



单位代码 10635

学 号

西南大學

博士学位论文

杨树 PtoVNS11 和 PtoMYB156 转录因子在次生
壁形成及类黄酮代谢途径中的功能分析

论文作者:

指导教师:

学科专业: 植物学

研究方向: 林木遗传育种

提交论文日期: 2016 年 月 日

论文答辩日期: 2016 年 月 日

学位授予单位: 西南大学

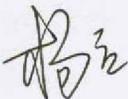
中国 • 重庆

2016 年 4 月

独创性声明

学位论文题目：杨树 PtoVNS11 和 PtoMYB156 转录因子在次生壁形成及类黄酮代谢途径中的功能分析

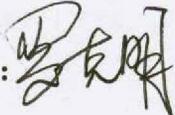
本人提交的学位论文是在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。论文中引用他人已经发表或出版过的研究成果，文中已加了特别标注。对本研究及学位论文撰写曾做出贡献的老师、朋友、同仁在文中作了明确说明并表示衷心感谢。

学位论文作者： 签字日期：2016 年 6 月 10 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解西南大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权西南大学研究生院（筹）可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书，本论文：不保密，保密期限至 年 月止）。

学位论文作者签名： 导师签名：
签字日期： 年 月 日 签字日期： 年 月 日

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	V
第一章 文献综述.....	1
1.1 木本植物细胞壁结构.....	1
1.1.1 植物初生细胞壁结构.....	1
1.1.2 植物次生细胞壁结构.....	1
1.1.3 次生壁形成过程.....	2
1.2 木质素参与的次生壁木质化过程.....	2
1.2.1 木质素生物学特性.....	2
1.2.2 木质化过程.....	3
1.3 植物体内木质素的类型、组成及分子结构.....	3
1.3.1 木质素单体的分布.....	4
1.3.2 木质素单体的生物合成途径.....	4
1.4 影响木质素单体生物合成中几种主要结构酶.....	4
1.4.1 PAL、C4H 和 4CL.....	4
1.4.2 C3H、HCT、CSE、CCOAOMT 以及 CCR、CAD.....	5
1.4.3 F5H 和 COMT.....	7
1.5 影响次生壁木质化的转录调控网络.....	7
1.5.1 一级转录调控网络.....	7
1.5.2 二级转录调控网络.....	7
1.5.3 三级转录调控网络.....	8
1.6 MYB 转录因子参与苯丙烷代谢途径次生产物的合成.....	16
1.6.1 黄酮类化合物的种类与功能.....	16
1.6.2 MYB 转录因子调控苯丙烷代谢途径上其它化合物的合成.....	16
1.7 课题研究目的及意义.....	17
第二章 杨树 PtoVNS11 转录因子对次生壁形成的调控.....	19
引言.....	19
2.1 实验材料.....	19
2.1.1 植物材料.....	19
2.1.2 培养基及人工土配置.....	20
2.1.3 菌株和载体.....	20

2.1.4 试剂及仪器设备.....	20
2.2 实验方法.....	23
2.2.1 生物信息学分析.....	23
2.2.2 拟南芥实验方法.....	23
2.2.3 杨树实验方法.....	27
2.2.4 PtoVNS11:GFP 融合蛋白在洋葱表皮细胞上的亚细胞定位.....	37
2.2.5 酵母单杂交.....	41
2.2.6 烟草瞬时侵染共转化.....	42
2.2.7 木质素含量测定.....	44
2.3 实验结果与分析.....	45
2.3.1 <i>PtoVNS11</i> 基因的克隆及同源性分析.....	45
2.3.2 <i>PtoVNS11</i> 基因的组织表达特异性分析.....	48
2.3.3 <i>PtoVNS11</i> 亚细胞定位分析.....	48
2.3.4 酵母单杂交的转录激活分析.....	49
2.3.5 <i>PtoVNS11</i> 基因启动子表达特异性分析.....	51
2.3.6 <i>PtoVNS11</i> 回复拟南芥突变体功能缺陷实验.....	52
2.3.7 超表达 <i>PtoVNS11</i> 拟南芥表型分析.....	55
2.3.8 在毛白杨中验证 35S: <i>PtoVNS11</i> 基因功能的结果与分析.....	56
2.3.9 <i>PtoVNS11</i> 对木质素合成的调控方式分析.....	60
2.4 小结与讨论.....	63
第三章 杨树 <i>PtoMYB156</i> 基因的克隆和功能分析.....	65
前言.....	65
3.1 实验材料、设备.....	65
3.1.1 植物材料.....	65
3.1.2 菌株和载体.....	65
3.1.3 试剂及仪器设备.....	65
3.2 实验方法.....	65
3.2.1 生物信息学分析.....	66
3.2.2 <i>PtoMYB156</i> 组织表达模式检测.....	66
3.2.3 启动子 <i>ProPtoMYB156:GUS</i> 在拟南芥上的报告表达.....	66
3.2.4 杨树中过表达 <i>PtoMYB156</i>	67
3.2.5 利用 CRISPR/CAS9 技术在杨树中敲除 <i>PtoMYB156</i> 基因.....	70
3.2.6 木质素单体含量检测 (HPLC).....	72
3.2.7 次生壁厚度定量检测.....	73

3.3 实验结果与分析	73
3.3.1 生物信息学分析	73
3.3.2 <i>PtoMYB156</i> 表达模式分析	75
3.3.3 <i>PtoMYB156</i> 的亚细胞定位分析	77
3.3.4 <i>PtoMYB156</i> 的转录抑制活性验证	78
3.3.5 超表达 <i>PtoMYB156</i> 的转基因杨树形态观察	78
3.3.6 超表达 <i>PtoMYB156</i> 杨树的木质素含量测定	79
3.3.7 超表达 <i>PtoMYB156</i> 杨树的木质部细胞显微结构观察	80
3.3.8 <i>Pro35S::PtoMYB156</i> 转基因杨树的基因表达检测	81
3.3.9 <i>PtoMYB156</i> 可以通过结合结构基因启动子影响该基因的表达	83
3.3.10 <i>PtoMYB156</i> 基因敲除杨树的木质素测定	84
3.4 小结与讨论	86
第四章 <i>PtoMYB156</i> 在影响拟南芥的抗 UV-B 辐射适应性方面的功能研究	89
4.1 前言	89
4.2 实验材料与仪器	90
4.2.1 植物材料	90
4.2.2 主要试剂和药品	90
4.2.3 实验仪器	90
4.3 实验方法	90
4.4 实验结果与分析	93
4.4.1 杨树内源 <i>PtoMYB156</i> 的表达响应 UV-B 辐射	93
4.4.2 <i>PtoMYB156</i> 超表达杨树中苯丙烷代谢产物含量检测	93
4.4.3 超表达 <i>PtoMYB156</i> 转基因杨树中黄酮合成相关酶的表达水平的变化	93
4.4.4 异源超表达 <i>PtoMYB156</i> 的拟南芥表型和组分分析	95
4.4.5 转基因拟南芥种子中单宁含量的检测	98
4.4.6 超表达 <i>PtoMYB156</i> 降低拟南芥对 UV-B 辐射耐受性	98
4.4.7 超表达 <i>PtoMYB156</i> 拟南芥植株中抗 UV-B 辐射相关黄酮苷的检测	99
4.4.8 转基因拟南芥中黄酮合成途径相关酶基因表达水平分析	101
4.4.9 <i>PtoMYB156</i> 与杨树中 <i>FLS</i> 、 <i>LAR</i> 的启动子瞬时共表达分析	101
4.5 小结与讨论	102
第五章 总结与展望	105
5.1 研究总结	105
5.2 创新点	107
附 录	109

参考文献..... 113

杨树 PtoVNS11 和 PtoMYB156 转录因子在次生壁形成及类黄酮代谢途径中的功能分析

植物学专业博士研究生 杨立

指导教师 罗克明 教授

摘要

苯丙烷代谢途径是植物次生代谢产物合成中一条重要的生化途径，该途径以苯丙氨酸（Phenylalanine）和酪氨酸（Tyrosine）为底物，在苯丙氨酸裂解酶（Phenylalanine ammonia-lyase, PAL）、肉桂酸-4 羟化酶（Cinnamate-4-hydroxylase, C4H）等催化下，通过下游特异性分支途径，分别合成木质素、花青素、丹宁等次生代谢产物。这些次生代谢化合物在植物生长发育、抵御生物或非生物胁迫中起着重要的作用。比如，木质素作为细胞壁的重要组分，为植物提供机械支撑，并参与病害的防御；而花青素和丹宁等类黄酮化合物则在植物细胞抵御外来非生物胁迫（如紫外辐射）和生物胁迫（如抗病虫害）中扮演了重要角色。在草本植物中，已经证实苯丙烷代谢途径受到了 NAC、MYB 等许多转录因子的调控，而该途径在木本植物的转录调控机制研究还相对较少，因此，解析林木中苯丙烷代谢途径的转录调控机制对于阐明木质素及类黄酮等次生代谢产物合成代谢调控机理具有十分重要的意义。

本文以杨树为研究对象，分别克隆了 NAC 和 MYB 家族转录因子 PtoVNS11 和 PtoMYB156，对其在调控杨树次生壁合成和苯丙烷代谢途径中的生物学功能进行了系统研究，主要结果如下：

（一）从毛白杨（*Populus tomentosa* Carr.）中克隆到一个与拟南芥 SND1 高度同源的 NAC 家族转录因子编码基因 PtoVNS11。该基因编码一个由 416 个氨基酸组成的蛋白，具有 NAC 家族转录因子保守的功能结构域。进化树分析显示，该蛋白与拟南芥和毛果杨中调控次生壁合成调控的关键转录因子 SND1 和 PtrWND1B 的序列相似性分别达 59.6% 和 97.9%，而在 NAC 家族转录因子特有结构域（A~E 结构域）中的氨基酸序列基本一致。推测 PtoVNS11 为 SND1、PtrWND1B 的同源基因，可能具有相似的生物学功能。

实时定量 PCR 分析 PtoVNS11 基因组织表达谱发现，该基因在杨树茎的木质部中特异性表达，暗示其可能参与了对植物次生壁形成的调控。进一步将

PtoVNS11 融合 GFP 构建重组蛋白，亚细胞定位试验证明，PtoVNS11 专一定位于细胞核中。酵母转录激活试验表明，PtoVNS11 具有转录激活特性。同时，克隆 *PtoVNS11* 基因上游 2069 bp 的启动子片段，融合 GUS 报告基因，在转基因拟南芥中证实，该启动子能在营养及繁殖器官的维管组织中表达，且启动子内的 SNBE (Secondary Wall NAC Binding Element) 元件决定了 GUS 基因的表达活性，暗示 PtoVNS11 可能调控了杨树维管组织的发育。

为了搞清 PtoVNS11 的生物学功能，将其构建到由组成型表达启动子驱动的植物表达载体上，首先导入拟南芥 *snd1inst1* 双突变体中，发现该基因可恢复双突变体维管束间纤维及木质纤维形成受阻、茎秆倒伏等缺陷。在拟南芥中过量表达该基因，则引起了木质部细胞和表皮细胞次生壁的异位形成和木质素的过量沉积。上述结果与拟南芥 *SND1*、*NST1* 及 *PtrWNDs* 基因的功能相似，证明 *PtoVNS11* 是杨树次生壁形成中木质素合成的“开关”基因。

进一步在杨树中过量表达 *PtoVNS11*，导致转基因植株茎中木质素含量增加。定量 PCR 分析显示，该基因的超表达激活了转基因杨树中一系列与次生壁合成相关的 NAC/MYB 转录因子和关键酶基因的表达。

(二) 在超表达 *PtoVNS11* 的转基因杨树中，*PtoMYB156* 的表达水平被明显下调，进化树分析发现 *PtoMYB156* 与拟南芥 MYB4 高度同源，而后者已被证实作为转录抑制子参与了拟南芥中木质素合成的调控。因此，推测杨树中的 *PtoMYB156* 是位于 *PtoVNS11* 下游的负调控因子，可能参与了杨树次生壁的生物合成过程。为了解析 *PtoMYB156* 转录因子的生物学功能，从毛白杨 (*P. tomentosa* Carr.) 中克隆了该基因。亚细胞定位试验证明 *PtoMYB156* 定位于细胞核中。启动子表达特性和实时定量 PCR 分析显示，*PtoMYB156* 不仅在毛白杨的茎、根、木质部和茎皮等表达水平较高，而且在叶片及叶柄等组织中含量也比较丰富。酵母单杂交试验证实 *PtoMYB156* 具有转录抑制活性。为了进一步研究 *PtoMYB156* 的生物学功能，构建了 *35S:PtoMYB156* 超表达载体并转化，获得毛白杨转基因超表达株系。利用 CRISPR/Cas9 靶向基因编辑技术，特异的敲除了毛白杨内源的 *PtoMYB156* 编码基因，获得了该基因功能缺失的突变体株系。观察发现 *PtoMYB156* 过量表达引起杨树倒伏、叶片皱缩上卷，转基因杨树茎的直径、成熟叶叶面积及植株总生物量等相关生长指标下降。在分子水平上，多个次生壁形成相关的关键酶基因表达下调。而敲除该基因则导致木质部导管和纤维细胞次生壁厚度增加。同时引起木质素合成酶基因表达显著上升。以上实验结果证明 *PtoMYB156* 基因参与了杨树木质素生物合成途径的调控，进而影响了杨树次生壁的形成和次生木质部的发育。

(三) 为了阐明 *PtoMYB156* 是否参与了杨树类黄酮合成途径中的调控，对 *PtoMYB156* 转基因杨树中类黄酮合成途径中关键美的表达进行了分子检测，发现

C4H, *CHS*, *DFR* 等关键酶编码基因的表达被下调, 暗示 PtoMYB156 可能负调控杨树中花青素、丹宁等类黄酮化合物的合成。为了进一步验证 PtoMYB156 的功能, 将其在拟南芥中过量表达, 发现转基因植株子叶卷曲、体型变小、种子种皮颜色呈浅黄色等表型。DMACA 染色显示转基因种子中丹宁含量明显减少。UV-B 辐射的抵抗试验证实转基因拟南芥的抵御能力减弱。HPLC 检测显示两种类黄酮化合物——槲皮素 (Quercetin)、山奈酚 (Kaempferol) 和可溶性丹宁含量均明显下降。定量 PCR 分析显示参与单宁、槲皮素和山奈酚合成的关键酶基因表达量均有下调。烟草叶片瞬时共表达试验证明, PtoMYB156 能抑制类黄酮合成途径关键酶 *LAR*、*FLS* 及次生壁合成途径中相关基因 *C4H*、*CesA17*、*GT43B* 的表达。上述结果表明, PtoMYB156 通过调节类黄酮化合物的含量, 降低了植物对 UV-B 辐射胁迫的防御能力, 影响了拟南芥种皮中色素的累积。

综上所述, 本论文克隆了两个参与杨树次生壁发育及类黄酮合成调控的转录因子 PtoVNS11 和 PtoMYB156, 并通过转基因技术、基因敲除技术及组织化学等实验方法, 阐明了其对杨树木质部次生壁形成的调控及对 UV 辐射胁迫响应能力的影响, 揭示了两者参与调控苯丙烷代谢途径中多种次生代谢产物合成的分子机制, 为杨树遗传改良奠定了理论基础。

关键词: PtoVNS11, PtoMYB156, 苯丙烷代谢途径, 次生壁, 转录因子, 毛白杨

Functional analysis of PtoVNS11 and PtoMYB156 transcription factors involved in secondary wall formation and flavonoid biosynthetic pathway in poplar

Ph. D Candidate in Botany: Li Yang

Supervisor: Prof. Dr. Keming Luo

ABSTRACT

Phenylpropanoid biosynthesis pathway generates numbers of phenylalanine- derived components involved in secondary metabolism, which are quite important during the whole life cycle of plants. The metabolic flux of carbon skeletons forms different branches of the phenylpropanoid pathway, under the action of catalysis of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*), 4-Hydroxycinnamic acid (*CH*), and synthesize compounds of phenylalanine-derived components including lignin, anthocyanidin, and tannin. These secondary metabolites play important roles in plant growth and development, as well as resistance to biotic or abiotic stresses. For example, lignin is an important component of plant cell wall, which plays a critical role in the normal growth and development of vascular tissues. Flavonoids, Anthocyanidin and tannin, could help resist biotic stresses (such as pests and diseases) and abiotic stresses (such as ultraviolet radiation). Therefore, revealing the mechanism of how phenylpropanoid pathway-related transcription factors involve in lignin and flavonoids biosynthesis is very significant.

In this dissertation, *PtoMYB156* and *PtoVNS11*, two genes that each encode a transcription factor (TF) from the MYB and NAC family, respectively, were cloned from *Populus tomentosa* Carr., and detailed functional studies were carried out on their involvement of lignin or flavonoids biosynthesis regulation in the phenylpropanoid pathway. The main results are as follows.

1. We isolated a NAC domain transcription factor named PtoVNS11 from *Populus tomentosa* Carr. which shares high identity with SND1 of *Arabidopsis thaliana*. Amino acid sequence alignment showed that PtoVNS11 contained an open reading frame (ORF)

encoding a protein of 416 amino acids which shares high identity with SND1 of *Arabidopsis thaliana* (59.6%) and PtrWND1B (97.9%) of *P. trichocarpa*. The characteristic amino acid sequences are almost consistent with others in the conserved region of NAC domain (A~E domain). Therefore, it is quite likely that PtoVNS11 belongs to the same subtype of NAC transcription factors as SND1 and PtrWND1B.

Gene expression analyses of *PtoVNS11* by real time fluorescence quantitative-PCR showed that *PtoVNS11* was mainly expressed in xylem of poplar, suggesting that it may be involved in the regulation of plant secondary wall formation. Subcellular localization assay of PtoVNS11:GFP fusion protein demonstrated that PtoVNS11 has the characteristics of nuclear localization, which was consistent with previous prediction. Transcriptional activation assay showed that PtoVNS11 was a transcription activator. Further, GUS expression driven by the *PtoVNS11* promoter of 2069 bp length was observed in various vascular tissues of vegetative and reproductive organs in transgenic *Arabidopsis*, all of which further imply that PtoVNS11 may affect the whole plant growth cycle of vascular tissue development processes. Promoter deletion analysis revealed that the fragment with the secondary wall NAC binding element (SNBE) was crucially required for *GUS* expression.

In order to understand the biological function of *PtoVNS11*, a plant expression vector Pro_{35S}:*PtoVNS11* was introduced into the *Arabidopsis snd1nst1* double mutant strain and it could effectively complement the secondary wall defects in interfascicular fibers and xylary fibers, and recovered the stiffness of the inflorescence stems. When the Pro_{35S}:*PtoVNS11* vector was expressed in wildtype *Arabidopsis thaliana*, ectopic deposition of lignin in epidermal cells, increased thickness of secondary walls in xylem along with delayed growth were observed. The results were similar to the results reported previously about *AtSND1*, *AtNST1* and *PtrWNDs* genes, which proved that PtoVNS11 was a master switch activating the biosynthetic program for secondary wall formation and lignin biosynthetic pathway of poplar.

Moreover, transgenic lines in poplar showed higher content of lignin in histochemical staining of stem sections. Transcript analysis showed that the expression levels of a series of wood-associated genes were up-regulated in transgenic plants overexpressing *PtoVNS11*. The above results showed that PtoVNS11 was involved in the development of xylem through the regulation of lignin metabolism pathway.

2. Overexpression of *PtoVNS11* in poplar notably repressed the expression of PtoMYB156, a gene with unknown function, which is a close homologue of AtMYB4

that functioned as a negative regulator of lignin biosynthetic metabolism. Therefore, it is reasonable to suppose that PtoMYB156 was a regulatory factor downstream of PtoVNS11 involved in lignin biosynthesis during the development of secondary wall in poplar.

3. In order to elucidate the role of PtoMYB156, we isolated the cDNA of *PtoMYB156* from *Populus tomentosa*. Subcellular localization using the fluorescent protein-tagging approach demonstrated that GFP-tagged PtoMYB156 was exclusively targeted to the nucleus, consistent with its predicted function as a transcription factor. Quantitative RT-PCR analysis showed that *PtoMYB156* was widely expressed in all tissues examined, including stem, root, xylem and bark, and especially highly in leaves. It was found that PtoMYB156 was not able to activate the expression of reporter genes even when it was fused with a VP16 activating sequence in yeast one-hybrid system, indicating that it was likely to be a transcriptional repressor. For further demonstrating the function of PtoMYB156 transcription factor, we constructed a binary pYLCRIPSR/Cas9 multiplex genome targeting vector carrying CAS9-PtoMYB156 and an overexpression vector harboring *Pro_{35S}:PtoMYB156* and obtained knock-out and overexpression transgenic poplar strains with the two vectors, respectively. Morphological analysis of the overexpression plants revealed flattened stem and curled leaves. Lignin autofluorescence of a transgenic leaf showed reduced lignified secondary wall thickening in veins compared with the control. On the other hand, a significant increase in lignin content of the vessel and the fiber secondary cell walls was found in knock-out transgenic poplar, with the expression levels of a number of wood-associated genes significantly increased compared to the control. The results above proved that *PtoMYB156* gene is indeed involved in the phenylpropanoid biosynthesis pathway, and it influences the processes of lignin biosynthesis, leading to abnormal formation of secondary wall in the vascular tissues of poplar.

