoAOMT</i> × <i>NtCOMT</i>	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	Antisense inhibition 反义抑制	Reduced by 96% -	Reduced by 17%, G decreased, S/G increased 最高下降 35%	赵华燕等, 2002, 科学通报, 47(8): 604-607
<i>PtCCoAOMT</i>	辐射松 <i>Pinus radiata</i>	Antisense inhibition 共抑制	Antisense inhibition 下降 90%	Reduced by 35% for the most 下降 5%~20%, G 木质素下降, H/G 增加	Wagner et al., 2011
		Cosuppression	Reduced by 90%	Reduced by 5%~20%, G decreased, H/G increased	

多个基因的表达则要通过杂交来完成,比较费时费力。用多基因共整合载体进行的遗传转化则能够同时抑制多个基因的表达,能在短期内获得两个或多个基因共同抑制的转基因植株,方便了人们对木质素合成调控的研究。国内外已经有将木质素合成相关的两个或多个基因通过共整合载体转入植物研究木质素合成的调控,赵华燕等(2002, 科学通报, 47(8):604-607)将 COMT 和 CCoAOMT 反义基因转入烟草中,对木质素的含量和组分进行了分析,证明了 COMT 与 CCoAOMT 在木质素合成中的协同作用。这种多基因共整合的方法也可以用于 CCoAOMT 与其它木质素合成相关基因的共同作用的研究,以期进一步揭示木质素合成的调控机制。

3.2 木质部特异性启动子的应用

根据生产实际需要,获得的目标转基因植株不仅木质素含量要降低,而且最好保持植物自身的抗性等,不影响其正常生长。有报道指出,基因的特异性与启动子的特异性密切相关(Capellades et al., 1996; Gray-Mitsumune et al., 1999)。因此特异性定位启动子可以实现这个目的。目前已经克隆到许多在木质部特异性表达的启动子,如 COMT、4CL、CAD、PAL 等基因的启动子(Leyva et al., 1992; Hauffe et al., 1993; Capellades et al., 1996; Grimmig and Matern, 1997; Hawkins et al., 1997; Šamaj et al., 1998)。它们可以在转基因植株的木质化部位中特异性表达目的蛋白,从而有效控制植物的其它性状,如抗病、抗倒伏等抗性,不影响植物的正常生长。虽然木质部特异性启动子目前在研究中应用较少,但是这种特异性的启动子无疑比组成型启动子更适合用于保持植物的抗性。而在 CCoAOMT 的研究中也可以利用这种木质部特异性启动子,来达到既改变木质素含量和结构,同时保持植物原有抗性的目的。

3.3 转录因子的调控

目前的研究已经证明,利用单个基因来调控木质素的生物合成是改变木质素含量和组分的最简单的方法,而对于其作用的单条途径的具体研究则需要同时调控制整条反应途径的酶活性。Tamagnone 等(1998)证实 R2R3-MYB 转录因子可以通过与 AC 元件结合来调节木质素的合成。目前已经获得了木质素合成关键酶 CCoAOMT 的编码基因的启动子,并在其启动子序列中发现了与转录调节有关的 AC 元件(Grimmig and Matern, 1997)。而 Raes 等对拟南芥木

质素合成相关基因的研究表明 AC 元件可能是木质素生物合成相关酶编码基因调节区域的重要特征(Raes et al., 2003)。首先被发现的木质素特异性转录因子是拟南芥中的 AtMYB85, AtMYB58 和 AtMYB63,这些转录因子过表达只影响木质素的合成。(Zhong et al., 2007; Zhou et al., 2009)。Omer 等(2013)在银合欢中克隆到 R₂R₃-MYB 亚族的 LIMYB1,在该基因过表达的转基因烟草中,木质素合成苯丙烷途径中的相关基因转录水平明显下降,木质素含量也降低。Kawaoka 等(2000)在烟草中克隆的转录因子 NtLIM1,其转化烟草的研究引起了多个木质素合成相关基因转录水平的降低,导致酶活性降低,从而使木质素含量下降。表明转录因子能够同时调控多个木质素合成相关酶的表达,使木质素合成受阻,从而降低木质素的含量。因此,上游转录因子调控也是将来研究 CCoAOMT 调控木质素合成的一个有效方法。

总之,随着基因组学、蛋白质组学、芯片技术、RNA 干扰、分子免疫及其它分析研究手段的进步,木质素的合成途径将会更加完善,CCoAOMT 在木质素生物合成中究竟是否参与 S-木质素的形成,木质素各组分合成是否相互独立等问题将会越来越明确,对其调控的研究也会更加深入和清晰,为纤维生物质资源的有效利用奠定理论基础。