3. The expression of key enzymes *C4H*, *CHS*, *DFR* in the metabolic pathway of phenylpropanoid pathway were down regulated in *Pro_{35S}:PtoMYB156* transgenic poplar, suggesting that PtoMYB156 may be involved in the synthesis of flavonoids. In order to further study the effect of PtoMYB156 on flavonoid synthesis branch of the phenylpropanoid pathway, the PtoMYB156 transcription factor was investigated by overexpressing in *Arabidopsis thaliana*. The transgenic lines were obviously shorter than the controls and displayed obviously upward curled leaves and weakened resistance to UV-B radiation. We therefore analyzed extracts of 2-week-old rosette leaves by

high-performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and the results confirmed that transgenic plants show a strong reduction of quercetin and kaempferol which were UV-B-absorbing compounds derived from flavonoid biosynthesis. Meanwhile, overexpression of PtoMYB156 caused a pale yellow color seed coat rather than dark brown seen in wild-type Arabidopsis. Quantitative analysis of HPLC as well as DMACA staining proved that the content of soluble tannin was decreased, and the expression level of main genes involved in flavonoid biosynthesis (such as tannin, quercetin and kaempferol) were decreased. Finally, the reporter and effector constructs were co-transfected into tobacco leaves, and subsequent assay of the GUS activity in the transfected tobacco leaves demonstrated that PtoMYB156 effectively repressed the promoters of secondary cell wall-associated genes, for instance, *CAH* (involved in lignin synthesis), *CesA17* (involved in cellulose synthesis), *GT43B* (involved in xylan biosynthesis) , as well as genes of flavonoid biosynthesis such as *LAR* and *FLS*. Together, these results showed that PtoMYB156 was a general repressor of the phenylpropanoid pathway affecting flavonoid biosynthesis and caused decreased resistance to UV-B radiation.

All together, these results illustrated the function of PtoMYB156 in secondary cell wall formation, as well as its regulatory mechanism involved in the regulation of phenylalanine-derived components in secondary metabolism at the level of cell biology, histochemistry, and molecular biology, all of which shed light on genetic improvement of poplar.

Key words: PtoVNS11, PtoMYB156, Phenylpropanoid pathway, secondary cell wall, transcriptional regulation, *Populus tomentosa* Carr.

第一章 文献综述

1.1 木本植物细胞壁结构

1.1.1 植物初生细胞壁结构

细胞壁是包围在植物细胞膜之外的一个具有机械支持作用的外壳。在高等植物中，细胞壁具有营养吸收、抵御外来刺激或伤害、维持细胞形态等重要生理功能。根据细胞壁化学成分的差异以及形成时间空间上的不同，可以分为结构和功能特异的三部分：胞间层，初生壁以及次生壁（见图 1.1-1）。

初生壁是在植物原生质体旺盛生长的时期分泌形成的一层细胞壁。所有植物细胞均具有初生壁。初生壁厚度约 1-3 μm ，具有延展性，能随着细胞的生长而随之变化。在薄壁细胞中，初生壁形成之后，因为不再累积新的壁层，初生壁便成为永久细胞壁。

初生壁主要由纤维素、半纤维素和果胶组成，还包括结构多糖、木质素及少量蛋白质、脂类和矿物质等^[1]，这些结构多糖和少量的蛋白紧密结合。其中，纤维素在细胞壁中含量可达 40-70%，约占植物干重的 1/3，由链状的-1,4-葡聚糖链构成：数十条非分支状态的葡聚糖链构成直径约 3.2 nm 的微纤丝（Microfibril）^[2]，分散平行排列，微纤丝进一步聚集成束成为细胞壁基本骨架。半纤维素的主要类型为木聚糖(Xylan)、甘露聚糖(Mannan)、木葡聚糖(Xyloglucan)和混联型葡聚糖(β -1,3;1,4-glucan)等。经过不同程度乙酰化修饰的半纤维素理化性质发生改变，增加了其与纤维素交联方式的多样性，使得细胞壁的结构更加复杂。木质素在初生壁中含量较少，主要行使提供机械支撑力维持细胞形态的作用。对初生壁功能具有重要作用的一类蛋白是扩展蛋白（Expansin），能结合葡聚糖链并使初生壁松弛，在协助细胞伸长中具有重要的作用^[3]。

1.1.2 植物次生细胞壁结构

次生壁不同于初生壁的是，它是由初生壁内侧继续生长而累积形成的一层细胞壁。主要成分为纤维素、木质素及半纤维素。次生壁质地坚硬，厚度约在 5-10 μm 之间，起到增强细胞外壁机械强度的作用。在植物中，并非所有细胞均具有次生壁，主要在机械组织和输导组织细胞中有次生壁的形成，行使机械支持、水分运输的功能。在显微镜下，一个典型的次生木质部细胞具有三层结构，胞间层(Intercellular cell layer)，初生壁(Primary cell wall)，次生壁(Secondary cell wall)（见图 1.1-1）^[4]中，由于微纤丝的簇状排列形式不同^[5]，造成了光学性质的差异，可将其分为 S1、S2 和 S3 共 3 层^[14]。S1 层中，微纤丝通常沿细胞轴横切面排列；而 S2

层,微纤丝纵向排列;S3中,微纤丝与S1中类似,但横切面角度更大(见图1.1-1)。

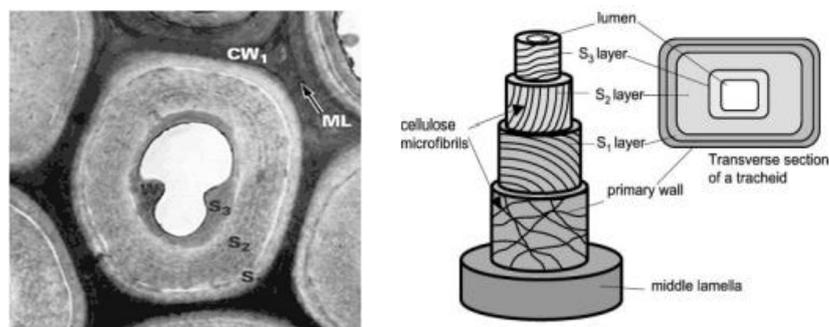


图 1.1-1 植物次生壁立体结构分析^[4]

Figure 1.1-1 Three-dimensional structure of the secondary cell wall^[4].

1.1.3 次生壁形成过程

次生细胞壁的形成过程主要包含几个步骤:四种主要生物大分子组分的生物合成,生物大分子之间的交联、组装,最终的定向排列。在次生壁的形成初期,在胞质伴侣蛋白(Cytosolic Chaperonin containing T-complex Peptide-1, CCT)和引导蛋白(Dirigent Protein)的调节下,包含细胞壁物质的运输小泡往多个方向细胞壁合成位点转运^[6];首先聚合形成的是由纤维素和半纤维素交联形成的一种多孔隙的微纤丝网络结构,也是细胞壁的基本骨架。接下来,木质素单体聚合物、果胶、栓质等成分共价交联填充由微纤丝网络的构成的空隙。这一过程称为次生壁的木质化,使得次生壁的机械强度大幅提高^[7]。在外层次生壁木质化的同时,纤维素微纤丝在半纤维素连接下继续向内形成次生壁骨架,使得细胞壁进一步加厚生长及木质化,形成致密的、宽窄间隔排列的外、内、中三层或多层结构,如图1.1-1所示。

在上述过程中,木质素、多糖、细胞壁蛋白以及果胶等物质是次生壁形成过程中包含的四种主要生物组分。纤维素的定向排列以及木质素的沉积是次生壁形成过程中的重要标志性事件。

1.2 木质素参与的次生壁木质化过程

1.2.1 木质素生物学特性

木质素主要在维管植物的导管分子,木纤维等输导组织或机械组织中含量较多,此外,在一些保护组织(如成熟的茎表皮细胞等)或木本植物中的薄壁细胞(如毛果杨茎秆髓细胞)中也有少量沉积。木质素具有良好机械性和防水性,可帮助植物的机械支撑和水分运输,也是植物细胞抵御病虫害侵食的重要防御分子^[8]。

1.2.2 木质化过程

以杨树中典型的木质部细胞三层结构次生壁为例，当初生壁生长定型，次生壁形成开始后木质素以分散的颗粒状形式出现在初生壁角隅处，同时微纤丝在果胶质等分子参与下不断聚合形成 S1 和 S2 层（图 1.1-1），木质素开始沿角隅处往次生壁多层结构及胞间层其他区域扩展。当 S3 开始形成时，整个细胞内壁上的木质素也快速沉积。

在不同类型的植物细胞中，由于木质素沉积时间、木质化的速度和选择性沉积的方式等有差异，因此形成的次生壁中木质素组分并不相同^[9, 10]。Donaldson 等的分析表明，被子植物细胞壁所含的三类主要木质素单体沉积顺序大致为，H-型木质素，G 型木质素，以及 S 型木质素^[11, 12]，并且导管细胞中木质素含量高于纤维细胞。不同的植物中木质素类型分布也具有组织和细胞特异性。林木的木质部主要含 S 型木质素和 G 型木质素，其中木质部纤维中主要为 S 型木质素，导管细胞中为 G 型木质素，而纤维细胞之间的胞间层为 S-G 两种类型交联分布方式。在拟南芥中，木质部中 G 型木质素高度富集，束间维管纤维（Interfascicular fibers）则主要为 S 木质素^[13]。

因此，植物细胞木质素沉积过程受到时间和空间因素的限制。同时由于木质素是植物生长发育中的一种次生代谢产物，其单体合成途径受到限速酶，转录因子以及激素等多种条件的制约，这也间接影响了细胞次生壁的木质化过程。

1.3 植物体内木质素的类型、组成及分子结构

在高等植物中，木质素是由三种芳香醇单体聚合而成的苯丙烷型高分子聚合物。

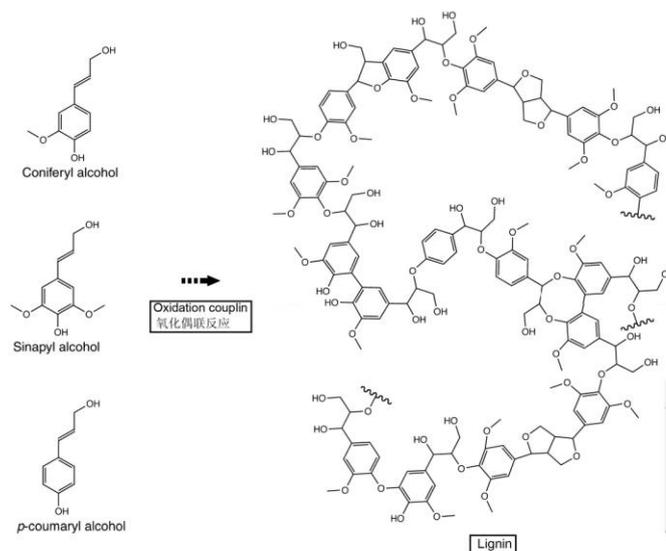


图 1.3-1 木质素是由三种芳香醇单体聚合而成的苯丙烷型高分子聚合物。

Fig. 1.3-1 Phenylpropanoid-based polymer lignin is primarily polymerized from the three hydroxycinnamyl alcohols.

按照其构成的单体和交联方式的不同，木质素可以分为三种类型：分别称为对羟基苯基木质素-H (Hydroxyphenyl)、愈创木基木质素-G (Guaiacyl)、紫丁香基木质素-S (Syringyl lignin) 木质素。其单体结构如图 1.3-1 所示^[14]。

1.3.1 木质素单体的分布

木质素是一类多分子聚合而成的高分子化合物，在不同的植物中，其类型组成也不一样：在裸子植物中主要包含有 G 型木质素，而被子植物中 G 型木质素和 S 型木质素为主要组成成分。H 型木质素单元在裸子植物和被子植物当中含量极低，但相较被子植物而言，在单子叶植物当中的 H 型木质素含量较高。苔藓植物不能合成木质素，但是能够形成可溶的苯丙酯类如黄酮类和木酚素。这表明木质素的生物合成可能在维管植物出现之前就形成了^[15]。

1.3.2 木质素单体的生物合成途径

植物体内，木质素单体的合成需要依次经过草莽酸途径、苯丙烷途径和木质素特异途径。其中，通过草莽酸途径由光合作用初级代谢产物转化产生的苯丙氨酸，可以经过苯丙烷次生代谢途径和其下游的各分支代谢途径（如下图）^[16]，产生诸如木质素、花青素、丹宁、黄酮等重要的次生代谢产物，在植物生长发育和环境适应中具有重要的作用。经过数十年的研究，目前对木质素单体合成中关键酶的功能已经有了初步的了解，木质素合成途径中多数关键酶的基因也已经被克隆。苯丙氨酸首先在苯丙氨酸裂解酶（*PAL*）的脱氨基作用下形成反式肉桂酸，再经肉桂酸-4-羟基化酶（*C4H*）的作用形成香豆酸，香豆酸在香豆酰辅酶 A 连接酶（*4CL*）的催化下形成香豆酰辅酶 A，之后由于在其 C3 和 C5 的位置发生羟基化甲基化反应，苯环分子发生结构变化，再经过 *C3H*，*COMT*，*F5H* 和 *CCoAOMT* 的一系列催化反应形成三种木质素单体。在细胞内合成的木质素单体，经特异转运机制被运输到细胞膜外，在 *PER* 或 *LAC* 的脱氢聚合作用下，于次生细胞壁中交联形成三种不同的木质素^[17, 18]。总之，植物体内的木质素单体合成是一个多种酶协同参与的多级、复杂的化合反应过程，其反应的流向和最终的产物受到体内多重机制的严密调控。

1.4 影响木质素单体生物合成中几种主要结构酶

1.4.1 *PAL*、*C4H* 和 *4CL*

单体木质素生物合成的第一步是经 *PAL* 作用下的由 L-苯丙氨酸转化为反式肉桂酸及氨基离子的非氧化脱氨基反应^[19]。该酶是苯丙烷代谢中最上游的催化酶，参与了类黄酮及木质素在内的多个次生化合物代谢途径。接下来，肉桂酸在 *C4H*

的作用下羟基化, 形成 *p*-香豆酸。*C4H* 是血红素 P450 的细胞色素催化酶^[20]。该酶是一种单氧酶, 能将细胞中的氧气还原为单分子的 H_2O 。还原反应中需要的电子由 NADPH (细胞色素还原酶 P450) 提供^[21]。在烟草中通过反义 RNA 抑制 PAL 和 *C4H* 的表达, 能引起烟草转基因植株中的木质素总含量降低, 并且影响了 S/G 比值^[22-24]。这暗示 S 和 G 型木质素合成的流向受到从 PAL 开始的早期步骤的影响。PAL 和 *C4H* 不仅参与木质素单体合成, 而且也是影响苯丙烷代谢下游其它分支途径的重要因子。

其后, 4CL 由 ATP 水解提供能量, 催化对香豆酸形成相应的辅酶 A 酯类分子。根据对云杉、松树以及拟南芥的研究得知, 4CL 能利用香豆酸和阿魏酸, 甚至咖啡酸和 5-羟基阿魏酸作为其底物^[25]。多个实验研究结果表明, 不同植物中的 4CL 引起的功能并不相同, 有些物种中 4CL 表达量的显著改变能引起转基因植株当中 S/G 木质素组分发生变化^[22, 24]。然而, 1999 年 Hu 等人也发现在杨树中超表达 4CL 并未引起 S/G 木质素组分的变化^[26], 结果的差异说明 4CL 对 S 和 G 木质素单体合成流向的分支有一定影响, 但是并没有决定性作用。

1.4.2 C3H、HCT、CSE、CCoAOMT 以及 CCR、CAD

C3H 属于苯丙烷代谢途径里的羟基化酶, 也是一种 P450 细胞色素酶, 通过催化苯环化合物结构上 C3 位的羟基化反应, 使香豆酸形成咖啡酸^[27, 28]。*C3H* 表达活性下调能引起木质素总含量降低, 同时改变 G/S 单体组分的比例。Abdulrazzak 等人以 T-DNA 插入方式引入拟南芥 CYP98A3, 导致植物生长发育受阻, 总木质素含量降低了 20%-40%, 同时也改变了木质素单体的化学组分^[29]。*HCT* 是催化形成莽草酸酯的作用酶^[30], 处于 *C3H* 羟基化反应的下游之间 (见图 1.4-1), 是控制代谢流在 H 型单体与 G 及 S 型单体之间分配的重要生物酶, 能与 *C3H* 共同催化完成香豆酰辅酶 A 到咖啡酰辅酶 A 的转化。在烟草中将 *HCT* 基因沉默, 会引起 H 单体木质素含量增加, S 木质素单体降低, 说明 *HCT* 也能影响木质素三种主要单体的比例^[31]。*HCT* 在催化形成咖啡酸莽草酸的同时, 也在反向催化咖啡酰辅酶 A 底物的形成, 两者是一个相互可逆的反应过程。咖啡酰 CoA 3-O-甲基转移酶 (*CCoAOMT*) 是木质素单体合成途径上的甲基化酶, 它利用 3-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl methionine, SAM) 为供体, 特异地催化咖啡酰 CoA 的甲基化过程。早在 1989 和 1991 年, Kuhn 等人在欧芹和胡萝卜的悬浮培养液当中发现了该酶的活性, 并且研究提出该酶的活性受到真菌的诱导, 是一种和植物抗病相关的反应酶^[32]。后来在百日草 (*Zinnia elegans* Jacq.) 中发现该酶能影响导管分子的分化, 以及烟草中木质素合成^[33, 34]。Guo^[35]等人的研究证明, 抑制 *CCoAOMT* 能有效降低苜蓿中总木质素含量, 并且能对 G 型木质素进行专一调控导致 G/S 木质素比例

降低。*CSE* (Caffeoyl Shikimate Esterase) 是近年在拟南芥中发现的一种与木质素合成相关的催化酶, 以彩色激光扫描共聚焦显微镜观察 *cse* 突变的拟南芥发现, 茎横切面中木质素含量明显降低, 并且能加速次生壁中纤维素的糖酵解过程, 导致次生壁生物组分的改变^[17]。

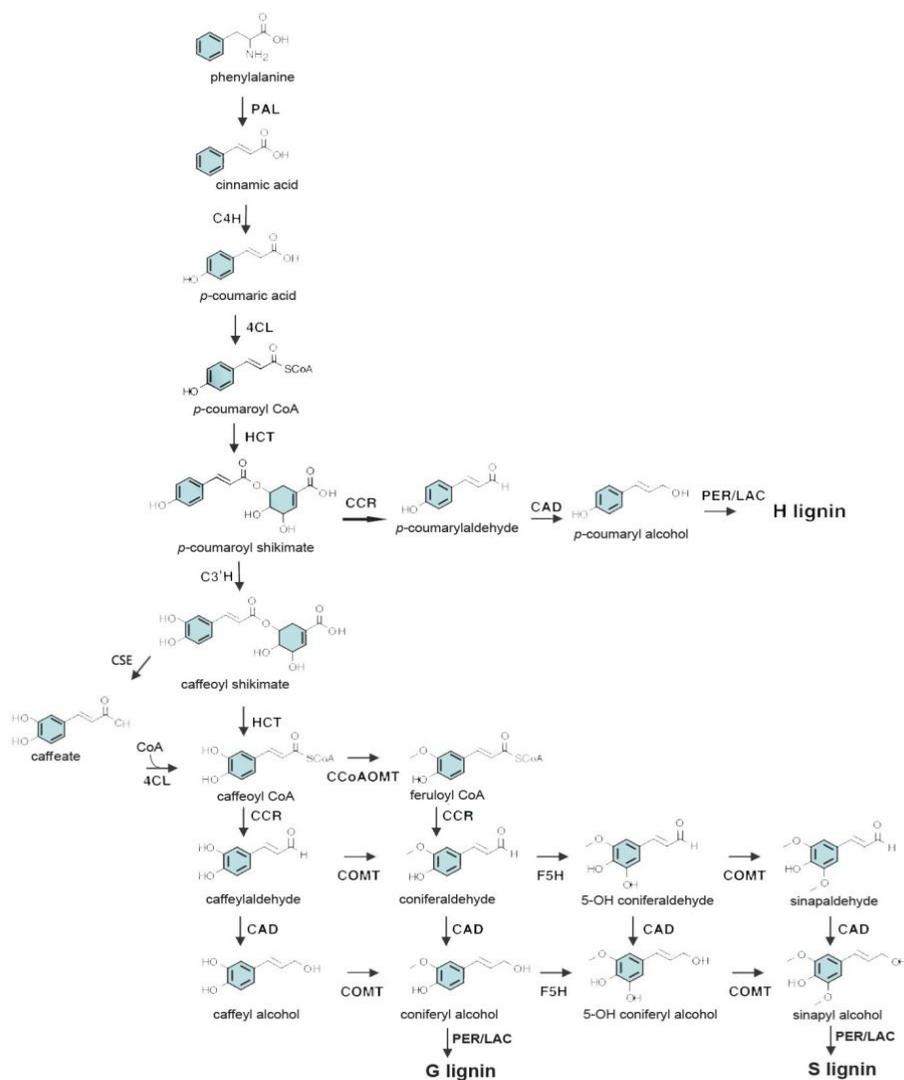


图 1.4-1 木质素单体合成途径

Figure 1.4-1 The monolignol biosynthetic pathway currently.

肉桂酰辅酶 A 还原酶 (Cinnamoyl CoA reductase, *CCR*) 和肉桂酰乙醇脱氢酶 (Cinnamyl alcohol dehydrogenase, *CAD*) 属于木质素特异合成途径上的还原酶类, 前者可将三种羟基肉桂酸 CoA 酯类分子还原成肉桂醛, 后者再将其催化还原为三种不同的肉桂醇。烟草中将 *CCR* 基因反义表达能降低总木质素含量^[36]。早先在 Halpin 的报道中, 以烟草为实验材料抑制 *CAD* 表达, 能引起木质素 S/G 单体比值发生改变, 并且对松柏醛具有底物选择亲和性的特点^[37, 38]。在松树的突变体中当 *CAD* 被

强烈抑制表达后并不能明显改变木质素含量或组分^[39], 说明不同植物中可能由于存在同工酶或受到其它酶催化补偿作用, 对植物木质素生物合成的影响有差异。

1.4.3 F5H 和 COMT

阿魏酸 5-脱氢酶 (*F5H*) 是木质素单体合成途径上的一个羟基化酶, 能特异控制 S 型木质素的合成。在缺乏 *F5H* 活性表达的拟南芥中, S 型木质素单体含量极低, 几乎全部都为 G 型木质素。当在杨树、烟草或拟南芥中超表达 *F5H*, 能引起 S/G 单体比例的显著提高^[40], 因此可 *F5H* 被认为是 S 木质素单体合成的重要代谢控制点。位于 *F5H* 催化反应下一步骤的 *COMT* 能催化 5-羟基松柏醇、5-羟基松柏醛及咖啡酸分别生成对应的芥子酸、芥子醛和阿魏酸, 因此, 抑制 *COMT* 的表达会导致 S 木质素前体合成降低, 导致 S 型单体合成显著下降^[41, 42]。但是该基因所引起的 G/S 单体比例改变的情况在不同物种中也存在差异, 产生这种差异的原因仍不清楚。不过可以统一的观点是, *F5H* 和 *COMT* 是木质素生物合成途径上影响 S 型木质素合成的关键性催化酶, 对植物正常的木质素代谢有着重要意义。

1.5 影响次生壁木质化的转录调控网络

在植物发育过程中, 次生壁的木质化过程受到外界环境因素和内在遗传程序的调控。木质素的合成在次生壁的形成过程中扮演了十分重要的角色。其中, 转录因子在转录水平的调控是关键环节之一。在草本模式植物拟南芥中, 以 NAC-MYB 转录因子家族成员为主体的网络调控机制已经研究得相对较为清楚^[43]。

1.5.1 一级转录调控网络

作为控制整个转录调控的“开关分子”, *SND1/NST1/NST2* 以及 *VND6/7* 转录调控开关 (Master Switches) 位于 *SND2/SND3* 及 *MYB46/MYB83* 等转录因子的上游, 分别特异性调控维管束间纤维、木质纤维分子, 和原生木质部、后生木质部细胞的分化发育; 而 *NST1* 和 *NST2*, 前者 and *SND1* 的表达模式相同, 后者特异性表达于花粉囊的转录因子, 控制纤维细胞的分化^[44, 45]。除此之外, *NST1* 和 *NST3* 在拟南芥角果开裂、散播种子中以功能互为冗余的方式起到关键性调控作用^[46]。

1.5.2 二级转录调控网络

在拟南芥中, *MYB46/MYB83* 被认为是次生壁发育转录调控网络体系中的二级调控因子, 受 *SND1* 的直接调控^[47, 48]。同时, *MYB46/MYB83* 也是 *VND6/VND7* 的靶向调节因子, 当同时敲除 *MYB46* 和 *MYB83* 时, 植物木质部导管和纤维发育严重受阻, 维管组织发育缺陷的情况比 *snd1nst1* 突变体中的表现更加明显; 而当超表达 *MYB46* 或 *MYB83* 时, 会激活下游木聚糖、木质素及纤维素结构基因的显

著上调表达，证实了它们作为次生壁发育中的开关因子特性^[48-50]。

除了 MYB46/MYB83 之外，SND1 调控的二级转录因子还有 SND2、SND3、MYB103、MYB85、MYB52、MYB54、MYB69、MYB42、MYB43、MYB20、以及 KNAT7，它们都能影响次生壁的正常发育。其中 *SND3*、*MYB103* 和 *KNAT7* 是受 SND1 直接调控的靶基因^[51]。抑制 *SND2*、*SND3*、*MYB103* 基因的表达会导致木纤维和维管束间纤维细胞壁厚度降低，反之，超表达这些基因会观察到相反的实验现象，并且这一调控过程是通过直接调控 *CesA8* 基因的表达完成的。此外，MYB103 还受到 VND6、VND7 的直接调控，进而影响木纤维和维管束间纤维细胞壁的厚度。同时，在 David Öhman 等人 2013 年的一项研究中指出，MYB103 也是 *F5H* 表达并合成紫丁香基木质素单体（S-型木质素单体）所必须的，当该转录因子功能缺失时会导致 S-木质素含量降低 70-75%^[52]。这说明 MYB103 转录因子不仅对次生壁的生长结构有影响，也能调控木质素单体组分的合成过程。

Zhong 等人证明 *KNAT7* 是包括 SND1 之外，VND6、VND7 及 NST1、NST2 的直接下游基因^[51]。和其他转录因子不相同的是，*KNAT7* 是一个负调节因子，它能在 OVATE FAMILY PROTEIN 4(*AtOFP1*)的共同参与下，影响次生壁的正常发育^[53]。Li 等人对拟南芥 *knat7* 突变体的研究发现，植株的维管束间纤维细胞壁加厚，但是木质部导管壁变薄、塌陷；超表达 *KNAT7* 基因引起维管束间纤维细胞壁变薄。因此，说明 *KNAT7* 基因对植物维管束间纤维次生壁的形成起着负调控作用。在拟南芥中超表达 *SND1* 时，*KNAT7* 的表达水平有将近 5 倍水平的升高^[54]。Kubo 等人发现它能随着 VND6、VND7，MYB52、MYB43 及 MYB85 的诱导而上调。这表明该转录因子受到不同的转录因子的诱导。

作为二级转录调控因子，当 MYB52、MYB54、MYB69 的表达受抑制后，也能引起木纤维和维管束间纤维细胞壁厚度降低，然而超表达则表型不明显。据推测这些转录因子可能对结构基因的表达水平影响有限^[43]。分子水平的检测结果表明 MYB52、54 能轻微提高 *CESA8*、*IRX9*、*4CL1* 这三个结构基因的表达水平，而 MYB69 则不能。

由于 *AtF5H* 能直接被 SND1 激活，影响 S-型木质素单体的合成^[55]，所以在所有的结构基因之中 *F5H* 在空间上的级联定位是个例外，它既是直接影响木质素单体合成的终端结构基因，也是在一级开关因子 SND1 下面的又一旁支的“二级”作用因子。于是，也能解释当 MYB58 能激活包括 *C4H*、*COMT*、*CCoAOMT*、*4CL* 的木质素单体合成途径上的主要结构基因，却对 *F5H* 几乎没有多大影响^[55]。

1.5.3 三级转录调控网络

受到 MYB46、MYB83 调控的下一级转录因子为 MYB85、MYB58、MYB63，

其中 MYB85 通过结合 4CL 的启动子 AC 元件的方式, 激活木质素单体合成途径^[51, 56]。并且值得注意的是, MYB85 和 MYB58 和 MYB63 一样, 仅仅特异性地影响木质部导管和纤维分子当中的木质素沉积, 对次生壁中的纤维素和半纤维素的合成没有影响^[51, 56]。

另一组位于 MYB46、MYB83 下游的三级转录调控因子也是 MYB 家族成员。包括 MYB42、MYB43、MYB52、MYB54, 它们都能在木质部组织当中特异表达^[51, 57]。尽管如此, 人们对这些转录因子在次生壁形成过程中的功能至今存在争议。2008 年, Zhong 等人在试验中发现, 当 MYB52 或 MYB54 的表达受抑制后能引起拟南芥维管束间纤维分子和导管分子的次生增厚, 但是在超表达实验中并没有显著变化^[51]。另一项对 MYB52 的研究却证明, MYB52 是一个调控次生壁形成的负调控因子, 因为 *myb52* 的拟南芥突变体显示了木质素的异位沉积现象, 并且和次生壁形成相关的基因表达都大幅度升高了^[58]。此外, 在二级转录因子 MYB46/MYB83 的调控下, *MYB43* 基因的表达水平会直接上调, 然而对后者具体功能的分析尚且还没有定论^[57]。

位于 MYB46、MYB83 下游, 受到直接调控的三级转录因子还有以 MYB4、MYB7、MYB32 及 KANT7 为代表的负调控因子^[59]。MYB4、MYB7 和 MYB32 在二级结构上具有相似的抑制元件, 被认为在次生壁发育中起负调控作用^[60, 61]。此外, 具有 C3H 锌指结构域的 *C3H14* 基因及 KNOX 家族的 *KNAT7* 也能受 MYB46、MYB83 调控^[48, 61, 62]。因为 *KNAT7* 也能直接被 *SND1* 激活, 抑制纤维素、半纤维素和木质素的生物合成, 因此, 从整个网络调控体系上说, *KNAT7* 是一个能连接二级和三级转录调控网络的复合型转录调控因子。并且该转录因子发挥作用是以联合 MYB75 形成蛋白质-蛋白质复合体的作用方式进行的^[63, 64]。而后者不仅能以间接方式作为次生壁发育调控网络中的三级调控因子抑制维管束间纤维次生壁的形成, 而且也参与了苯丙烷代谢途径中花青素等类黄酮化合物的合成^[64]。由于同一个转录因子能参与到不同的级联调控网络体系, 这反映了木质素单体合成途径的调控网络的复杂性, 同时也暗示着转录因子的功能具有多元化的特点。

尽管控制次生壁形成的网络体系在拟南芥中得到了较好的阐述, 然而人们对木本植物次生壁发生的转录调控机制的认识还远远不足, 对于如何挖掘有效的功能基因, 揭示林木物种中次生壁形成相关的转录调控规律, 前人已做了大量的工作。到目前为止, 已有一些与植物次生壁形成相关的 NAC/MYB 转录因子得到了鉴定 (见表 1.6-1)。但是由于木本植物生长周期及发育特征上和拟南芥存在一定的差异, 其木质部和韧皮部的发育涉及到更多转录因子和内源植物激素等因素参与的协同调控^[65, 66]而更加复杂。因此, 到目前为止还不完全清楚这些转录因子在林木次生发育和次生壁形成中的具体功能和调控机制。

表 1.6-1 不同物种中与植物次生壁形成相关的 NAC/MYB 转录因子

Table 1.6-1 Transcription factors of NAC/MYB family involved in secondary cell wall biosynthetic pathway from different species.

转录因子	物种	基因家族	生物功能	ID	引用文献
EgMYB1	桉树	R2R3MYB	抑制木质素合成	AJ576024	[67]
PgMYB1	白云杉	R2R3MYB	参与木质素生物合成	FJ475127.1	[68]
PtMYB4	松树	R2R3MYB	促进木质素合成	AY356371	[69]
PtMYB1	松树	R2R3MYB	控制木质素合成	AY356372	[70]
AtMYB61	拟南芥	R2R3MYB	参与木质素合成	At1g09540	[71]
AmMYB330	金鱼草	R2R3MYB	抑制木质素合成	JQ0957	[72]
AmMYB308	金鱼草	R2R3MYB	抑制木质素合成	JQ0960	[72]
AtMYB26	拟南芥	R2R3MYB	促药室内壁次生壁增厚	NM_112243	[73]
AtMYB32	拟南芥	R2R3MYB	负调控影细胞壁发育	NM_119665	[60]
AtMYB103	拟南芥	R2R3MYB	调控次生壁发育, 影响 S-单体木质素合成	NM_105065	[52, 74]
AtMYB46	拟南芥	R2R3MYB	影响次生壁生物合成的开关因子	NM_121290	[75]
AtMYB83	拟南芥	R2R3MYB	影响次生壁生物合成的开关因子	NM_111685	[76]
AtMYB58	拟南芥	R2R3MYB	特异性调控次生壁中木质素合成	NM_101514	[56]
AtMYB63	拟南芥	R2R3MYB	特异性调控次生壁中木质素合成	NM_106569	[56]
AtMYB85	拟南芥	R2R3MYB	特异激活木质素合成途径	NM_118394	[77]

转录因子	物种	基因家族	生物功能	ID	引用文献
AtMYB75	拟南芥	R2R3MYB	抑制木质素合成	NM_104541	[63]
PtMYB8	火炬松	R2R3MYB	促进次生壁合成	DQ399057	[68]
PtrMYB3	毛果杨	R2R3MYB	调控次生壁合成	XM_002299908	[78]
PtrMYB20	毛果杨	R2R3MYB	调控次生壁合成	XM_002313267	[78]
PttMYB21a	杂交杨	R2R3MYB	抑制木质素合成	AJ567345	[79]
EgMYB2	桉树	R2R3MYB	促进次生壁中木质素合成	AJ576023	[80]
OsMYB46	水稻	R2R3MYB	促进表皮细胞木质素、木聚糖纤维素合成	JN634084	[81]
ZmMYB46	玉米	R2R3MYB	调控次生壁合成	JN634085	[81]
ZmMYB31	玉米	R2R3MYB	抑制木质素合成	NM_001112479	[82]
ZmMYB42	玉米	R2R3MYB	抑制木质素合成	NM_001112539	[83]
TaMYB4	小麦	R2R3MYB	负调控木质素合成	JF746995	[84]
PvMYB4	千屈菜	R2R3-MYB	负调控木质素合成	JF299185	[85]
VvMYB5a	葡萄	R2R3-MYB	调控木质素代谢	JQ308622	[86]
SND1/NST3	拟南芥	NAC	次生壁合成开关	NM_103011	[54]
SND2	拟南芥	NAC	参与次生壁发育	NC_003075	[87]
SND3	拟南芥	NAC	参与次生壁发育	NC_003070	[56]
NST1	拟南芥	NAC	影响次生壁形成, SND1 相互冗余	NC_003071	[88]
NST2	拟南芥	NAC	调控次生壁增厚, 影响花粉开裂	NC_003074	[44, 89]
XND1	拟南芥	NAC	负调控木质纤维素合成及木质素中细胞程序性凋亡	NC_003076.8	[90]

转录因子	物种	基因家族	生物功能	ID	引用文献
VND1	拟南芥	NAC	原生木质部和后生木质部导管形成的开关	NC_003071.7	[91]
VND2	拟南芥	NAC	负调控木质素导管的形成	NC_003075.7	[91]
VND3	拟南芥	NAC	原生木质部和后生木质部导管形成的开关	NC_003076.8	[91]
VND4	拟南芥	NAC	维管束合成相关	AT1G12260.1	[91]
VND5	拟南芥	NAC	维管束合成相关	AT1G62700.1	[91]
VND6	拟南芥	NAC	直接调控木质部合成过程中细胞程序性死亡及次生壁形成	NC_003076.8	[92]
VND7	拟南芥	NAC	诱导木质部导管分化	NM_105851.1	[93] [92]
PtrWND1A	毛果杨	NAC	启动子表达引起杨树叶脉、根尖、茎表达明显	HQ215847	[94]
PtrWND1B	毛果杨	NAC	促进纤维细胞次生壁的合成	HQ215848	[95]
PtrWND2A	毛果杨	NAC	促进次生壁异位沉积	HQ215849	[94]
PtrWND2B	毛果杨	NAC	超量表达引起次生壁异位沉积	HQ215850	[96]
PtrWND3A	毛果杨	NAC	参与次生壁形成过程	XM_002322362	[94]
PtrWND3B	毛果杨	NAC	参与次生壁形成过程	XM_002318252	[94]
PtWND4A	毛果杨	NAC	参与次生壁形成过程	XM_002329829	[94]
PtWND4B	毛果杨	NAC	正调控次生壁形成过程	XM_002304392	[94]
PtWND5A	毛果杨	NAC	正调控次生壁形成过程	XM_002310261	[94]

转录因子	物种	基因家族	生物功能	ID	引用文献
PtWND5B	毛果杨	NAC	参与次生壁形成过程	XM_002327730	[96]
PtWND6A	毛果杨	NAC	参与次生壁形成过程	XM_002327206	[97]
PtWND6B	毛果杨	NAC	在杨树中超量表达引起次生壁异位沉积	XM_002325955	[96]
PtrNAC105	毛果杨	NAC	参与次生壁形成过程	XM_002329769	[98]
PtrNAC154	毛果杨	NAC	启动子在根尖、叶主脉表达明显，杨树中超量表达引起植物矮小，提高树皮/木质部比例	XM_002327995	[99,100]
PtrNAC156	毛果杨	NAC	在拟南芥原生质体中证实能激活PtrCesA8 PtrCCoAOMT1 启动子的表达	XM_002309731	[100]
PtrNAC157	毛果杨	NAC	在拟南芥原生质体中证实能激活PtrCesA8 启动子的表达	XM_002305738	[100]
PtrNAC118	毛果杨	NAC	受 ptrWND2B 诱导而上调表达	XM_002304042	[96]
PtrNAC150	毛果杨	NAC	参与次生壁形成过程	XM_002330488	[94]
PtrNAC151	毛果杨	NAC	参与次生壁形成过程	XM_002308265	[94]
PtrNAC129	毛果杨	NAC	在拟南芥中超量表达，引起植株矮小畸形，和 XND1 突变型拟南芥一样	XP_002310519.1	[100]
PtrNAC128	毛果杨	NAC	参与次生壁形成过程	XP_002299679.1	[100]
PtrNAC122	毛果杨	NAC	在拟南芥中超量表达，引起植株矮小畸形，和 XND1 突变型拟南芥一样	EEE94030.1	[100]

转录因子	物种	基因家族	生物功能	ID	引用文献
MtNST1	苜蓿	NAC	影响木质素代谢途径，缺失引起木质素含量下降	GU144511.1	[101]
BdSWN5	二穗短柄草	NAC	通过结合 BdXCP1 参与次生壁程序性细胞死亡过程	JQ693426.1	[102]
BdSWN7	二穗短柄草	NAC	参与次生壁形成过程	JQ693428.1	[102]
PtrMYB152	毛果杨	R2R3MYB	影响木聚化过程	POPTR_0017s02850	[103]
EjNAC1	枇杷	NAC	烟草中诱导木质化	KJ919962	[104]
EjMYB1	枇杷	MYB	影响低温伤害下果肉中木质素含量（激活子）	KF767453	[105]
EjMYB2	枇杷	MYB	抑制低温下果肉中木质素形成	KF767454	[105]
CmMYB1	菊花	R2R3MYB	改变木质素组分及抑制黄酮合成	JF795917	[106]
OsSWN1	水稻	NAC	产生直立叶和封闭花	LOC_Os06g04090	[107]
GhMYBL1	棉花	R2R3MYB	超表达引起拟南芥纤维细胞木质素沉积	KF430216	[108]
LIMYB1	银合欢	R2R3MYB	引起木质素单体合成途径上关键酶基因表达下调	ADY38393.2	[109]
SmMYB39	丹参	R2R3MYB	参与迷迭香酸合成途径，抑制 C4H 表达	KC771280	[110]
GhMYB9	棉花	R2R3MYB	影响棉花纤维的发育	AF336286	[111]
TaMYB72	小麦	R2R3MYB	促进花的开放	JF951957	[112]

转录因子	物种	基因家族	生物功能	ID	引用文献
PdMYB10	美洲黑杨	R2RMYB	促进次生壁增厚,延迟开花	ABX79944	[113]
ANAC005	拟南芥	NAC	抑制形成层和初生壁合成,降低木质素总量。激活次生壁形成	At1g02250	[114]
ANAC075	拟南芥	NAC	VND7 上游基因,引发木质部导管元件的发生	AT4G29230.1	[115]
SbMYB60	高粱	R2R3MYB	改变次生壁组分	Sobic.004G273800	[116]

1.6 MYB 转录因子参与苯丙烷代谢途径次生产物的合成

在苯丙烷代谢途径中，芳香环类底物经衍生之后可形成一类小分子黄酮化合物。它们分布广泛，具有许多生物功能。作为植物抗毒素，能抵御昆虫及食草动物啃噬、病菌侵害；合成色素及芳香类分子，为植物开花、结实，及种子传播等提供便利的条件，促进物种之间的基因交流。再者，对于植物免受紫外线辐射损伤提供保护性色素等。上个世纪 90 年代初期开始，应用基因工程改良植物黄酮类化合物的生物合成就一直一直是植物遗传工程的重要目标之一^[166]。

1.6.1 黄酮类化合物的种类与功能

根据中央三碳链是否构成环状，C₂、C₃、C₄ 位形成的 B 环连接位置等，黄酮类化合物可分为 4 类即小黄酮类(Minor flavonoids)、新黄酮类(Neoflavonoids)，异黄酮类(Isoflavonoids)和类黄酮类(Flavonoids)^[168]。黄酮类化合物是苯丙烷代谢途径的次生代谢产物。植物体内合成的类黄酮化合物除少数以游离分子形式存在之外，大部分与糖结合成糖苷^[169]，对于植物抵御 UV-B 辐射有着重要的生理意义^[167]。