作者贡献

本文主要由第一作者王华美完成,第二作者于延冲提供了很多素材,在文献参考及图表制作中也给予了极大的帮助,第三作者付春祥及第四作者周功克在文章完成和修改过程中提供了重要帮助和指导,通讯作者高欢欢在文章的修改和投稿中提出了重要的修改和参考意见。

致谢

感谢国家科技支撑计划(2013BAD22B01)和国家重点基础研究发展计划(2012CB114501)对本研究的支持。

参考文献

- Baucher M., Monties B., Van Montagu M., and Boerjan W., 1998, Biosynthesis and genetic engineering of lignin, Crit. Rev. Plant Sci., 17(2): 125-197
- Boerjan W., Ralph J., and Baucher M., 2003, Lignin biosynthesis, Annu. Rev. Plant Biol., 54: 519-546

- Capellades M., Torres M.A., Bastisch I., Stiefel V., Vignols F., Bruce W.B., Peterson D., Puigdomènech P., and Rigau J., 1996, The maize caffeic acid o-methyltransferase gene promoter is active in transgenic tobacco and maize plant tissues, *Plant Mol. Biol.*, 31(2): 307-322
- Chang R.N., Wang X.F., and Chen H.P., 2012, Cloning and expression analysis of CCoAOMT and 4CL gene from *Miscanthus floridulus*, *Huabei Nongxuebao (Acta Agriculturae Boreali-Sinica)*, 27(4): 29-35 (常瑞娜, 汪杏芬, 陈鸿鹏, 2012, 五节芒 CCoAOMT 和 4CL 的克隆和表达分析, *华北农学报*, 27(4): 29-35)
- Chen H., He X.H., Luo C., Yang L.T., Zhang B.Q., and Song X.P., 2012, Molecular cloning of longan Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (DLCCoAOMT) and its expression analysis, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 1: 015 (陈虎, 何新华, 罗聪, 杨丽涛, 张保青, 宋修鹏, 2012, 龙眼咖啡酰辅酶 A-O- 甲基转移酶(DLCCoAOMT)基因的克隆和表达分析, *中国农业科学*, 1: 015)
- Day A., Neutelings G., Nolin F., Grec S., Habrant A., Cr  nier D., Maher B., Rolando C., David H., and Chabbert B., 2009, Caffeoyl coenzyme A-o-methyltransferase down-regulation is associated with modifications in lignin and cell-wall architecture in flax secondary xylem, *Plant Physiol. Bioch.*, 47(1): 9-19
- Do C.T., Pollet B., Th  venin J., Sibout R., Denoue D., Barri  re Y., Lapi  rre C., and Jouanin L., 2007, Both caffeoyl coenzyme a 3-o-methyltransferase 1 and caffeic acid o-methyltransferase 1 are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in *Arabidopsis*, *Planta*, 226(5): 1117-1129
- Gray-mitsumune M., Molitor E.K., Cukovic D., Carlson J.E., and Douglas C.J., 1999, Developmentally regulated patterns of expression directed by poplar pal promoters in transgenic tobacco and poplar, *Plant Mol. Biol.*, 39(4): 657-669
- Grimmig B., and Matern U., 1997, Structure of the parsley caffeoyl-CoA-O-methyltransferase gene, harbouring a novel elicitor responsive cis-acting element, *Plant Mol. Biol.*, 33(2): 323-341
- Guo D., Chen F., Inoue K., Blount J.W., and Dixon R.A., 2001, Downregulation of caffeic acid 3-o-methyltransferase and caffeoyl coa 3-o-methyltransferase in transgenic alfalfa: Impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of g and s lignin, *The Plant Cell Online*, 13(1): 73-88
- Hauffe K.D., Lee S.P., Subramaniam R., and Douglas C.J., 1993, Combinatorial interactions between positive and negative cis-acting elements control spatial patterns of 4cl-1 expression in transgenic tobacco, *The Plant Journal*, 4(2): 235-253
- Hawkins S., Samaj J., Lauvergeat V., Boudet A., and Grima-Petenati J., 1997, Cinnamyl alcohol dehydrogenase: Identification of new sites of promoter activity in transgenic poplar, *Plant Physiology*, 113(2): 321-325
- Hong Y.Y., Huang Z.G., and Yi T.Y., 2011, Cloning and bioinformatics analysis of CCoAOMT from *Triarrhena lutarioriparia* var. *lutarioriparia*, *Zhongnan Linye Keji Daxue Xuebao (Journal of Central South University of Forestry & Technology)*, 31(10): 018 (洪艳云, 黄志刚, 易图永, 2011, 南荻 CCoAOMT 基因的克隆与生物信息学分析, *中南林业科技大学学报 ISTIC*, 31(10): 018)
- Joshi C.P., and Chiang V.L., 1998, Conserved sequence motifs in plant s-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferases, *Plant Mol. Biol.*, 37(4): 663-674
- K  hnl T., Koch U., Heller W., and Wellmann E., 1989, Elicitor induced s-adenosyl-l-methionine: Caffeoyl-CoA 3-o-methyltransferase from carrot cell suspension cultures, *Plant Sci.*, 60(1): 21-25
- Kawaoka A., Kaothien P., Yoshida K., Endo S., Yamada K., and Ebinuma H., 2000, Functional analysis of tobacco lim protein ntlm1 involved in lignin biosynthesis, *The Plant Journal*, 22(4): 289-301
- Leyva A., Liang X., Pintor-Toro J.A., Dixon R.A., and Lamb C.J., 1992, Cis-element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns, *The Plant Cell Online*, 4(3): 263-271
- Li X., Chen W., Zhao Y., Xiang Y., Jiang H., Zhu S., and Cheng B., 2013, Downregulation of caffeoyl-coa o-methyltransferase (ccoaomt) by rna interference leads to reduced lignin production in maize straw, *Genet. Mol. Biol.*, 36(4): 540
- Li X.P., Gao Z.M., Peng Z.H., and Yue Y.D., 2008, Cloning and characterization of CCoAOMT gene from *Bambusa oldhamii*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 3: 037 (李雪平, 高志民, 彭镇华, 岳永德, 2008, 绿竹咖啡酰辅酶 A-O- 甲基转移酶基因的克隆与分析, *分子植物育种*, 3: 037)
- Liu H.R., Zhao H.Y., Wei J.H., Shao J.W., Zhu Z.Q., and Song Y.R., 2002, Effects of repression of CCoAOMT expression on lignin biosynthesis in tobacco, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 35(8): 921-924 (刘惠荣, 赵华燕, 魏建华, 邵金旺, 朱至清, 宋艳茹, 2002, 抑制 CCoAOMT 表达对烟草木质素生物合成的影响, *中国农业科学*, 35(8): 921-924)
- Lv M., Ni Z.Y., Wang J., Li B., Luo S.P., and Fan L., 2010, Tissue specificity express analysis of methyl transferase gene COMT and CCoAOMT in cotton, *Henong Xuebao (Journal of Nuclear Agricultural Sciences)*, 24(4): 713-719 (吕萌, 倪志勇, 王娟, 李波, 罗淑萍, 范玲, 2010, 棉花甲基化酶基因