在双子叶植物中，槲皮素和山奈酚是最常见的黄酮苷元，它们的衍生物主要以糖苷形式定位于植物细胞液泡中，发挥抵御紫外辐射的作用^[170]。Li 等发现拟南芥突变体 *tt4* 对 UV-B 辐射具有较高敏感性，经检测发现与野生型相比其体内缺少山奈酚衍生物^[171]。Lois 等人通过拟南芥突变体 *uvs* 对 UV-B 辐射下的生理响应的研究，表明山奈酚鼠李糖苷是植物产生辐射敏感的主要原因^[172]。并且，有报道在一定辐射剂量的 UV-B 辐射条件下，植物体内槲皮素糖苷/山奈酚糖苷的比率随着辐照强度的增加随之升高，因此推断可能槲皮素糖苷比山奈酚糖苷在防御 UV-B 辐射方面更为有效^[173]。这些黄酮类次生化合物能有效吸收 UV-B 辐射，降低在植物表皮细胞中的透射率，从而保护蛋白质、核酸等生物大分子的正常结构，也将植物细胞内的 ROS 降低至保护阈值范围^[174, 175]。

1.6.2 MYB 转录因子调控苯丙烷代谢途径上其它化合物的合成

苯丙烷代谢途径以苯丙氨酸和酪氨酸为原料，经过苯丙氨酸裂解酶(PAL)、肉桂酸-4 羟化酶(C4H)等催化，进入下游的特异性分支途径，合成一类小分子化合物—类黄酮化合物(Flavonoids)。类黄酮化合物种类繁多，对植物抵御真菌等病原微生物起着重要作用。包括木质素、花青素、丹宁和黄酮类化合物在内的次生代谢产物，在植物生长发育、抵御生物或非生物胁迫中起着重要的生理作用。

苯丙烷代谢途径上合成的次生代谢化合物受到结构基因及转录因子的调控表

达调控。研究发现有些 MYB 蛋白能特异调控某种类黄酮化合物的合成,如在葡萄中 VvMYBA1-2 只调控花青素合成代谢途径中结构基因的表达^[117],而 VvMYBPA1 和 VvMYBPA2 则特异调控单宁合成途径中某些关键酶基因的转录^[118,119]。而部分 MYB 转录因子可同时调控多种类黄酮的代谢,如葡萄的 VvMYB5b 在番茄中可以同时调控苯丙烷和类胡萝卜素的代谢途径^[86]。某些 MYB 转录因子可独立调节类黄酮合成途径上结构基因的表达,控制类黄酮的合成。如玉米的 MYB 转录因子 P1 能与 DFR 启动子直接结合,影响花色苷的累积^[120]。MYB 蛋白的 C-端具有转录激活结构域,通过与其它转录因子如 bHLH 和 WD40,三者结合形成 MBW 复合体,共同调控类黄酮的生物合成^[121]。

另外,由于同属于一个亚族的被子植物之间的 MYB 蛋白质结构和生物功能上具有很高的保守性,它们能通过调控结构基因表达活性的方式同时影响多种次生化物的合成。例如 MdMYB3(影响花青素和黄酮合成)^[176], AtMYB12(影响黄酮醇和酚酸合成)^[177], PAP1(影响木质素,花青素,原花青素,黄酮醇和酚酸合成)^[178], FaMYB1(影响花青素,原花青素和黄酮醇合成)^[179], VvMYB5a(影响花青素,原花青素和黄酮醇合成)^[180], StAN1(影响花青素,黄酮醇和酚酸合成)^[181],以及 StMTF1(影响花青素,黄酮醇和酚酸合成)^[182]等。MdMYB3 和 AtMYB12, FaMYB1, 以及 VvMYB5b 分别调控不同的苯丙烷代谢衍生化合物合成的相关结构基因的表达,如 *CHS*, *CHI*, *F3H*, *FLS*, *F3'5'H* 以及 *DFR*, *ANS*, *ANR*, *LAR*, *GT*, *C3H*^[142, 183]。StMTF1 能促进绿原酸生物合成相关的 *HQT* (Hydroxycinnamoyl-CoA quinate:hydroxycinnamoyl transferase) 和预苯酸脱氢酶 (Prephenate dehydratase) 基因的表达,这些基因参与了苯丙氨酸衍生物的前体的合成^[182]。对这些结构基因的启动子进行元件预测分析发现,苯丙烷代谢途径上关键酶基因的启动子序列上含有丰富的 AC 元件,可与 MYB 转录因子结合从而被开启基因的表达^[116]

1.7 课题研究目的及意义

NAC、MYB 家族转录因子参与植物生长发育、胁迫应答等多种信号转导过程,是木本植物适应复杂生物环境的重要调节因子。对植物生长发育而言,细胞壁的合成与重构是植物形态建成,器官发育与细胞信号转导的直接体现。因此解构植物细胞壁的合成机理与调控方式十分重要。

为了研究杨树中次生壁发生的规律,找到对木本植物后生木质部发育过程中具有特异调控效应的作用因子。本文以杨树为实验材料,采用离体培养、遗传转化等实验系统,利用细胞生物学、分子生物学、生物化学、生物信息学等研究手段,揭示了 PtoVNS11 和 PtoMYB156 参与调控苯丙烷代谢途径中多种重要次生产

物合成的生物学功能，并着重解析它们在影响细胞次生壁主要成分的调控机制；阐明了不同的转录因子对木质部细胞分化的调控方式，为将来速生树种材性改良的分子品种设计提供理论和技术支持。

本文在第四章中围绕 **PtoMYB156** 转录因子对类黄酮化合物的合成的调控作用也展开了分析，阐述了该基因对杨树适应 UV-B 辐射等外界环境胁迫的功能，进一步完善了我们对杨树苯丙烷代谢的转录调控网络的认识。

第二章 杨树 PtoVNS11 转录因子对次生壁形成的调控

引言

杨树是世界范围内种植最为广泛的一种速生林木，也是理想的能源植物和木本模式植物^[122, 123]，是生物燃料、制浆以及造纸工业的重要原料。木材中的绝大部分都是次生木质部，而木质部的形成是木质部细胞（纤维，导管，木射线）逐渐累积的结果，这些细胞的分化过程包含了细胞壁增厚及其主要成分木质素、纤维素和半纤维素的生物合成。2007 年 Zhong 等人首次以拟南芥为模型建立了一个控制细胞壁生物合成的转录因子调控网络体系^[79]，随着对木质素形成机理的深入探究，越来越多的关键作用因子被揭示。2014 年 Taylor-Teeples 等人以拟南芥作为模本建立了一个控制木质素代谢的调控网络^[124]。这个网络包含了多层次的“反馈环”（Feed-Forward Loop）调控结构，其中一系列 NAC 转录因子以及其他家族转录因子构成了一个多级调控网，控制了次生壁形成的启动程序。

在拟南芥的转录因子家族当中发现了大约 110 个 NAC 家族成员，其中有 5 个被命名为 SND1 (Secondary Wall-Associated NAC Domain)^[54]，7 个被称作 VND (Vascular Related NAC Domain)。在杨树中，由于进化中的基因组复制事件，同样属于 NAC 家族的转录因子成员的数量远多于拟南芥中，这给该家族中重要转录因子的功能鉴定带来一定的困难；另外，在长期的演化历程中，许多基因由于各种原因产生了不同的功能分化，造成同一个家族不同基因所编码蛋白的生化功能可能发生变化，多路径调控反应的交叉也愈加多变。因此相对草本植物而言，杨树中木质素合成的多级调控网络也更加复杂^[94]。通过与拟南芥中已知与木质素合成相关的转录因子同源比对的方法，我们在毛白杨中发现了一个新的 NAC 家族转录因子，命名为 PtoVNS11（登录号 KU049786），推测它很可能在毛白杨的木质素合成途径中扮演着重要角色。

2.1 实验材料

2.1.1 植物材料

本实验所用的毛白杨 (*P. tomentosa* Carr.) 为本实验室（西南大学资源在植物研究所）温室长期栽培保存品种，用于遗传转化；拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* Columbia) 为本实验室保存品种，用于启动子分析或遗传转化；

实验所用洋葱 (*Allium cepa* L.) 购自永辉超市，用于亚细胞定位实验；瞬时表达所用烟草为本氏烟草 (*Nicotiana benthamianci*)。所用野生拟南芥 (Col-0) 种子，为西南大学罗克明实验室保存提供。所用拟南芥突变体种子为拟南芥生物资

源中心 (Arabidopsis Biological Resource Centre, ABRC) 购买的编号为 SALK_120377C 和 SALK_015495C。

取培养箱中组织培养所得的继代生长约 2.5 个月的野生杨树苗, 抽提总 RNA, 经 RT-PCR 反转后获得 cDNA, 用于组织特异性检测或后续构建载体;

取温室中培养的生长约 6 月的野生杨树苗, 抽提总 DNA, 用于启动子载体构建。

2.1.2 培养基及人工土配置

人工土的配制: 6 份黑土, 2 份蛭石, 1 份珍珠岩的比例, 配制所需的人工土, 将土均匀混合并且将大土块捏碎处理, 使土壤细腻, 并最终分装于小花盆。

2.1.3 菌株和载体

大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α , 农杆菌 EHA105 (*Agrobacterium tumefaciens*) 为本实验室保存。酵母转化菌株 (*Saccharomyces cerevisiae*) AH109 由重庆大学邓伟老师提供。

本实验所用到的载体有: 1、植物表达载体 pCAMBIA1305.1 为本实验室保存; 植物表达载体 pCXSN, 启动子表达载体 pCXGUS-P, 亚细胞定位载体 pCX-DG 为湖南农业大学水稻基因组学实验室王国梁教授提供, 详细资料见参考文献^[125]。

2.1.4 试剂及仪器设备

2.1.4.1 购买的试剂或试剂盒

*Hind*III、*Bgl*II 等多种限制性内切酶、TaKaRa Ex Taq、TaKaRaTaqTM、dNTP Mixture、PrimeSTARTMHS (Premix) DNA Polymerase 高保真酶、rTaq DNA 聚合酶、DNA 分子量标准 DL2000、DL5000、DNA Ligation Kit Ver.2.1 连接试剂盒、Prime ScriptTM reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 反转录试剂盒、RNaseA 等均采购自 TaKaRa 公司; *Xcm*I 限制性内切酶, 购自 NEB 公司; AxyPrep PCR 清洁试剂盒、AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒、AxyPrep 胶回收试剂盒采购自 AXYGEN 公司; E.Z.N.ATM Plasmid mini Kit I 购自 OMEGA 公司; TRIzol® Reagent 试剂购自 Invitrogen 公司; 头孢噻肟钠 (Cefotaxime Sodium, Cef) 购自日本; 利福平 (Rifampicin, Rif)、萘乙酸 (Naphthaleneacetic acid, NAA)、玉米素 (Zeatin, ZT)、6-苄氨基腺嘌呤 (6-Benzylatninopurine, 6-BA), 购自 Sanland 公司; 乙酰丁香酮 (Acetosyringone, As)、卡那霉素 (Kanamycin sulfate, Km)、潮霉素 (hygromycin, Hyg), 购自 Sigma 公司; 盐酸 (HCl)、二甲亚砜 (DMSO) 均购于泰鑫化工公司; x- α -gal、间苯三酚、甲苯胺蓝、酵母所用试剂及氨基酸, 均购于合肥博美生物公司;

其他化学试剂、离心管和移液枪，购自上海鼎国生物技术有限公司；引物合成和测序由华大基因公司和英骏生物技术有限公司完成。

2.1.4.2 自配的主要试剂

试验中所用到的但未列出的主要激素及各种抗生素贮存液均按《分子克隆实验指南》(第三版)^[126]的方法配制，使用前经高压湿热灭菌或抽滤灭菌处理。

(1) DEPC 水: 0.1% DEPC 水溶液于室温过夜后重复灭菌 2 次，后室温保存;

(2) CTAB 法提取缓冲液;

2%CTAB(W/V, cetyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化胺), 2%PVP(W/V, polyvinylpyrrolidone, 聚乙烯吡咯烷酮), 25 mM EDTA, 2.0 M NaCl, 100 mM Tris-HCl(pH8.0), 0.5 g/L spermidine, 该试剂用 0.1% DEPC(V/V)处理的灭菌双蒸水配制。用前加入巯基乙醇至终浓度为 2%^[127]。

(3) 质粒提取试剂

Solution I: 50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris-Cl (pH8.0), 10 mmol/L EDTA(pH8.0), 高压灭菌, 储存于 4° C 冰箱;

Solution II: 0.2 mol/L NaOH, 1% SDS, 母液为 2 mol/L NaOH 和 10% SDS, 分别配置, 保存于 4° C 冰箱;

Solution III: KAc 147 g, 冰醋酸 57.5 mL, H₂O 300 mL 溶解, 后定容至 500 mL, 高压灭菌, 储存于 4° C 冰箱;

(4) 其他主要试剂

醋酸钠: 3 mol/L 醋酸钠(NaAc)溶液, 用冰醋酸调 pH 值至 4.8-5.2;

F.A.A 固定液: 90 mL 70% 乙醇, 5 mL 甲酸, 5 mL 冰乙酸 (成熟组织); 90 mL 50% 乙醇, 5 mL 甲酸, 5 mL 冰乙酸 (幼嫩组织);

溴化乙啶(EB): 配制工作浓度为 0.5 μg/mL, 棕色瓶室温避光保存;

50XTAE 电泳缓冲母液(pH 8.0): 37.2 g/L Na₂EDTA.2H₂O, 242 g/L Tris, 57.1 mL/L 冰醋酸;

间苯三酚液: 5.0 g 间苯三酚溶于 100 mL 95% 的酒精中, 常温保存。

GUS 染液: 1.0 mg/L 5-溴-4-氯-3-吡啶-D-葡萄糖苷, 2% (V/V) 甲醇, 1.0 mg/L K₄Fe(CN)₆·0.1% (V/V) Triton X-100 和 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 4° C 避光保存。

2.1.4.3 实验仪器设备

大型精密仪器: OLYMPUS BX-56+U-HGLGPS 荧光显微镜、OLYMPUS SZX16+LG-PS2 体视显微镜(日本奥林巴斯株式会社); Takara TP800 R-1613 荧光

定量 PCR 仪(Takara 公司); ZEISS AXIO+AxioCam ERc5S 普通光学显微镜(德国 ZEISS 公司); PhenomPure 标准版台式扫描电镜(荷兰 Phenom-World 公司)、Leica TCS SP8 型激光扫描共聚焦显微镜(德国莱卡仪器公司); 新芝 GJ-1000 型高压气体基因枪(宁波新芝科技生物技术有限公司)。

小型仪器设备: FA21204A 型电子分析天平、JA31002 型电子分析天平(上海精天电子仪器有限公司); Mettler-Toledo 酸度计、Mettler-Toledo 电子分析天平、旋转真空泵(浙江黄岩求精真空泵厂); FA2104 型电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); AIRTECH SW-CJ-2FD 型洁净工作台、AIRTECH SW-CJ-2FE 型洁净工作台(苏州净化集团苏州安泰空气技术有限公司); MILLIPORE Direct-Q3 UV 型超纯水系统(美国 Millipore 公司); CS101-3ABN 型电热恒温鼓风干燥箱(重庆市永生实验仪器厂); DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱、DHP-9082 型电热恒温培养箱、DK-8D 型三孔电热恒温水槽(上海齐欣科学仪器有限公司); HHS-2 型电热恒温水浴锅(浙江海宁新华医疗器械厂产品); HIRAYAMAHVETMHV-50 型全自动高温高压蒸汽灭菌锅(日本); AUTOCLAVE GI80T 型全自动高温高压蒸汽灭菌锅(ZEALWAY Instrument INC), 723PC 型可见分光光度计(上海洪纪仪器设备有限公司); Eppendorf Master-cycler personal PCR 仪、Eppendorf 微量移液器、Eppendorf Centrifuge 5804R 冷冻离心机、Eppendorf Milispin 台式离心机、Eppendorf Centrifuge 5417R 冷冻离心机(德国 Eppendorf Research Family); DYY-IOC 型电泳仪和琼脂糖水平电泳槽、DY-11 型电泳仪和琼脂糖水平电泳槽(北京市六一仪器厂); Thermo Forma 705 型-80℃超低温冷冻冰箱、Thermo Forma 900 型-80℃超低温冷冻冰箱(America Thermo Electron Corporation); GXZ 型智能光照培养箱、GXZ 型智能 PGX 型多段光照培养箱、PXZ 型智能 PQX 型多段人工气候箱(宁波东南仪器有限公司); HaierBCD-215TDGA 型冰箱、Haier BCD-186KB 型冰箱、Haier BCD-290W 型冰箱、Haier DW-25L262 型医用低温保藏箱、Haier HYC-1378 型医用低温保藏箱(青岛海尔股份有限公司); TB-718L 型生物组织自动包埋机、TB-718E 型生物组织自动包埋机、TK-218 型恒温摊片烤片机(湖北泰维科技实业有限公司); Royalstar BCD0265CR 型冰箱、IKA IKA® RV10 型旋转蒸发仪(德国 IKA 集团); KQ-100DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器股份有限公司); GYXH-525 型实验室雪花制冰机(厦门国仪科学仪器有限公司); TS-8 型脱色摇床、VORTEX-5 型涡旋仪(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司); DF-1-1S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司); OGP-6 型培养架、塑木通风柜(杭州欧格实验设备有限公司); TH-C 型恒温振荡器、HC1 型全温振荡器、DHZ-DA 型全温振荡器(江苏太仓实验设备厂); ZWY-240 型恒温培养振荡器(上海支撑分析仪器制造有限公司); SHB-III 型予华盾牌循环水真空泵(巩义

市予华仪器有限责任公司); SCIENTZ-48 型高通量组织研磨器、Vilber Quantum-ST4-1000 型凝胶成像系统(法国 VILBER LOURMAT 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 生物信息学分析

本文序列比对使用美国 Lynnon Biosoft 公司开发的 DNAMAN8.0 进行,载体和序列酶切位点结构分析使用 NEBcutter V2.0 在线分析工具(<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>),在使用美国能源部网站 (<http://www.phytozome.com/>) 和美国国立生物技术信息中心 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查找和 BLAST 所需近缘序列后,用 MEGA5.软件完成对序列进行多重比对和系统发生树的构建。

2.2.2 拟南芥实验方法

2.2.2.1 拟南芥的种植和转化方法

拟南芥的种植

(1) 将事先于 4℃ 冰箱低温处理 3 d 的 Col 拟南芥种子装入 1.5 mL 的 EP 管中, 并进行标记;

(2) 加 1 mL 无菌水于三管中,上下颠倒冲洗种子;

(3) 等种子全沉在底部,用移液枪尽量吸干上部无菌水,加 1 mL 75% 酒精于三管中,上下颠倒 30 s;

(4) 等种子全沉于底部,立即用移液枪尽量吸干上部酒精,分别在三管中加 1 mL 的无菌水进行上下颠倒冲洗;

(5) 等种子全沉于底部,用移液枪尽量吸干上部无菌水,并分别在三个管中加入现配的体积分数为 10% 的 NaClO,上下不停颠倒的洗涤 10 min;

(6) 等种子沉于底部,立即用移液枪尽量吸干上清液,用无菌水洗涤五次,并在第五次洗涤后保留无菌水用于种子铺板。

(7) 等种子均匀铺于培养基上,将培养基倾斜吸出多于水分,将平板放置于光照培养箱中, 25±2℃,每隔三天观察并且拍照记录;

(8) 两周之后可转入土壤(4 株/盆)进行土培。

(9) 将腐殖质土、珍珠岩、蛭石按体积比为 6:2:0.5 混合置于营养钵中,用水浇灌至湿透,将培养基中的拟南芥小苗移入营养钵,罩上保鲜膜 3~5 d,放入人工气候箱中,在湿度约为 70~80% 的条件下培养。

拟南芥的转化及阳性苗初级筛选:

(1) 待植物培养至初生花序约 5~15 cm、次生花序刚刚形成花芽状时，去除初生花序。渗透转化处理应在去除初生花序 3~5 d 内完成。并且在渗透转化的前 1 d 植物需充分浇水。

(2) 将制备好的一活菌液转入大瓶，28℃ 过夜培养，第 2 天取出使用时农杆菌液 OD600 值约 1.1-1.2。室温 5000 r/min 离心 15 min，弃上清液，将农杆菌沉淀悬浮于约等体积的 MS 重悬中，使 OD600 在 1.0 左右。

(3) 将植物的地上部分浸入农杆菌悬浮液中侵染数分钟。用保鲜膜将侵染过的植物 (T0 代植物) 罩起来以保持湿度，置入培养室中暗培养约 10h，然后置于正常培养条件，2~3 d 后可去掉保鲜膜，转化后 1 周左右方可浇水，并定期继续侵染 1-2 次，继续培养至植物成熟，收种子 (T1 代植物) 放在干燥环境中 1 周左右，即可筛选转化子。

(4) 将 T1 代种子先用 70% 的酒精浸泡消毒，再用漂白消毒剂溶液处理。消毒后的种子均匀地涂布在筛选培养基表面移至人工培养室中培养。筛选培养基 (MS+ 3% 蔗糖+0.8% 琼脂+ 40 mg/ L Hyg+200 mg/L Cef) 中的 Cef 提供了转基因的选择标记。转基因植株可以在含 Cef 的培养基上正常萌发生长。约 15 d 后移栽入土，准备做进一步的分子水平鉴定。

2.2.2.2 转基因拟南芥的鉴定

- (1) 取一片拟南芥叶片 (或者 10 d 幼苗)，加入 2 mL EP 管当中；加钢珠一颗；
- (2) 加 TPS 提取液 100 μ L；
- (3) 打碎。50 HZ，1 min；
- (4) 低速离心，4000 rpm，将打碎的组织 and 提取液转入新的 1.5 mL 离心管中；
- (5) 加盖，75℃ 15 min；
- (6) 12000 rpm，离心 10 min；
- (7) 取上清，转入新离心管中，加入等体积异丙醇；
- (8) 加盖，手摆剧烈混匀
- (9) 4℃ 低温静置，10 min；12000 rpm，离心 10 min；
- (10) 弃上清，加入 200 μ L 70% 乙醇，剧烈混匀；12000 rpm，离心 10 min；
- (11) 弃乙醇，37℃ 放置烘干；
- (12) 加 50 μ L 水，65℃ 10 min；离心去气泡，之后可用于 PCR 阳性检测。

2.2.2.3 启动子 *ProPtoVNS11*:GUS 在拟南芥上的报告表达

2.2.2.3.1 *ProPtoVNS11*:GUS 表达载体构建

将目的基因启动子连接到 pCXGUS-P 载体上，构建 Promoter-GUS 融合表达载

体,方法参见 2.2.3。

2.2.2.3.2 *ProPtoVNS11:GUS* 转化拟南芥

(1) 种子消毒: 取 1.5 mL 离心管将野生型拟南芥种子置于其中, 4°C, 春化 3d;

(2) 于超净工作台上, 依次用 75%乙醇浸洗种子 30 s, 无菌水冲洗 3 次; 10%的次氯酸钠溶液浸泡消毒 10 min, 无菌水冲洗 4-6 次, 用无菌水浸泡, 将拟南芥种子铺种于 MS 固体培养基上 (MS 培养基用 KOH 调节 pH 值至 5.7-5.8), 在 25°C 光照 16 h, 22°C 黑暗 8 h 的培养条件下生长 14 d;

(3) 将腐殖质土、珍珠岩、蛭石按体积比为 6:3:0.5 混合置于营养钵中, 用水浇灌至湿透, 将培养基中的拟南芥小苗移入营养钵, 罩上保鲜膜 3~5 d, 放入人工气候箱中, 在湿度约为 70~80%的条件下培养。

(4) 约 3 周左右, 拟南芥开始开花, 将初生苔剪去, 约 25 d 左右, 准备侵染次生苔花苞;

(5) 挑取含有 *ProPtoVNS11:GUS* 载体的 EHA105 农杆菌单克隆于 5 mL 附加有 40 mg/L Rif 和 50 mg/L Kan 的液体 YEP 培养基中, 28°C, 200 rpm 培养 16~24 h;

(6) 取 1 mL 上述培养物倒入 200 mL 含同样终浓度 Rif 和 Kan 的液体 YEP 中, 28°C, 150 rpm 培养至 OD₆₀₀=1.0-1.2;

(7) 将菌液置于 50 mL 离心管中, 室温下 5000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 将菌体重悬于转化介质 1/2MS 液体培养基中, 至 OD₆₀₀=1.0-1.2, 浸染前加入表面活性剂 Silwet-L77 (300 μL /L), 混匀, 以提高转化效率;

(8) 将拟南芥上部完全浸入转化介质中, 侵染 5~8 min;

(9) 侵染后用吸水纸吸去多余菌液, 黑色塑料袋覆盖植株, 室温下暗培养 16-24 h 后去掉塑料袋, 浇足营养液, 正常培养;

(10) 正常培养一个月后, 逐渐减少浇水量, 当大部分长角果成熟后, 停止浇水;

(11) 收获种子, 即 T₀ 代种子;

2.2.2.3.3 转基因拟南芥筛选及鉴定

将 T₀ 代种子按 2.2.2.3.2 中方法消毒后播种于含有 50 μg/L 潮霉素 (Hyg) 的 MS 固体培养基上进行筛选, 将筛选出的 T₁ 代抗性苗移入营养钵中正常培养, 约 2 周后提取其叶片总 DNA 进行分子鉴定, 参见方法 2.2.2.2。

2.2.2.4 GUS 表达特异性显色观察

参照 Jefferson 的方法进行 GUS 组织化学分析^[128]，预先配制 200 mL 的 GUS 染液，其中 EDTA.Na₂ 终浓度为 10 mM，NaH₂PO₄.H₂O 为 100 mM，K₄FE(CN)₆.3H₂O 为 0.5 mM，Triton X-100 为 0.1%，X-gluc 0.5 mg/L，总 pH 值为 7.0。

将各试验材料放入 2 mL 离心管，加入 GUS 染液使其覆盖材料，用锡箔纸密封使其避光；随后将离心管置于 37℃ 的恒温培养箱中反应 2~6 h，之后将染色液回收并于 4℃ 避光保存；最后，对各试验材料进行 70% 的乙醇脱色处理并使用数码相机拍照。

2.2.2.5 拟南芥 *snd1nst1* 双突变体构建

2.2.2.5.1 拟南芥突变体种植及杂交方法

按照 2.2.2.1 方法种植拟南芥突变体，等拟南芥初生苔长约 20 cm 时，拟南芥 *snd1* 纯合单突变体(父本)和拟南芥 *nst1* 纯合单突变体(母本)进行人工杂交。

选取检测过的纯合单突变体植株，待亲本植株开花后，用镊子将多余的花蕾移除，一般只保留花蕾 5、6 个。将杂交母本的花蕾固定在解剖镜视野中央，用解剖纸轻轻压住花蕾，用镊子除去母本的未开花的全部萼片，花瓣和雄蕊。第二天上午 10:00 左右从杂交父本上用镊子摘取花药，涂抹在柱头上，授以母本花粉，做好标记，套袋。通常柱头授粉 10 h 之后柱头开始萎蔫。3 天之后种荚即伸长，据此判断杂交成功与否(杂交成功后，将母本植株的其他花蕾除去)。然后，每隔一周浇水一次保持其正常后期生长，直至种子完全发育成熟。约一个月左右收获 F1 代种子。

2.2.2.5.2 拟南芥纯合双突变体植株的筛选

种植收获的 F1 代和 F2 代种子，均用 CTAB 法提取拟南芥总 DNA，根据“三引物法”^[129]验证单突变体的引物及其反应体系的方法验证 F1 代和 F2 代的基因型。对 *snd1* 基因，通过两对引物扩增的不同 PCR，分别称为 PCR₁ 和 PCR₂；对 *nst1* 基因，通过另外两对引物扩增 PCR，分别称为 PCR₃ 和 PCR₄。对于 F1 植株的进行检测，以确定 F1 代中的杂合子。PCR₁ 的引物为 *snd1* 基因的 LP (5'-TAGTACGCACTAGAGCCT-3') 和 RP (5'-ACACGGATTATGATGACC-3')，PCR₂ 的引物为 *snd1* 的基因 RP (5'-ACACGGATTATGATGACC-3') 和 LBb1 (5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAA-3')，对 T-DNA 插入片段进行扩增。PCR₃ 的引物为 *nst1* 基因的 LP (5'-TCGAGGCTTGGGACATTCAA-3') 和 RP (5'-CATGTGCGTCTGTATATGAC-3')，PCR₄ 的引物为 *nst1* 基因的 RP (5'-CATGTGCGTCTGTATATGAC-3') 和 LBb1 (5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAA-3')，

对 T-DNA 插入片段进行扩增。在对 F2 代双突变体鉴定时,要加入 *Actin* 内参基因进一步确定植株基因型,即把 *Actin* 基因 LP (5'-ACTACCGCAGAACGGGAAAT-3')和 RP (5'-CATCTGTTGGAAGGTG CTGA-3') 扩增的体系称为 PCR₅。对于 *snd1* 基因的某一突变体植株,当 PCR₁、PCR₂ 同时扩增出来时,该植株为杂合体;当 PCR₁ 扩增出,而 PCR₂ 未扩增出时,该植株为野生型植株;当 PCR₁ 未扩增出,而 PCR₂ 扩增出时,该植株为纯合子。对于 *nst1* 基因的某一突变体植株,当 PCR₃ 和 PCR₄ 同时扩增出来时,该植株为杂合体;当 PCR₃ 扩增出,而 PCR₄ 未扩增出时,该植株为野生型植株;当 PCR₃ 未扩增出,而 PCR₄ 扩增出时,该植株为纯合子。PCR₁ 和 PCR₂ 的扩增产物长分别为 792 bp 和 601 bp, PCR₃ 和 PCR₄ 的扩增产物分别为 910 bp 和 879 bp。为了减少验证过程中假阳性植株的出现,每次做 PCR 时均用野生型植株做阴性对照,在进行双突变体鉴定时,用内参基因做阳性对照。PCR 结束后,取 5 μ l 1% 琼脂糖凝胶电泳后于紫外光下观察结果,并且对照分析实验结果。

2.2.2.6 *PtoVNS11* 基因在突变体中进行回复表达

参考 2.2.2.1 方法。

2.2.3 杨树实验方法

2.2.3.1 杨树多组织 cDNA 的获得

2.2.3.1.1 杨树总 RNA 的抽提及检测

(1) 取毛白杨芽尖、根、茎、幼叶、老叶、叶柄、粗分离的木质部、韧皮部组织各约 0.08 g~0.1 g, 于预冷的研钵中加液氮, 并以研棒充分粉碎组织;

(2) 转移粉末至预先加有 1 mL Trizol 的 1.5 mL 离心管 (RNase-free); 室温放置 5 min;

(4) 加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈混匀 15 sec; 室温放置 2-3 min;

(6) 12000 g, 4°C, 15 min; 取上清 (500-700 μ L), 移入新的 1.5 mL 离心管;

(7) 加入 0.5 mL 100% 异丙醇, 手摇混匀; 室温放置 10 min;

(8) 12000 g, 4°C, 10 min; 去上清, 用 1 mL 75% 乙醇手弹悬浮沉淀几次;

(10) 7500 g, 4°C, 5 min。弃上清; 室温干燥 5~10 min, 至管底沉淀呈半透明; 后溶于 50 μ L RNase H₂O。

(13) 检测 RNA 质量: ①做琼脂糖凝胶电泳, 以 EB 染色, 照胶, 看带型; ②取 1 μ L 稀释 100 倍, 在紫外分光光度计下检测质量好坏。检测标准: A260/A230 值为大于 2.0, A260/A280 值为介于 1.8-2.0 之间;

2.2.3.1.2 总 RNA 去除全基因组 DNA 反应

基因组 DNA 消化反应：按如下加入所需样品或试剂

试剂编号	试剂	加入量/ μL
2	5 \times gDNA Eraser Buffer	2.0
1	gDNA Eraser	1.0
6	RNase Free dH ₂ O	6
*	提取的 RNA	1.0
总体系		10 μL

反应条件：42 $^{\circ}\text{C}$ ，2 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存

2.2.3.1.3 RNA 反转录

如表如下所示加入所需试剂或样品。

反应条件：37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min；85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s；4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

试剂编号	试剂	加入量/ μL
*	上一步反应的 10 μL 体系	10.0
4	5 \times PrimeScript Buffer 2	4.0
5	RT Primer Mix	1.0
3	PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0
6	RNase Free dH ₂ O	4.0
总体系		20 μL

2.2.3.2 杨树总 DNA 的抽提和质量检测

2.2.3.2.1 毛白杨总 DNA 的抽提

(1) 取 10 mL 离心管一支，加入 3.0 mL CTAB 和 90 μL β -巯基乙醇，65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅预热；

(2) 取约 0.6 g 的毛白杨新鲜叶片，于液氮中磨成粉末，转入上述 CTAB 抽提液中，涡旋混匀；

(3) 于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 45 min，中途间隔（剧烈）振荡三次混匀；

(4) 室温静置 5 min 后加入等体积氯仿：异戊醇（24：1），剧烈颠倒混匀后

平放乳化 10 min; 18°C, 10000 r/min, 离心 10 min;

(5) 吸取上清于另一干净的 10 mL 离心管中, 加入等体积氯仿: 异戊醇 (24:1), 剧烈颠倒混匀后平放乳化 10 min。18°C, 10000 r/min, 离心 10 min;

(6) 吸取上清于另一 10 mL 离心管中, 加入等体积-20°C 预冷的异丙醇, 颠倒混匀能见白色絮状沉淀, 量少可短暂离心;

(7) 钝口枪头吸出絮状沉淀, 用 500 μ L 75% (V/V) 乙醇漂洗两次, 500 μ L 无水乙醇再漂洗一次, 吸干乙醇。沉淀于 37°C 恒温箱中干燥至透明;

(8) 用 50 μ L 无菌水溶解沉淀, 得毛白杨基因组 DNA 粗提物;

(9) 向 DNA 粗提物中加入约 1 μ L RNase, 于 37 °C 酶解 RNA 1 h。

2.2.3.2.2 毛白杨总 DNA 的纯化

(1) 取经 RNase 酶解过后的 DNA, 加入等体积氯仿:异戊醇(24:1 v/v)抽提;

(2) 室温, 10000 rpm, 离心 10 min;

(3) 重复步骤 1、2;

(4) 吸取上清, 加入 2.5 倍体积预冷无水乙醇, 轻轻混匀, 可见无色透明啫喱状沉淀;

(5) -20°C 沉淀 30 min;

(6) 4°C, 10000 rpm, 离心 10 min;

(7) 75% 乙醇洗两遍;

(8) 37°C 干燥至半透明;

(9) 加 100 μ L ddH₂O 溶解;

(10) 取 1 μ L DNA 样品电泳检测, 其余-20°C 保存备用。

2.2.3.3 *PtoVNS11* 组织表达差异性检测

2.2.3.3.1 半定量检测

取-20°C 冰箱中保存的杨树各组织 RNA, 利用管家基因 18SrRNA 为内参, 调整各样品 RNA 浓度, 采用 2 步法 RT-PCR 研究 *PtoVNS11* 在杨树不同组织中的表达情况。RT-PCR 的程序是 94°C 3 min, 26 个循环(94°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 40 sec)。10 μ L 反应产物在含 EB 的 1% 的凝胶上电泳检测。

2.2.3.3.2 相对荧光定量检测

以杨树各组织中的 cDNA 为模板, 按照 SYBR Premix Ex Taq™ II 操作说明进行实时定量 PCR, 确定相关基因的相对表达量。

样品反应体系如下所示:

SYBR Premix ExTaq™ II(2×)	12.5 μL
10μmol/L F-primer	0.5 μL
10μmol/L R-primer	0.5 μL
cDNA	1.0 μL
ddH ₂ O	10.5 μL
总体积	25 μL

反应条件: 95℃, 30 sec; (95℃, 5 sec; 60℃ 30 sec) 40 个循环, 计算方法采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[130]。

2.2.3.4 Pro_{35S}:PtoVNS11 植物表达载体构建

2.2.3.4.1 目的片段扩增

根据杨树基因组测序结果 (<http://energy.gov/genome.jgi-psf.org/poplar>) 设计特异性引物, 按如下反应进行扩增:

5×PrimeSTAR Buffer(Mg ²⁺ Plus)	10 μL
dNTP Mixture(each 2.5 mM)	4 μL
F-Primer(10 μM)	1 μL
R-Primer(10 μM)	1 μL
模板 DNA	1 μL
PrimeSTAR® HS Polymerase(2.5 U/μL)	0.5 μL
ddH ₂ O	32.5 μL
Total	50 μL

反应条件: 94℃预变性 3 min→32 个扩增循环(94℃变性 30 s→56℃退火 30 s→72℃延伸 1 min)→72℃后延伸 10 min, 取 5 μL PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳后于紫外光下观察结果, 切胶回收目的片段。

2.2.3.4.2 植物表达载体骨架制备

pCXSN 载体酶切体系如下所示:

10×K	5 μ L
BSA	14 μ L
<i>Xcm</i> I	1 μ L
pCXS _N	30 μ L
总体积	50 μ L

于 37°C 水浴锅 2~3 h, 电泳检测酶切片段, 并切胶回收骨架片段。

2.2.3.4.3 目的片段和骨架载体的回收、连接

试验中所有目的片段和骨架载体的回收纯化均按照爱思进生物技术(杭州)有限公司生产的 AXYG_{EN} 胶回收试剂盒的使用说明操作(www.axxygenbio.com);

连接反应:

目的片段和载体骨架的连接选用 TaKaRa 公司的连接试剂盒 Solution I。反应体系如下所示:

Solution I	5 μ L
pCXS _N 骨架	1 μ L
胶回收产物加“A”片段	4 μ L
反应体积	10 μ L

于 PCR 仪中 16°C, 过夜, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 涂板并提取质粒。

2.2.3.4.4 CaCl₂ 法制备大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞

(1) 从划线平板上挑取大肠杆菌单菌落接种于 10 mL LB 液体培养基中, 恒温摇床 37°C, 200 rpm 振荡培养过夜, 培养至对数生长期;

(2) 将 1 mL 过夜培养的菌液移入 50 mL LB 液体培养基(1:50 的比例)中进行二活, 37°C 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.3~0.5, 置于冰上 30 min;

(3) 取 10 mL 二活菌液转入 15 mL 无菌离心管中, 4°C, 4100 rpm 离心 10 min, 弃上清;

(4) 经 10 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂-MgCl₂ 溶液重悬, 用枪头轻轻吹打混匀, 于冰上放置 30 min,

(5) 4°C, 4100 rpm, 离心 10 min, 弃上清至痕量培养液流尽;

(6) 加入 400 μ L 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 轻轻吹打重悬菌体, 混匀, 冰上放置 12~24 h 之内, 用于转化或每管分装 100 μ L;

(7) 液氮速冻后-70℃保存。

2.2.3.4.5 重组质粒转化大肠杆菌感受态细胞

(1) 向上述分装好感受态细胞的 EP 管中加入 10-100 ng 待转化 DNA (不超过 10 μL)，轻轻混匀后放置冰上 30 min。

(2) 将上述混合物转移到 42℃ 预热的水浴锅中，热休克 90 s (不要摇动试管)；

(3) 冰浴冷却 1 min；

(3) 向管内加入 800 μL 的无附加抗生素的 LB 培养液，然后 37 °C，200 rpm，震荡培养 60~90 min；

(4) 取适量约 200 μL 体积的菌液涂布到含有 Kan 抗生素的 LB 固体平板上，于超净工作台上正面放置几分钟，待菌液被培养基表面吸干；

(5) 倒置平板于 37℃ 培养 12—16 h。

2.2.3.4.6 单克隆菌落的 PCR 检测

挑选转化平板上的单菌落进行编号 (1~10)，按顺序点取编号单菌落作为扩增 cDNA 模版，基因回收目的片段作为阳性对照，水为阴性对照进行 PCR 检测阳性克隆。PCR 检测反应加样体系为：

PCR 反应体系同目的片段扩增体系(参见下表)，取阳性菌落，37℃，200 rpm，扩大培养过夜。

10×PCR buffer BSA	2.5 μL
25 mmol/L MgCl_2	1.5 μL
10 mmol/L dNTP	0.5 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ F-primer	0.5 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ R-primer	0.5 μL
Sample cDNA	单菌落
rTaq DNA polymerase	0.25 μL
ddH ₂ O	19.25 μL
总体积	50 μL

2.2.3.4.7 质粒提取 (SDS 碱裂解法)

(1) 取活化菌液于 1.5 mL EP 管中，最大转速离心 1 min。重复取菌 2 次。

(2) 加 200 μL 预冷的 Soution I，立即涡旋或枪头吹打混匀。

- (3) 加 400 μL 预冷的 Soution II (室温), 上下颠倒 3~5 次混匀 (动作一定要轻柔), 静置 2 min。
- (4) 加 300 μL 预冷的 Soution III, 上下颠倒 5~6 次混匀至出现絮状沉淀, 12000 rpm, 离心 10 min。
- (5) 取上清 800 μL 于另一新的 1.5 mL EP 管中, 弃沉淀。
- (6) 加入 400ul (1/2 体积) 氯仿, 剧烈震荡至乳白色。12000 rpm, 离心 1 min。
- (7) 取上清约 600 μL 放于另一新的 1.5 mL EP 管中, 加等体积 (600 μL) 异丙醇, 上下颠倒混匀, 12000 rpm, 离心 10 min。
- (8) 75%乙醇漂洗, 弃上清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 风干。
- (9) 加 50ul TE 或 ddH₂O 溶液, 混匀加 1 μL RNase, 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h。
- (10) 电泳检测。

2.2.3.4.8 测序反应

测序工作由上海英骏 (Invitrogen) 生物工程有限公司 (中国) 协作完成。

2.2.3.5 杨树中过表达 *Pro35S::PtoVNS11*

2.2.3.5.1 重组质粒的农杆菌转化

2.2.3.5.1.1 农杆菌感受态细胞的制备

操作步骤如下:

1) 取-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的根癌农杆菌 EHA105 于含 40 mg/L Rif + 50 mg/L Kan 的 YEP 固体培养基上平板划线, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2-3 天, 可见单菌落长出;

2) 一活: 挑取单菌落于 5 mL YEP 液体培养基中, 180 rpm, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 16-24 h;

3) 二活: 取 2 mL 一活菌液接种于 100 mL YEP 液体培养基, 180 rpm, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 OD₆₀₀≈0.3~0.5;