- CCOMT 和 CCoAOMT 的组织特异性表达分析, 核农学报, 24(4): 713-719
- Marita J.M., Ralph J., Hatfield R.D., Guo D.J., Chen F., and Dixon R.A., 2003, Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-o-methyltransferase and caffeoyl coenzyme a 3-o-methyltransferase, *Phytochemistry*, 62(1): 53-65
- Martz F., Maury S., Pinçon G., and Legrand M., 1998, Cdna cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-coa 3-o-methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme, *Plant Mol. Biol.*, 36(3): 427-437
- Meng H., and Campbell W., 1995, Cloning of aspen xylem caffeoyl-CoA 3-o-methyltransferase (Genbank u27116), *Plant Physiology*, 108: 1749
- Meyermans H., Morreel K., Lapierre C., Pollet B., De Bruyn A., Busson R., Herdewijn P., Devreese B., Van Beeumen J., and Marita J.M., 2000, Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme a o-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis, *Journal of Biological Chemistry*, 275(47): 36899-36909
- Omer S., Kumar S., and Khan B.M., 2013, Over-expression of a subgroup 4 r2r3 type myb transcription factor gene from *Leucaena leucocephala* reduces lignin content in transgenic tobacco, *Plant Cell Rep.*, 32(1): 161-171
- Pagadala N.S., Arha M., Reddy P., Kumar R., Sirisha V., Prashant S., Reddy K.J., Khan B., Rawal S., and Kishor P. K., 2009, Phylogenetic analysis, homology modelling, molecular dynamics and docking studies of caffeoyl-coa-o-methyltransferase (ccoaomt 1 and 2) isoforms isolated from subabul (*Leucaena leucocephala*), *Journal of Molecular Modeling*, 15(2): 203-221
- Pakusch A.E., Kneusel R.E., and Matern U., 1989, s-adenosyl-l-methionine: Trans-caffeoyl-coenzyme a 3-o-methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension cultures, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 271(2): 488-494
- Parvathi K., Chen F., Guo D., Blount J.W., and Dixon R.A., 2001, Substrate preferences of o-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-o-methylation of monolignols, *The Plant Journal*, 25(2): 193-202
- Pilipetskii S., 2013, Characterization of two physcomitrella patens caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase-like proteins, Thesis for Ph.D., The State University of New Jersey, Supervisor: Belanger F., pp.5-20
- Pinçon G., Maury S., Hoffmann L., Geoffroy P., Lapierre C., Pollet B., and Legrand M., 2001, Repression of A-O-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth, *Phytochemistry*, 57(7): 1167-1176
- Raes J., Rohde A., Christensen J.H., van de Peer Y., and Boerjan W., 2003, Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis, *Plant Physiology*, 133(3): 1051-1071
- Šamaj J., Hawkins S., Lauvergeat V., Grima-Pettenati J., and Boudet A., 1998, Immunolocalization of cinnamyl alcohol dehydrogenase 2 (cad 2) indicates a good correlation with cell-specific activity of cad 2 promoter in transgenic poplar shoots, *Planta*, 204(4): 437-443
- Schmitt D., Pakusch A.E., and Matern U., 1991, Molecular-cloning, induction, and taxonomic distribution of caffeoyl-coa 3-o-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance, *Journal of Biological Chemistry*, 266(26): 17416-17423
- Tamagnone L., Merida A., Parr A., Mackay S., and Culianez-Macia F.A., Roberts K., and Martin C., 1998, The ammyb308 and ammyb330 transcription factors from antirrhinum regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco, *The Plant Cell Online*, 10(2): 135-154
- Vanholme R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., and Boerjan W., 2010, Lignin biosynthesis and structure, *Plant Physiology*, 153(3): 895-905
- Wagner A., Tobimatsu Y., Phillips L., Flint H., Torr K., Donaldson L., Pears L., and Ralph J., 2011, Ccoaomt suppression modifies lignin composition in pinus radiata, *The Plant Journal*, 67(1): 119-129
- Wei J.H., and Song Y.R., 2001, Recent advances in study of lignin biosynthesis and M. anipulation, *Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Sinica)*, (08): 771-779 (魏建华, 宋艳茹, 2001, 木质素生物合成途径及调控的研究进展, 植物学报, (08): 771-779)
- Wei J.H., Zhao H.Y., Zhang J.Y., Liu H.R., and Song Y.R., 2001, Cloning of cDNA encoding ccoaomt from populus tomentosa and down-regulation of lignin content in transgenic plant expressing antisense gene, *Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Sinica)*, 43(11): 1179-1183 (魏建华, 赵华燕, 张景昱, 刘惠荣, 宋艳茹, 2001, 毛白杨 CCoAOMT cDNA 片段的克隆与转基因杨木质素含量的调控, 植物学报, 43(11): 1179-1183)
- Whetten R., and Sederoff R., 1995, Lignin biosynthesis, *The Plant Cell*, 7(7): 1001
- Wu X.Y., Hu S.L., Cao Y., Lu X.Q., Ren P., Zhou M.J., and Li X.R., 2012, Cloning of CCoAOMT gene in *Neosinocalamus affinis* and its bioinformatics analysis, *Nanjing Linze Daxue Xuebao (Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition))*, 3: 007 (吴晓宇, 胡尚连, 曹颖, 卢学琴, 任鹏, 周美娟, 李晓瑞, 2012, 慈竹 CCoAOMT 基因的克隆及生物信息学分析, 南京林业大学学报(自然科学版), 3: 007)
- Ye Z.H., 1997, Association of caffeoyl coenzyme a 3-o-methyltransferase expression with lignifying tissues in several dicot