4) 取 50 mL 菌液转入预冷的无菌离心管, 冰浴 30 min, 5000 rpm, 离心 5 min, 去上清液;

5) 加入 2 mL 预冷的含 15% 甘油的 20 μM CaCl₂ 溶液, 轻轻悬浮均匀;

6) 农杆菌悬浮液分装于无菌 Ep 管中, 每管 200 μL 冻存于-70 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

2.2.3.5.1.2 农杆菌感受态细胞的转化 (冻融法)

操作步骤如下:

1) 取按文中手提质粒方法获得的重组质粒约 10 μL ，加入含 200 μL 的农杆菌感受态细胞的无菌 EP 管中，轻轻混匀；

2) 冰浴 5 min；

3) 液氮速冻 2 min；迅速移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min；加入 800 μL YEP 液体培养基 (+Rif)，轻轻混匀；

4) 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ ，180 rpm，振荡培养 4~5 h；室温 4000 rpm，离心 10 min，去上清，余下 200 μL 菌液重悬菌体混匀；

4) 分别将 200 μL 重悬活化菌液均匀涂布到 YEP+ 40 mg/L Rif + 50 mg/L Kan 固体培养基上；

5) 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中倒置培养 2~3 d，待长出单菌落后挑选单菌落，进行目的基因和抗性标记基因潮霉素 (*Hyg*) 的 PCR 检测。

重组质粒经测序验证后，各选取 2-3 个阳性单克隆以 YEP+ Rif (40 mg/L) + Km (50 mg/L) 液体培养基扩大培养，待达到一定浓度后 (OD₆₀₀~0.8)，取 1 mL 农杆菌菌液于 1.5 mL 的无菌 EP 管中，再加 15%~20% 菌液体积的无菌甘油，涡旋混匀后液氮速冻 2~5 min，保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ ，用于后续遗传转化。

2.2.3.5.2 叶盘法转化毛白杨

以野生型毛白杨的叶片为外植体，采用根癌农杆菌介导的方法转化^[131]。

(1) 根癌农杆菌的培养

将 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存的含有目的基因重组载体的农杆菌菌株 EHA105 接种到 YEP 固体培养基 (含 50 mg/L Kan + 40 mg/L Rif) 上，28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h，挑取单菌落接种到 25 mL 含有 50 mg/L Kan、40 mg/L Rif 的 YEP 液体培养基中，28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床上培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8，再按体积比 1:100 的比例转到新鲜的 YEP 培养基中，在相同条件下培养 6 h，OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8 时离心收集，用添加乙酰丁香酮 (100 $\mu\text{mol/L}$ Acetosyringone, AS) 的 WPM 液体培养基重悬后即可用于转化。

(2) 农杆菌侵染

选取无菌苗幼嫩的叶片，在无菌条件下，将其切成 0.5 \times 0.5 cm^2 的小块，将其放入重悬好的菌液中浸染 10~15 min，且浸泡过程中缓慢的摇晃。

(3) 共培养

取出浸染过的材料放在无菌的滤纸上吸干菌液，将叶片平铺在固体培养基上，25 $^{\circ}\text{C}$ \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ ，暗培养 2 d。

(4) 选择培养

将经过共培养的外植体转移到愈伤诱导培养基上，在 25℃、光照为 2000~10000 Lux 条件下选择培养 2~3 周 (w)，其间每 10 d 更换一次培养基。

(5) 诱导芽培养

待叶片周围出现白色愈伤，将其切下并转移至诱导芽培养基上，在 25℃、光照为 3000 Lux 条件下进行诱导芽培养，时间约为 4~5 周，其间每 10 d 更换一次培养基。

(6) 生根培养

当不定芽长至约 2 cm 时，切下并转入生根培养基中，10 d 左右即生根。

(7) 转基因毛白杨的移栽

待生根幼苗长至 8 cm 时取出幼苗，洗净根部琼脂，移栽至温室土壤中培养。

2.2.3.5.3 转基因毛白杨的筛选

用 CTAB 方法提取抗性植株的全基因组 DNA，以 PCR 的方法^[132]扩增潮霉素抗性标记基因 *Hyg* 片段，筛选出阳性植株。

2.2.3.6 转基因毛白杨切片与间苯三酚染色观察

2.2.3.6.1 转基因植株新鲜材料徒手切片

取野生型及转基因植株的叶柄、叶脉以及茎，徒手切片，选取较薄的材料于载玻片上，滴加浓盐酸解离材料 1 min，再滴加间苯三酚溶液染色，1~2 min 之后即可在解剖镜下观察。

2.2.3.6.2 转基因植物石蜡包埋与切片

我们以毛白杨茎组织切片为例，介绍本论文中所使用的石蜡包埋技术，具体实验方法与步骤如下：

1、包埋

(1) 组织固定：取第3到第5节间的新鲜毛白杨茎，以锋利的刀片切至0.5-1 cm 大小，放入含有 FAA 固定液的小瓶中。将小瓶放入真空干燥器中进行抽真空，直至材料沉入固定液底部，以达到快速彻底的固定。换取新鲜的固定液，常温条件下过夜；

(2) 组织脱水：将材料中固定液分别换成梯度为 70%、85%、95% 以及无水乙醇进行脱水，每次脱水时间为 1 h (根据材料的成熟程度可将时间延长至 1-3 h)，等待期间将材料放在水平摇床中轻轻摇晃；最后，重复使用无杂的无水乙醇脱水 1 h；

(3) 透明：①,二甲苯：乙醇=1:3 (v/v 下同)，1 h；②,二甲苯：乙醇=1: 1，

1 h; ③, 二甲苯: 乙醇=3:1, 1 h; ④, 100%二甲苯, 1 h; 每换好一步试剂均需在小摇床上轻摇;

(4) 重复透明 100% 二甲苯 1 h;

(5) 浸蜡①二甲苯: 软石蜡 (54°C-56°C) =1:1 (v/v 下同), 56°C条件下恒温浸蜡 2~4 h; ②二甲苯: 软石蜡=1:4, 56°C条件下恒温浸蜡 2~4 h; ③软石蜡, 56°C条件下恒温浸蜡 4~8 h; ④软石蜡: 硬石蜡=1:1 (v/v), 60°C恒温条件下浸蜡 4~8 h, ⑤硬石蜡, 60°C恒温条件下浸蜡 48 h 以上。期间每隔 6~12 h 更换一次新鲜石蜡;

(6) 3-5d 后即可完成组织浸蜡的过程。之后用包埋盒将植物茎组织包埋成型。

(7) 保存: 最后包有材料包埋盒可置于 4°C 保存数月。

2、切片

包埋盒置于切片机上,用刀片将组织切成 8-10 μm 厚的材料,将载玻片事先用无水乙醇浸泡,擦净,置于设置温度为 38°C~40°C 的烘片机上预热;用毛笔将切出的连续蜡带漂浮在已滴加蒸馏水的玻片中 (含 1 mL 乙醇/100 mLH₂O), 放在烘片机上进行烘片。待蜡片充分展平后,可用普通显微镜观察已获得的组织切片,以寻找理想的切片材料。(获得的理想的组织切片,放入切片盒中,可置于室温保存数月。)

2.2.3.6.3 细胞壁木质素化学成分染色

对毛白杨茎组织进行化学成分染色前,需将已获得的石蜡切片进行脱蜡和复水,以达到能够观察到完整细胞形态,方便染色的目的。脱蜡与复水的过程需要在通风橱中进行。具体的步骤如下:

(1) 脱蜡将切片置于加入 100%二甲苯的染色玻璃缸中脱蜡 10~20 min, 此步骤重复 2 次;二甲苯:乙醇=3:1 (v/v);二甲苯:乙醇=1:1 (v/v);无水乙醇 2 min;

(2) 再次将切片置于加入 100%无水乙醇的洗脱玻璃缸中复水 2 min;

(3) 95%乙醇复水 1 min;

(4) 90%乙醇复水 1 min;

(5) 80%乙醇复水 1 min;

(6) 60%乙醇复水 1 min;

(7) 30%乙醇复水 1 min;

(8) 纯水复水 1 min;

对杨树木材化学成分的染色,不同染色剂的配方与染色时间如下:

(1) 间苯三酚配方 1(幼嫩材料): 间苯三酚粉末 25 mg、100%甲醇 25 mL、37%冰醋酸 25 mL;

(2) 间苯三酚配方 2(较成熟材料): 先配置一个用乙醇溶解的 5%的间苯三酚溶液,然后与浓盐酸、水(v/v/v=1:1:1)混合使用;

(3) 甲苯胺蓝配方: 称取 0.5 g 甲苯胺蓝粉末, 用 100 mL 蒸馏水溶解, 甲苯胺蓝染木质素的时间为 2 min。

2.2.3.6.4 光学显微镜观察

本实验室所使用的光学显微镜型号为 OLYMPUS BX53 (光源设备 U-HGLGPS, 镜头 DP73, TOKYO, JAPAN), 具体使用步骤如下:

(1) 打开通光电源, 转动物镜转换器, 使低倍物镜对准通光孔, 双眼注视物镜内, 转动反光镜调节亮度, 至视野亮白;

(2) 将所要观察的材料平整放在用无水乙醇清洗过的载玻片上, 之后在材料四周滴取少量清水, 盖上盖玻片, 这一过程切不可用力过猛损坏材料, 同时也要保证载玻片与盖玻片之间没有气泡, 且材料、载玻片、盖玻片接触紧密。之后将材料放在载物台上, 用标本夹夹好载玻片;

(3) 将物镜转化器调转至低倍物镜, 转动粗调焦距螺旋, 使物镜靠近载玻片, 同时双眼注视目镜, 细微转动细调焦距螺旋, 直至物像清晰;

(4) 打开与显微镜连接的电脑中的相应软件, 选择与物镜相同倍数的拍照参数, 添加比例尺后拍照保存;

(5) 观察结束后将显微镜物镜转换器转动至归位, 关闭电源。

2.2.4 PtoVNS11:GFP 融合蛋白在洋葱表皮细胞上的亚细胞定位

2.2.4.1 亚细胞定位载体构建

(1) 目的基因的引物设计

根据毛白杨扩增所得的 *PtoVNS11* 基因的 CDS 序列测序结果设计特异性引物, 引物序列见后面附件。

(2) 目的基因的扩增与回收及加 “A” 与连接

1) 扩增体系总体积 25 μ L

Premix star	12.5 μ L
dd H ₂ O	10.5 μ L
cDNA	1.0 μ L
primer F	0.5 μ L
primer R	0.5 μ L
Total volume	25.0 μ L

PCR 的条件为 94℃ 预变性 3 min → 34 个扩增循环 (94℃ 变性 30 s → 56℃ 退火 30 s → 72℃ 延伸 1 min) → 72℃ 后延伸 10 min, PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳后于紫外光下观察结果, 并且回收目的片段, 马上进行下步实验。

2) 加 “A” 体系, 总体积共 10μL

胶回收目的片段	7.6 μL
MgCl ₂	0.6 μL
10×PCR buffer	1.0 μL
TaqDNA 聚合酶	0.3 μL
dNTP	0.5 μL
Total volume	10.0 μL

反应程序为 72℃ 50 min → 4℃ 1 min, 胶回收加 “A” 产物。

3) 连接载体骨架 PCX-DG, 该载体骨架自带 GFP 报告基因, 连接体系总体积 10ul

Solution I	5.0 μL
pCX-DG 骨架	1.0 μL
胶回收产物加 “A” 片段	4.0 μL
Total volume	10.0 μL

于 PCR 仪中 16℃, 过夜, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 涂板并提取质粒。

2.2.4.2 基因枪轰击洋葱表皮细胞

2.2.4.2.1 打基因枪前的钨粉处理

- (1) 取 60 mg 钨粉装入 1.5 mL 的离心管中, 加入 1 mL 70% 的酒精, 涡旋混匀 3~5 min。
- (2) 室温静置 15 min。
- (3) 常温微离心 5 s, 弃上清。
- (4) 加无菌水 1 mL, 振荡 1 min。
- (5) 室温静置 1 min。
- (6) 离心 5 s, 弃上清。
- (7) 重复 4~6 步骤 3 次。
- (8) 加入灭菌的 50% 甘油 1 mL, 使其终浓度达到 60 mg/mL。

(9) -20°C 冻存2周之内可用。

2.2.4.2.2 钨粉子弹的包被

- (1) 用新开封的无水乙醇悬浮适量的钨粉颗粒 (50 mg/mL) ;
- (2) 超声处理 10 min;
- (3) 13,000 g, 10~20 sec;
- (4) 以无水乙醇清洗 2 次 (多步清洗对子弹分散很重要), 间隔期间快速离心收集 (同上);
- (5) 再加适量无水乙醇, 剧烈涡旋震荡 20 min, 分装为 20 μL /管;
- (6) 以无菌水清洗钨粉 3 次, 其间短暂离心收集, 弃上清,后补足至 20 μL ;
- (7) 边涡旋震荡, 边依次加入如下成分 (每加样一次, 停顿震荡 30 sec, 后再继续进行)

钨粉	20.0 μL
DNA	2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
2.5M CaCl_2	20.0 μL
0.1M 亚精胺	8.0 μL
Total volume	50.0 μL

- (8) 冰浴 20 min, 间或涡旋。8000 r, 1 min, 弃上清;
- (9) 加 80 μL 无水乙醇, 涡旋震荡, 13000 r, 20 sec, 弃上清;
- (10) 加 30ul 无水乙醇, 涡旋 5 sec。继续加无水乙醇至 200 μL , 13000 r, 20 sec;
- (11) 重复步骤 10, 共 3~4 次清洗;
- (12) 加 40 μL 无水乙醇重悬, 涡旋振荡数秒;
- (13) 吸取 8~10 μL 重悬液至飞行膜中, 涂抹均匀;
- (14) 为防止静置过程中子弹吸潮结块, 将飞行膜放至事先铺好一层 CaSO_4 粉末(勿用无水氯化钙替代)的培养皿中, 中间由一张滤纸相隔;
- (15) 将载有飞行膜的平皿放在无菌操作台上, 打开鼓风, 静置至酒精彻底挥发, 备用。

2.2.4.2.3 洋葱表皮细胞的预处理

撕取新鲜洋葱鳞茎的第 2 或第 3 层鳞片叶内表皮细胞, 大小约为 $1.5\text{ cm}\times 1.5\text{ cm}$, 将近轴面的一面朝下伏贴于 $1/2\text{MS}+30\text{ g/L}$ 蔗糖+7 g/L 琼脂培养基中预培养 6~8 h 后备下一步使用。

2.2.4.2.4 基因枪轰击洋葱表皮细胞

具体操作如下:

- (1) 先用70%乙醇对基因枪表面及样品室进行消毒。同时,用70%乙醇将阻挡网和可破裂膜,微弹载体及其固定器、固定工具浸泡15 min后,放在超净台上晾干。可裂膜片、固定盖、微弹载体发射装置可用70%乙醇进行表面灭菌,吹干。
- (2) 将微粒载片嵌入固定环中,取DNA及金粉的混合物加于微粒载片中心,干燥1.0 min左右。
- (3) 安装可裂膜于其托座上,顺时针拧到气体加速器上。
- (4) 将空间环、阻挡网、阻挡网托座、微粒载片及固定环(带有微粒的面朝下)安装好,旋紧盖子,插入枪中。
- (5) 把样品放在轰击室中,关好门。
- (6) 打开氦气瓶的总阀,顺时针转氦气调节阀,使氦压表指针的示数高于可裂膜压力4.5 MPa。
- (7) 打开基因枪及变压器开关。
- (8) 按动真空键,待真空度至26~28英寸汞柱(=88.05~94.82 kPa)时,迅速按下Hold键,接着按住发射键,并保持不动,直到击发为止。
- (9) 按通气键待真空表归零后,取出样品。
- (10) 关机:把氦气瓶的总开关旋紧,打一次空枪,把氦压表指针归零后,再逆时针旋转氦压表调节阀;关闭基因枪的总开关及变压器开关。
- (11) 轰击的洋葱表皮于22~25℃条件,在1/2 MS+15 g/L蔗糖培养基中暗培养16~24 h。

2.2.4.2.5转基因的洋葱表皮的短期培养及观察

- (1)取出经过培养后的洋葱表皮,用PH7.0的PBS溶液浸洗3次,放入DAPI溶液(1 mg/L)浸泡10 min,再以PBS溶液浸洗3次,制作临时装片。
- (2)激光共聚焦显微镜采图,保存。

2.2.4.3 激光共聚焦显微镜观察

本实验所使用的激光共聚焦显微镜型号为Leica TCS SP8,可对活细胞进行无损伤的实时观察分析,能对活细胞、组织进行形态和功能相结合的研究。对亚细胞定位观察与分析的步骤为:

- (1) 打开激光共聚焦显微镜及与该显微镜连接的电脑电源,预热20 min;
- (2) 调节激光共聚焦显微镜参数,使得物镜与目镜形成通路;
- (3) 将所要观察的材料平整放在干净的载玻片上,材料四周滴取少量清水,盖上盖玻片,轻压使载玻片、盖玻片、材料紧密接触;

(4) 将上述材料放在载物台上，用标本夹夹好

(5) 打开紫外光激发电源，先用低倍镜观察，调节粗调焦距螺旋，使得物镜靠近载波片，双眼注视目镜，细微调节细调焦距螺旋，直到物像清晰。

(6) 打开与激光共聚焦显微镜连接的电脑中的软件，添加通道，调节各级参数，添加比例尺后拍照保存。

(7) 观察结束后，先将物镜转换器转动归位，关闭各级电源。

2.2.5 酵母单杂交

2.2.5.1 酵母单杂交表达载体构建

(1) 扩增目的片段

通常用酵母单杂交的方法验证基因的转录激活活性。本酵母单杂交系统所用的质粒 pGBKT7 有 BD (DNA 结合结构域) 结构域，将目的基因融合在 BD 结构域之后，如果目的基因有转录激活活性则会启动下游报告基因的表达。结合 pGBKT7 载体的融合位点以及本实验所分析目的基因 *PtoVNS11* 的 CDS 序列，分别设计加了不同酶切位点 (*EcoRI* 和 *BamHI*) 的引物序列，以 pCXS_N-*PtoVNS11* 质粒为模板，用高保真酶 PrimSTAR 进行 PCR 扩增，扩增条件同上。胶回收目的片段。

(2) 酶切、连接反应

用 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切胶回收目的片段及载体，胶回收载体骨架和裸露粘性末端的目的片段。将酶切之后回收到的 pGBKT7 载体骨架以及 *PtoVNS11* 的扩增片段，16°C 过夜连接。

(3) 重组质粒的亚克隆

将连接产物分别转化大肠杆菌 DH5 α ，待单菌落长出之后经过菌检、酶切、测序等一系列实验之后确定正确的重组质粒，分别提取正确的重组质粒（提取方法见 2.2.3.4.7）用于酵母感受态的转化。

2.2.5.2 酵母单杂交转化

2.2.5.2.1 酵母感受态细胞的制备

(1) 挑取 3~6 个直径为 2~3 mm 的酵母 AH109 单菌落于 1.5 mL 离心管中（内含 1 mL YPDA 液体培养基），涡旋混匀；

(2) 将此 1 mL 菌液移入内有 50 mL YPDA 液体培养基的无菌三角瓶中，30°C，250 rpm 振荡培养 16-18 h，直至 OD₆₀₀ ≥ 1.5；

(3) 将此 50 mL 菌液取适量倒入 300 mL YPDA 培养基中，使 OD₆₀₀ = 0.2-0.3，

30°C, 230-270 rpm 继续振荡培养约 3 h, 使 OD600 约为 0.4~0.6 左右;

(4) 将菌液转入离心管, 5000 rpm 室温下离心 5-8 min, 弃上清, 收集菌体;

(5) 用新鲜配制的 1.5 mL 无菌 1×TE/LiAc 重悬菌体, 每管分装 100 μL, 即为可用感受态细胞。

2.2.5.2.2 热激法转化酵母感受态细胞

(1) 用沸水煮鲑鱼精 DNA (20 μg/μL) 20 min, 于冰上放置 10 min;

(2) 取 10 μL 鲑鱼精 DNA 及 5 μL 重组质粒 pGBKT7- ptoVNS11, 加入到 100 μL 酵母感受态细胞中, 充分混匀, 另设 pGBKT7 空载体作为对照;

(3) 向每个离心管中加入 600 μL 1×PEG/LiAc, 涡旋, 充分混匀;

(4) 30°C, 200 rpm 振荡培养 30 min;

(5) 向每个离心管中加入 70 μL DMSO, 颠倒温和混匀;

(6) 42°C 水浴保温 15 min, 冰浴 1-2 min;

(7) 5000 rpm 室温下离心 3 min;

(8) 弃上清, 加入 500 μL 1×TE 重悬细胞;

(9) 将 100 μL 重悬液涂布于营养缺陷型培养基上, 30°C 倒置培养 2~4 d, 直至菌落可见。

2.2.5.3 β-半乳糖苷酶活性分析

(1) 将一张无菌滤纸浸泡在盛有 5 mL Z-buffer/X-gal 溶液的培养皿中;

(2) 另取一张无菌滤纸用镊子将其铺在长有酵母菌落的平板上, 轻轻摩擦使滤纸与菌落紧密接触在一起, 并在滤纸上做出标记, 以使滤纸与培养基的位置相互对应。

(3) 用镊子轻轻夹起滤纸, 使接触菌落的一面朝上, 浸入液氮中处理 10 s;

(4) 当滤纸完全冻结后将其取出, 置于无菌培养皿中, 室温下解冻; 重复步骤 3 和 4 三至五次, 使酵母细胞完全裂解;

(5) 轻轻将接触菌落的滤纸一面朝上, 置于预浸的滤纸上 (步骤 1), 避免滤纸之间或下面产生气泡;

(6) 将滤纸在 30°C 下放置 30 min-8 h, 定期观察显色情况并拍照记录。(注意: 显色时间通常在 30 min-8 h 之间; 若大于 8 h, 可能会产生假阳性结果。)

2.2.6 烟草瞬时侵染共转化

2.2.6.1 烟草的培养

将营养土用水浸湿以后, 把本生烟草种子均匀铺洒在土中, 盖膜, 用竹签点

戳出气孔，覆膜待其萌发生长至 7 d 左右幼苗长出，揭膜。继续让其生长约至第 20 d 后将幼苗分开移栽至小盆中，在人工气候箱中培养。生长条件:温度 25℃;湿度 70%; 光照强度 $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 光周期 16 h (光)/8 h (暗)。

2.2.6.2 瞬时转化烟草

(1) 所需溶液配制:

烟草转化液(500 mL): AS 50 μmol (AS 待高压灭菌后再加); MES 0.978 g; $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0163 g; 加 dH_2O 定容至 500 mL, 调节 PH5.6。

(2) 共注射表达及报告基因活性检测。

烟草共注射步骤:

- 1) 烟草选择 8~10 周的幼嫩烟草, 有 8-10 片叶子完全展开;
- 2) 农杆菌二活后重悬菌体至 $\text{OD}_{600}=0.6\sim 0.8$ (实验时将数值相对固定);
- 3) 室温条件下, 5000 x g 离心 5 min, 收集农杆菌;
- 4) 用烟草转化液调节农杆菌的 OD_{600} 至 0.7;
- 5) 室温放置菌液 2~4 h;
- 6) 用 1 mL/5 mL 的无菌注射器注射烟草叶片, 并作标记。每个平行样本注射至少 3 个叶片;
- 7) 遮光护苗, 放入培养箱中暗培养, 3 d 后取叶片 GUS 染色观察或定量检测活性。

2.2.6.3 GUS 荧光定量检测活性方法

参照 Jefferson 的方法^[128]进行 GUS 荧光定量分析。GUS 可催化 4-甲基伞形酮酰- β -D-葡萄糖酸苷(4-MUG) 水解为 4-甲基伞形酮(4-MU)与 β -D-葡萄糖醛酸, 4-MU 分子中的羟基解离后被 365 nm 的光激发产生 455 nm 的荧光, 产生的荧光值可由荧光分光光度计定量。提取各转基因拟南芥材料的 GUS 蛋白, 采用 Bradford 法测定提取液中 GUS 蛋白的含量^[133]。

(1) 植物总蛋白的提取及浓度测定

1) 取 100 mg 植物样品在液氮中研磨成粉末, 加入 3 倍体积的 GUS 提取缓冲液, 再研磨 2 min, 将粉末装入 1.5 mL 离心管, 摇动 5 min, 12,000 rpm, 4℃离心 10 min, 取上清 4℃保存备用。

2) 蛋白标准曲线的制作: 取配制的 1 mg/mL BSA 母液, 按 0 μL 、160 μL 、200 μL 、240 μL 、280 μL 、320 μL 、360 μL , 加水补至 400 μL , 用考马斯亮蓝 G250 溶液定容至 10 mL, 进行 BSA 梯度稀释; 后在 $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$ 处测定光吸收值绘制标准曲线:

3) 样品蛋白含量测定: 取蛋白上清 250 μL , 加水 100 μL , 加入 9.65 mL 考马斯亮蓝染液, 混匀, 室温放置 5 min, 测定 595 nm 的光吸收值, 根据蛋白标准曲线计算样品总蛋白含量。

(2) GUS 荧光检测

1) 制作 4-MU 标准

配制 4-MU 梯度浓度液(由反应终止液配制): 1.0 $\mu\text{mol/L}$, 2.5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 500 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ 。在激发光 365 nm, 发射光 455 nm, 狭缝 2.5 nm 条件下, 测定各样品的荧光值, 绘制标准曲线。

2) 酶活性测定:

①取 200 μL 含 GUS 的上清(可根据测定的蛋白含量进行适当的调整体积)加入到 800 μL 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 GUS 提取缓冲液, 再加 1 mL MUG 底物(2 mmol/L MUG 溶液), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅旁边准备计时反应。迅速充分混匀, 并立刻取出 50 μL 加入到 950 μL 反应终止液, 将该管作为酶促反应的 0 点;

②分别在 0、5、10、15、20 min 分别取出 400 μL 的反应液, 加入 1.6 mL 的反应终止液(0.2 mol/L Na_2CO_3), 室温避光保存;

③用荧光分光光度计在激发波长 365 nm、发射波长 455 nm 下, 测定不同时间点的荧光值;

④用单位时间的荧光强度变化除以参加反应的总蛋白量, 求出单位质量的蛋白单位时间内的荧光强度变化。

2.2.7 木质素含量测定

待测转基因植株与对照植株的树干主茎被剥去树皮, 取第 3 到 12 节间剩余的主茎被用于进行木质素分析。依照国家标准《造纸原料木素含量的测定》(GB2677.8-81) 的测定方法进行木质素含量测定, 其原理利用 Klason 方法^[134]测定酸可溶性木质素。

(1) 称取一定量烘干后的杨树木材粉屑, 过 40 目筛;

称取 0.50 g 过筛后的杨树木材粉屑 W1 (约 0.5 g, 每个样品三个重复), 用定性滤纸包好, 放入索氏提取器中用苯-乙醇(67:33, v/v)于沸水中通过抽提 4 h, 提取完成后的粉末在通风橱中风干。

(2) 解开滤纸包, 将风干后试料小心转入 250 mL 三角瓶中, 加入 10 mL 72% 的浓硫酸, 30 $^{\circ}\text{C}$ 120 rpm 震荡 1.5 h, 然后加入 200 mL 蒸馏水, 120 $^{\circ}\text{C}$ 水解 1 h。将水解液用 G3 坩埚式过滤器过滤, 并用蒸馏水冲洗三角瓶 3 次, 水解残渣用蒸馏水洗至中性, 至洗液用 10% BaCl_2 溶液试之不现浑浊, 并用 pH 试纸检查滤纸边缘不呈酸性为止, 确保硫酸完全洗去, 将滤液定容至 250 mL, 此时硫酸浓度为

2.88%。

(3) 将过滤后的残渣和砂芯漏斗一起干燥 (80°C) 至恒重, 在干燥器中冷却至室温后, 称重得 W_2 (残渣+过滤器)。

(4) 将称重后的残渣和过滤器放入马氏炉中, 在 200°C 烧 30 min, 然后在 $575 \pm 25^\circ\text{C}$ 灰化 4 h, 取出后干燥器中冷却 30 min, 称重得 W_3 (灰分+过滤器)。

(5) 得出酸不溶木质素的含量为:

$$\%AIL = (W_2 - W_3) * 100 / W_1;$$

(6) 取步骤 3 所得 $V=250$ mL 的滤液 1 mL, 然后用 2.88% 的硫酸稀释 10 倍 (视样品而定), 保证吸光度在 0.2-0.7 之间, 稀释倍数记为 D , 光波长为 205 nm. 以 2.88% 的硫酸为对照。

(7) 所得酸溶木质素的含量为:

$$\%ASL = (A * D * V / 1000 * K * W_1) * 100;$$

A 表示: 吸收值, D 表示: 稀释倍数, V : 滤液的总体积

K 表示: 酸溶木质素的吸收系数, 取 110; W_1 表示: 试样的绝干质量

(8) 样品中木质素的含量为:

$$\text{Lignin} (\%) = AIL (\%) + ASL (\%);$$

(9) 样品中灰分量: $(W_3 - W_4) * 100 / W_1$, 洁净干燥的坩埚质量为 W_4 ; 每个样品重复 3 次, 取平均值。

2.3 实验结果与分析

2.3.1 *PtoVNS11* 基因的克隆及同源性分析

2.3.1.1 *PtoVNS11* 基因序列的克隆

本实验以毛白杨芽尖为材料, 按 Invitrogen 公司提供的 TRIzol® Reagent 试剂盒提取 RNA, 经检测获得了高质量的总 RNA, 见图 2.3-1。

根据同源基因 *PtrWND1B* 和 *AtSND1* 的保守序列区域设计引物, 以反转录得到的 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 反应得到该基因的全长编码序列。测序显示扩增得到的片段大小为 1257 bp (见图 2.3-2), 预测其编码 416 个氨基酸。BLAST 得知该序列为我们需要的基因片段, 命名为毛白杨 *PtoVNS11* (NCBI 登录 ID KU049786)。

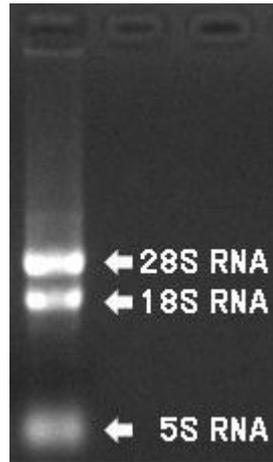


图 2.3-1 杨树总 RNA 提取电泳图

Figure 2.3-1 Agrose gel electrophoresis analysis of the total RNA isolated from *P. tomentosa* Carr.

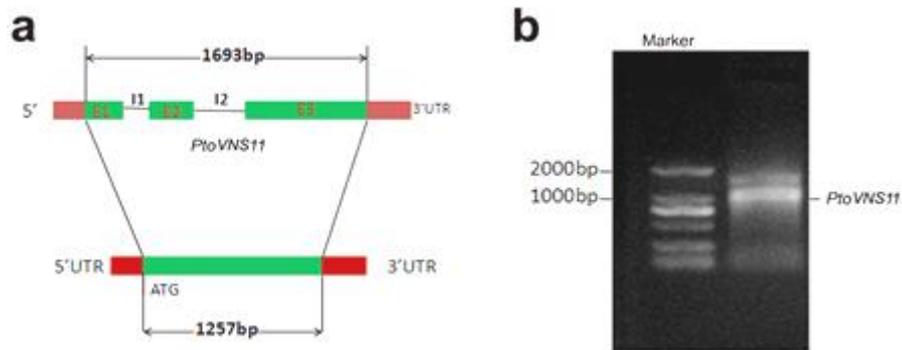
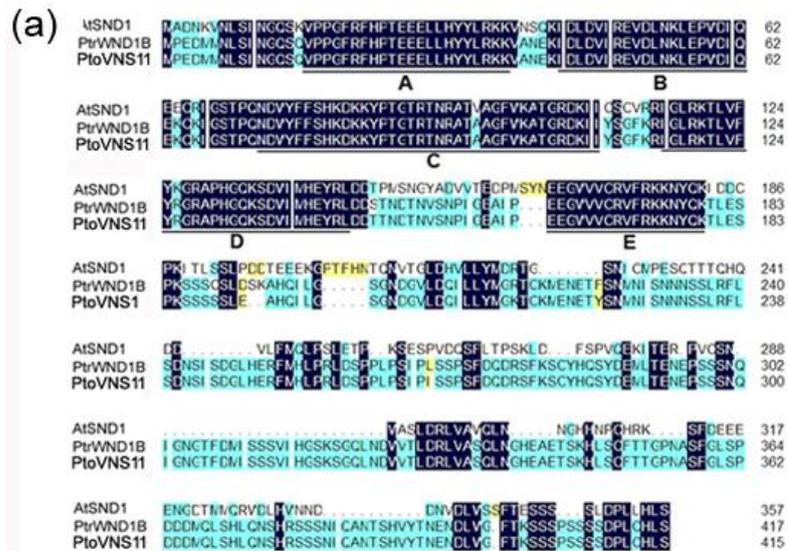


图 2.3-2 *PtoVNS11* 的 CDS 序列结构及 RT-PCR 电泳片段

Figure 2.3-2 Gene structure and agrose gel electrophoresis analysis of *PtoVNS11* CDS fragment by RT-PCR



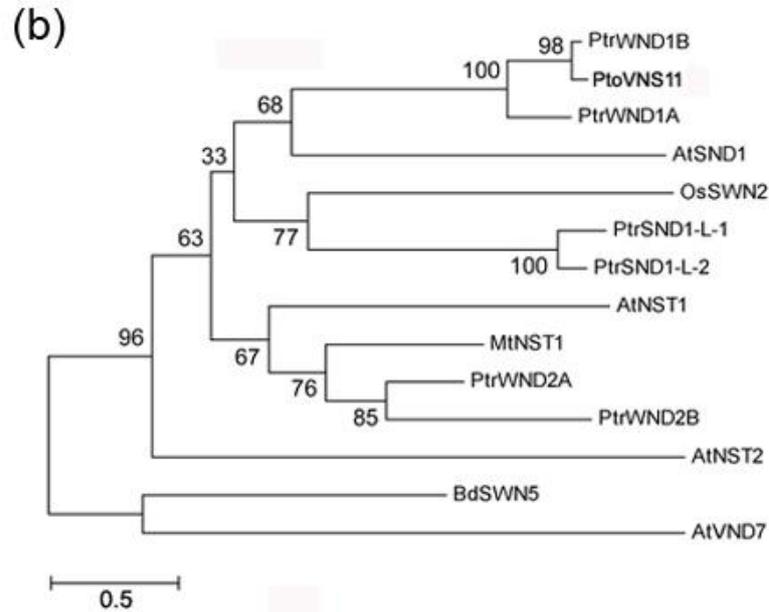


图 2.3-3 *PtoVNS11* 和其他 NAC 家族氨基酸序列比对及进化树分析。(a) *PtoVNS11* 同其他 NAC 结构蛋白的多重序列比对, 深褐色底纹显示的为相似度超过 80% 区段, 划线标注的地方为高度保守的五个氨基酸序列 (A-E); (b) 杨树和拟南芥中的 NAC 转录因子进化树分析; 进化树构建利用软件 MEGA5.0, 可靠性检验 bootstrap 值设定为 1000 次重复^[135]。

Figure 2.3-3 Phylogenetic analyses and comparison of the putative amino acid sequence of *PtoVNS11* with that of the other NAC domain proteins. (a) Multiple sequence alignment of *PtoVNS11* and the other NAC domain proteins. Identical amino acids are shaded in gray. The locations of the five highly conserved amino acid motifs (A-E) are underlined. (b) Poplar NAC homologs of *Arabidopsis* SND1 were analyzed for their phylogenetic relationship with SND1, *PtoVNS11* using the DNAMAN7.0 with 1000 replicates of the neighbor-joining algorithm, and the phylogenetic tree was displayed using the MEGA5.0^[135].

2.3.1.2 *PtoVNS11* 序列同源性的比较

利用 NCBI 将毛白杨 *PtoVNS11* 与其他物种的 NAC 家族近源基因进行核苷酸序列比对分析发现它们具有较高的同源性。利用 MEGA5.0 比对来自不同物种的 NAC 家族的氨基酸序列发现, *PtoVNS11* 编码的氨基酸序列与毛果杨和拟南芥的相似程度分别为 97.9% 和 59.6%, 表明它们的同源性很高。尤其在 NAC 功能域内的氨基酸序列更为保守 (见图 2.3-3)。

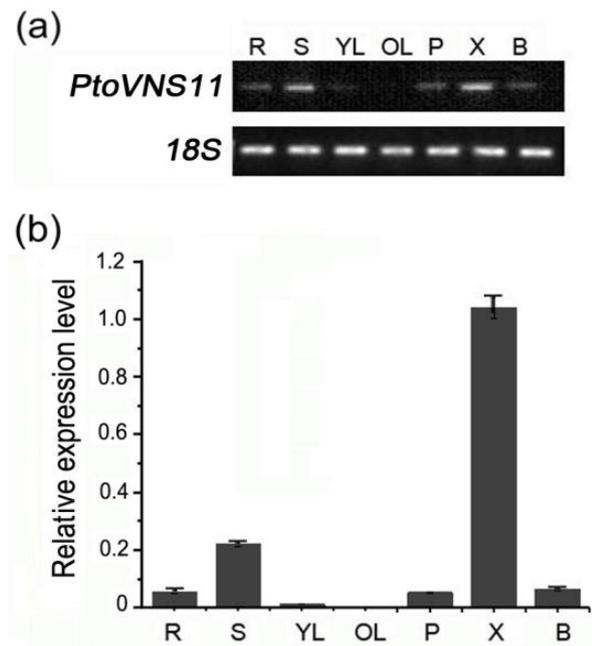


图 2.3-4 *PtoVNS11* 的半定量及相对荧光 PCR 检测。R, 根部组织; S, 茎段组织; YL, 幼叶 (第 1~2 节间); OL, 老叶 (第 5~6 节间); P, 叶柄; X, 木质部; B, 树皮。18S 为内参标准基因。

Figure 2.3-4 Expression analysis of *PtoVNS11* using quantitative real-time PCR. R, root apices; S, stem; YL, young leaf (1 ~ 2 internodes); OL, old leaf (5 ~ 6 internodes); P, petiole; X, xylem; B, bark. *18S* is the internal standard gene. The bars are standard deviations (SD) of three technical repeats.

2.3.2 *PtoVNS11* 基因的组织表达特异性分析

为了检测 *PtoVNS11* 在各组织器官中的相对表达模式, 分别提取根、茎、幼叶、老叶、叶柄、木质部和韧皮部的 RNA, 并反转录成 cDNA, 进行半定量和相对定量检测。结果表明, 毛白杨 *PtoVNS11* 基因在植株的根、茎、叶、叶柄、木质部和韧皮部中均有表达, 但在茎和木质部中的表达量远远高于其他组织。这预示着该基因很可能在植物的木质部发生和形成过程起着重要作用。

2.3.3 *PtoVNS11* 亚细胞定位分析

由于转录因子在细胞核内发挥作用, 因此了解其进入细胞核的过程非常重要。核孔直径大小约为 50~80 nm, 允许分子量为 40~60 ku 的蛋白扩散通过, 但研究表明, 转录因子通过核孔的过程是受到调控而非自发产生的^[136]。

转录因子进入细胞核的过程与本身包含的核定位信号区 (NLS) 密切相关, 由于该信号区域开始与抑制蛋白结合, 在非外界信号刺激作用下核定位序列无法发挥作用, 当刺激形成后抑制蛋白解离, NLS 借助核孔处的亲核蛋白进入核孔。转录因子进入细胞核的过程除了受到是否具有 NLS 区域、转译后磷酸化修饰、分

子间相互作用的影响之外，转录因子本身其旁侧序列的磷酸化和脱磷酸化是调节转录因子进入细胞核的重要方式。不具有 NLS 区的转录因子则通过与其他带 NLS 区的转录因子相互作用进入细胞核。经序列预测得知，在 PtoVNS11 氨基酸序列的 N 末端和 C 前端处存在可能的核定位序列，因此该因子可能具有核定位的功能。

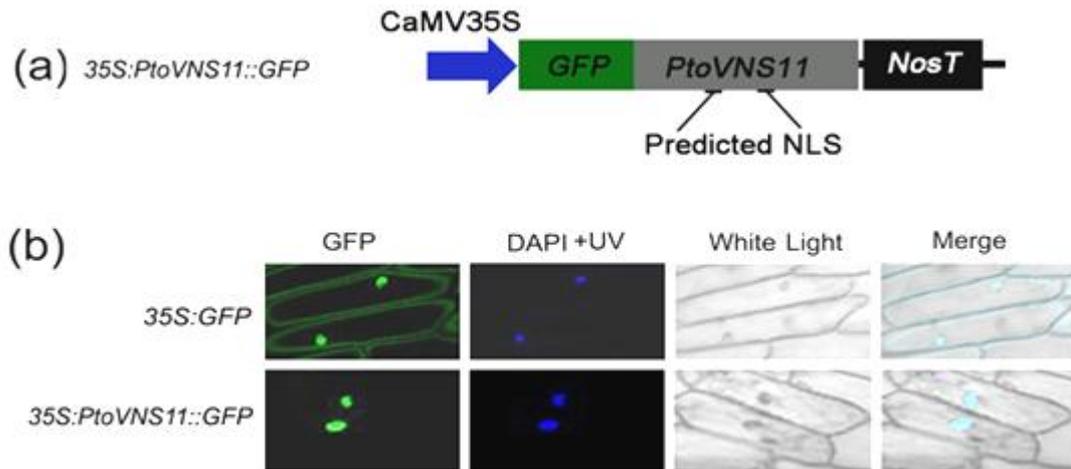


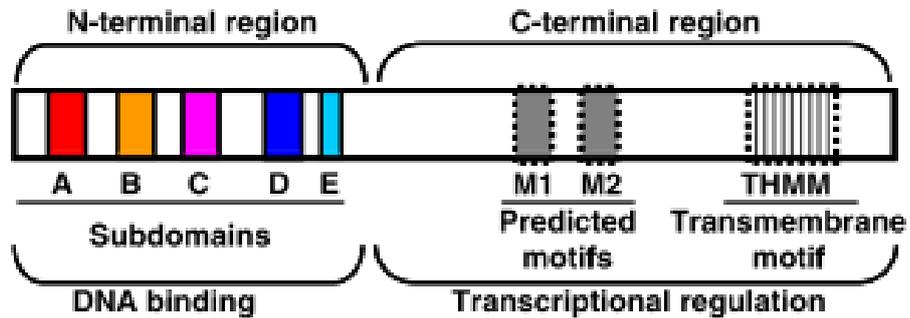
图 2.3-5 PtoVNS11:GFP 融合蛋白在洋葱表皮细胞里的亚细胞定位分析。(a) 35S:PtoVNS11-GFP 亚细胞定位载体示意图；(b) 35S:PtoVNS11-GFP 融合蛋白及 35S: GFP 对照蛋白在洋葱细胞中的瞬时表达情况。

Figure 2.3-5 Subcellular localization of PtoVNS11::GFP fusions in onion epidermal cell.(a) Construction of PtoVNS11 fusion GFP expression vector in onion epidermal cell.(b)Subcellular localization analysis of PtoVNS11::GFP fusions and 35S::GFP control in onion epidermal cell.