- plants, *Plant Physiology*, 115(4): 1341-1350
- Ye Z.H., Zhong R., Morrison W.H., and Himmelsbach D.S., 2001, Caffeoyl coenzyme A-O-methyltransferase and lignin biosynthesis, *Phytochemistry*, 57(7): 1177-1185
- Ye Z.H., Kneusel R.E., Matern U., and Varner J.E., 1994, An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in zinnia, *Plant Cell*, 6(10): 1427-1439
- Zhao H.Y., 2001, Isolation of cDNAs encoding enzymes involved in lignin biosynthesis and obtaiment of transgenic poplars, Thesis for M.S., Xinjiang Agriculture University, Supervisor: Chao R.T., pp.45-46 (赵华燕, 2001, 毛白杨木质素合成相关基因分离和转基因杨树植株获得, 硕士学位论文, 新疆农业大学, 导师: 晁瑞堂, pp.45-46)
- Zhong R.Q., Morrison W.H., Himmelsbach D.S., Poole F.L., and Ye Z.H., 2000, Essential role of caffeoyl coenzyme A-O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants, *Plant Physiology*, 124(2): 563-577
- Zhong R.Q., Morrison W.H., Negrel J., and Ye Z.H., 1998, Dual methylation pathways in lignin biosynthesis, *Plant Cell*, 10(12): 2033-2045
- Zhong R., Richardson E.A., and Ye Z.H., 2007, The myb46 transcription factor is a direct target of *snd1* and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*, *The Plant Cell Online*, 19(9): 2776-2792
- Zhou J., Lee C., Zhong R., and Ye Z.H., 2009, Myb58 and myb63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*, *The Plant Cell Online*, 21(1): 248-266