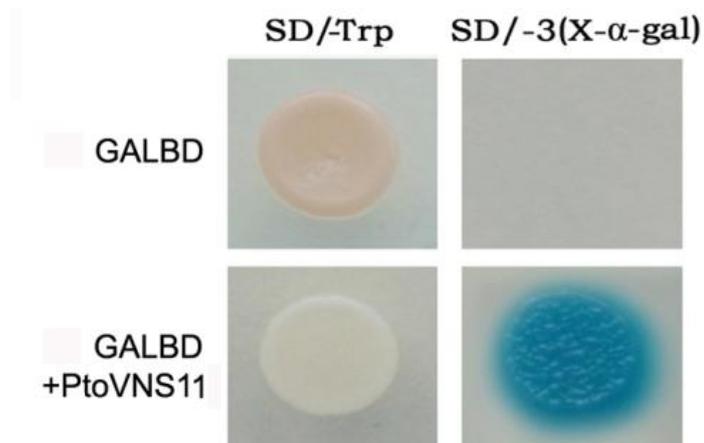
为实验证实 PtoVNS11 蛋白的亚细胞定位，我们将 35S:PtoVNS11-GFP 融合表达载体通过基因枪介导法轰击洋葱表皮细胞，发现在 488 nm 波长下显示的绿色荧光斑点与 DAPI 染色后细胞核在 360 nm 波长下发出蓝色荧光，且与在 488 nm 波长下显示的绿色荧光斑点完全吻合。此外，35S:GFP 的对照载体结果显示，整个洋葱表皮细胞质和细胞核都显示绿色荧光。因此 PtoVNS11 具有核定位能力；且因为只在细胞核中显示绿色荧光信号，因此可以判定该基因的表达为特异性的核定位表达。

2.3.4 酵母单杂交的转录激活分析

1993 年，Wang 和 Reed 在酵母双杂交实验基础上首次建立了研究蛋白质和 DNA 相互作用的实验体系^[137]，通过报告基因的表达检测真核生物细胞内基因转录调控方式^[138]。

图 2.3-6 NAC 蛋白结构^[139]Figure 2.3-6 Structures of NAC protein domains^[139]

PtoVNS11 转录因子的转录激活区位于 NAC 结构域的 C 端 (C-terminal region) (图 2.3-6)，为了验证 PtoVNS11 的转录激活能力，我们选用酵母单杂交实验来研究其转录激活特性。因为 pGBTK7 具有 GAL4 的 DNA 结合域 (DNA binding domain)，没有激活功能域，因而不能单独激活报告基因表达。我们将 *PtoVNS11* 构建到 PGBKT7 载体并转化酵母菌 AH109，利用报告基因在营养缺陷型平板上的生长情况检测 PtoVNS11 的转录调控特性 (图 2.3-7)。

图 2.3-7 PtoVNS11 的 ORF 框融合在 GAL4-BD 上通过酵母细胞里的 Trp 和 α -Gal 报告基因显示其转录激活特性。Figure 2.3-7 Transcriptional activation analysis of PtoVNS11 ORF fused with the GAL4 DNA-binding domain (GAL4BD) showing its ability to activate the expression of the Trp and α -Gal reporter genes in yeast.

将 pGBKT7- PtoVNS11 和 pGBKT7 空载体分别转化 AH109 酵母细胞，并分别涂布在 SD/-Trp, SD/-Trp, -His, -Ade 缺陷型培养基上生长。结果表明，对照和 pGBKT7- PtoVNS11 均可以在一缺的培养基上正常生长，而在 SD/-Trp, -His, -Ade 缺陷型培养基只有 pGBKT7- PtoVNS11 能正常生长并且 β -半乳糖苷酶活性显

示出蓝色，表明 *PtoVNS11* 具有转录激活活性并可以激活 *His*、*Ade* 及 *LacZ* 报告基因的表达(图 2.3-7)，是一个转录激活因子。

2.3.5 *PtoVNS11* 基因启动子表达特异性分析

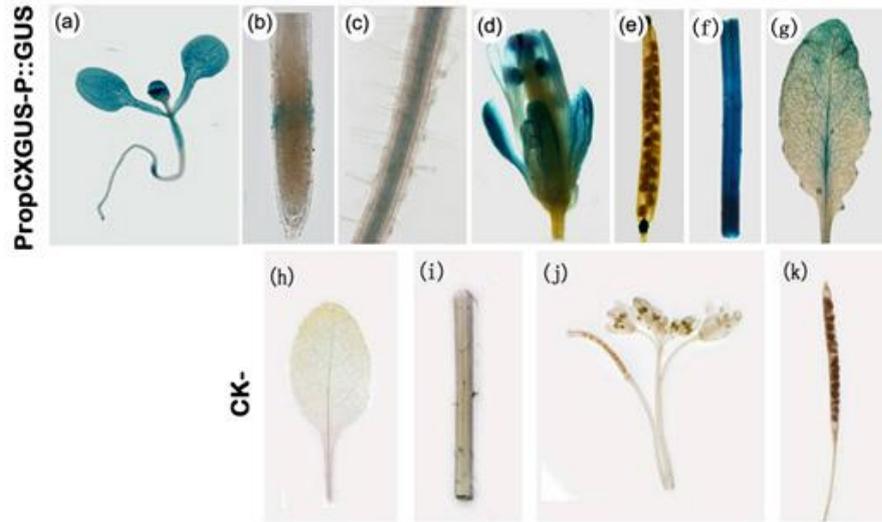


图 2.3-8 对转 *ProPtoVNS11:GUS* 载体的拟南芥 *GUS* 表达模式分析。图 a 为生长 2 周幼苗, b 为根尖生长区; 图 c 为根部成熟区, d、e 为生殖发育后期器官(花和角果); f 为茎, g 为成熟叶。

Figure 2.3-8 GUS activity of transgenic Arabidopsis carrying the *proPtoVNS11:GUS* vector. GUS activity was detected in 2-week-old seedlings (a) and root tip region (b) and the vascular region (c) of roots. GUS expression patterns in the flower (d), silique (e), stem(f), and mature leaf (g) during the development of the reproductive organs.

将转入农杆菌 *EHA105* 的启动子重组载体通过花序浸染法侵染野生型拟南芥。以野生型拟南芥为阴性对照，以含有 *CaMV 35S* 启动子的 *pCAMBIA1305:-GUS* 为阳性对照。

2.3.5.1 启动子表达模式分析

对转基因拟南芥不同生长时期的组织和器官进行 *GUS* 组织化学染色, 结果如图 2.3-8 所示。与对照相比 (h~k 为空白对照), *GUS* 蛋白在幼苗生长的早期表达比较强烈, 几乎在各个组织器官中都有较强烈的表达, 在根中则特异的在根尖和根毛区表达。当植株进入生殖生长阶段时, 发现该启动子在植株的花 (d)、角果顶端和基部固着点 (e), 以及成熟的叶片中均有表达, 尤其在植物的茎中表达最为显著 (f)。这些结果表明 *PtoVNS11* 基因可能参与幼苗的发育及茎维管组织的发育过程。

2.3.5.2 缺失启动子表达活性分析

利用 PLACE 及 PLACE CARE 在线分析软件上分析长为 2069 kb 启动子的主要作用元件, 发现有 SNBE、W-box 等元件的分布。据此截短启动子, 将一系列不同长度的启动子片段构建在 GUS 报告基因载体上 (图 2.3-9)。

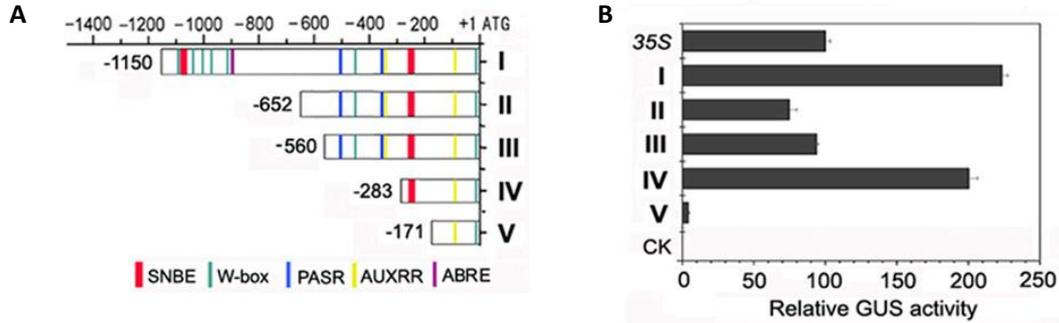


图 2.3-9 不同长度 5' 缺失启动子的表达活性分析。CK 为以 CaMV 35S 启动子转化的空对照载体; (A) 不同长度 5' 缺失启动子示意图; (B) 不同长度 5' 缺失启动子转基因拟南芥 GUS 荧光活性分析检测。误差棒为标准误差, 重复三次测量。

Figure 2.3-9 The promoter fragments with different lengths were inserted into pCXGUS-P vector. Plants were also transformed with the promoterless GUS gene (CK, as a negative control) or the GUS gene under the control of the CaMV 35S promoter (35S, as a positive control). (A) Schematic representation of constructs carrying different *PtoVNS11* promoters. (B) GUS activity in transgenic plants was measured by fluorometric analysis. Error bars represent standard error (n=3).

对不同长度 *PtoVNS11* 基因启动子片段的转基因拟南芥幼苗 (约 14d) 进行 GUS 活性定量分析 (图 2.3-9), 结果显示在距离转录起始位点 (ATG) 上游 -1150 bp、-652 bp、-560 bp、-283 bp、-171 bp 处的启动子缺失片段均具有启动活性, 其中启动子 I 活性最高, II 和 III 表达活性差异不明显, 但对于 IV 而言, 该片段启动子总长度为 287 bp GUS 表达活性却几乎与 I 没有显著性差异, 和 V 片段相比活性表达较为显著。这暗示着在 -283 和 -171 区间含有对启动报告基因表达活性重要的基本启动子元件 (图 2.3-9A, B)。结合上面 *PtoVNS11* 基因的组织表达模式结果, 该结果进一步指示该基因对植物发育的重要调控作用。

2.3.6 *PtoVNS11* 回复拟南芥突变体功能缺陷实验

拟南芥作为模式植物, 在参与维管系统及木质部发育过程中多基因或转录因子功能已经阐明, 这为探究林木物种维管形成层的发育机理奠定了良好的理论基础。目前, 利用物种间结构近似基因之间的同源比对, 从而获得对应突变体拟南芥植株, 来验证新基因的功能是一项常用手段。根据 Zhong 等人的报道^[88], 在拟南芥突变体的研究中发现, *snd1* 和 *nst1* 基因存在部分功能冗余互补, 单独缺失其中一个基因的正常表达, 引起的拟南芥茎木质部表型变化不明显。因此, 我们首

先通过杂交获得了 *snd1nst1* 双突变体植株，并将 *PtoVNS11* 基因导入双突变体中表达，来验证该基因的生物学功能。

2.3.6.1 拟南芥 *snd1* 和 *nst1* 单突变体植株基因型鉴定

将购买的编号为 SALK_120377C 和 SALK_015495C 的拟南芥种子种植后提取总 DNA, 并进行 PCR 扩增，验证是否为突变株，为下一步人工杂交选取父本和母本。分别随机选取 8 株单突变体进行基因型的鉴定（图 2.3-10），结果表明，所获得的拟南芥均为纯合单突变体。

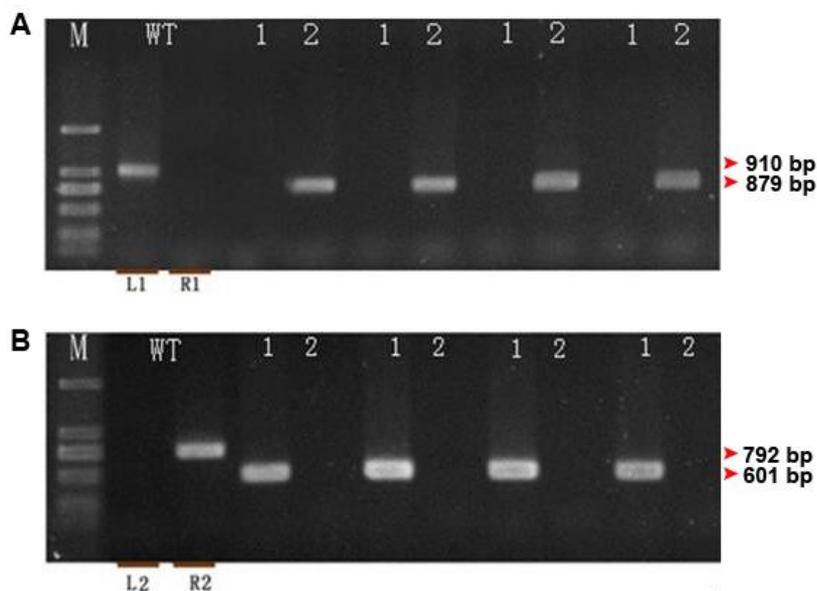


图 2.3-10 *nst1* 和 *snd1* 单突变体亲本植株鉴定

Figure 2.3-10 Genotype of *nst1* and *snd1* single mutation plants

2.3.6.2 *snd1* 和 *nst1* 突变体杂交 F2 代植株基因型鉴定

根据 T-DNA 片段的两端序列设计引物，扩增检验纯合突变株。如果基因未被突变掉或者是杂合体的时候，能够扩增出目的带。如果为纯合突变体，因为该基因序列编码区外源大片段的插入会阻抑目的片段的扩增。本试验采用的是在加入内参引物 *Actin* 的基础上，同时扩增 *snd1* 和 *nst1* 两个基因。*snd1* 基因长度为 792 bp, *nst1* 基因长度为 910 bp。经过三轮 PCR 组合扩增，其结果显示 7 号的 PCR1、PCR3 均未扩增出条带，而野生型均能扩增出条带，说明这株可能是纯合双突变体（图 2.3-11）；其余植株均为杂合子。将鉴定并得到的双突变体种子种植，取生长 7 w 拟南芥茎切片，进行 HCl-间苯三酚染色，观察到双突变体茎中维管束间细胞没有次生壁结构，不能显示红色。并且在拟南芥抽薹约 10~15 cm 高时，植株开始出现倒伏生长的现象。在图 2.3-12 中呈现的是生长第 8 w 左右的拟南芥茎

横切片及整体植株状态。

拟南芥 *snd1nst1* 双突变体植株的获得, 对于利用该突变体研究杨树 NAC 家族中调控次生维管系统相关基因的功能提供了良好的实验材料和突变体杂交育种实验依据。

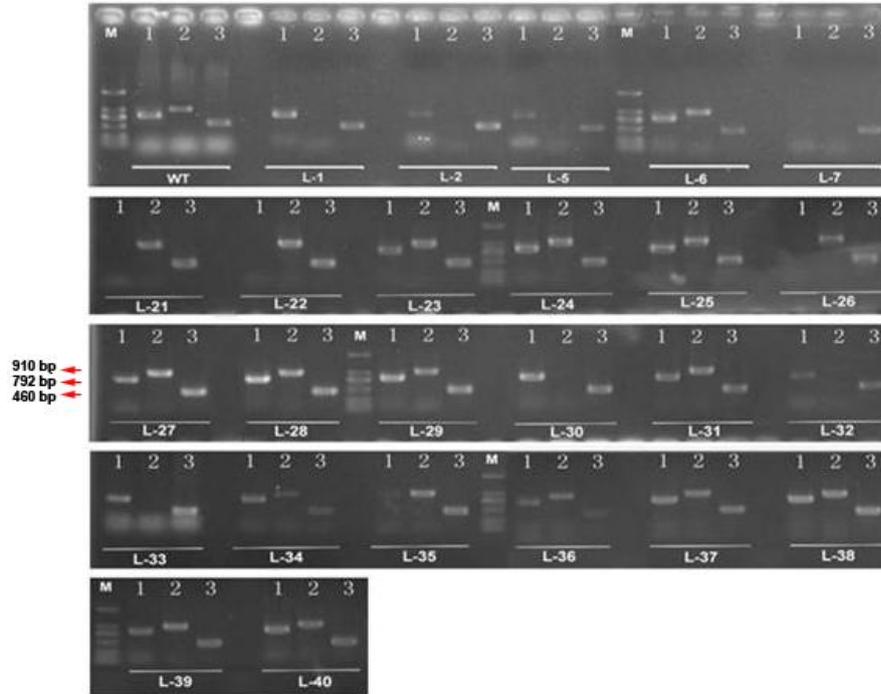


图 2.3-11 *nst1snd1* 纯合双突变体植株鉴定

Figure 2.3-11 Genotyping of *nst1/snd1* double- mutation plants

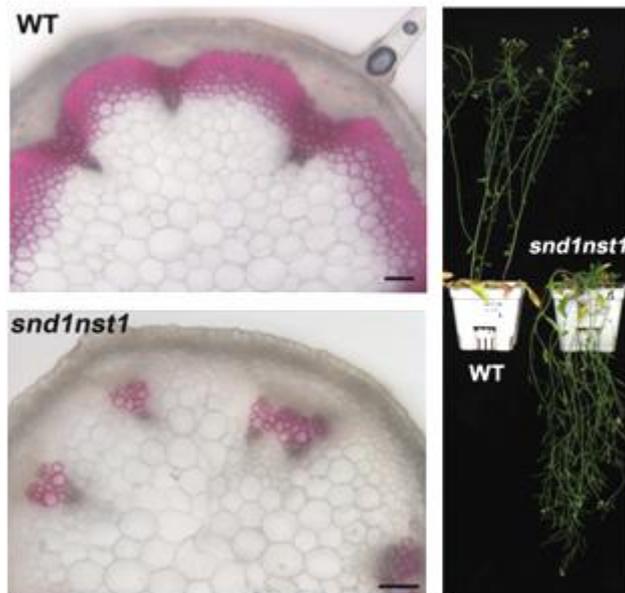


图 2.3-12 *nst1snd1* 纯合双突变体表型

Figure 2.3-12 Genotyping of *nst1snd1* double-mutation plants

2.3.6.3 在 *snd1nst1* 双突变体中表达 *PtoVNS11* 基因

转 *PtoVNS11* 基因的回覆突变体、*snd1nst1* 突变体、过表达株系和与野生型 (Col) 同时种植, 生长 7-8 w 后, 取相同基部茎切片作 HCl-间苯三酚染色, 观察横切面中维管组织木质部和束间纤维发育情况; 此时发现, 在回复性转基因株系中维管束间纤维细胞发育缺失的表型几乎完全消失, 植株能直立生长, 恢复到野生型相似的生长状态 (图 2.3-13)。

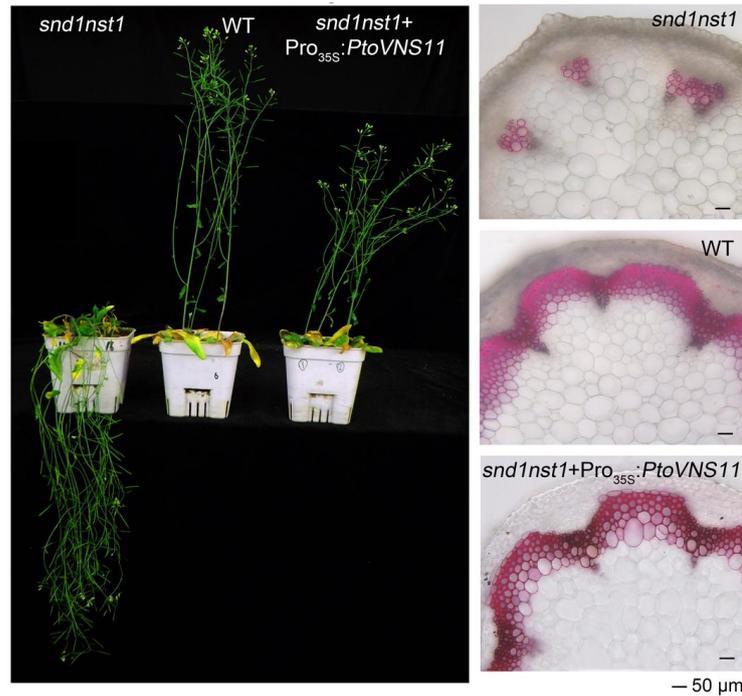


图 2.3-13 超表达 *PtoVNS11* 基因在 *snd1nst1* 突变体拟南芥中的回复表型

Figure 2.3-13 The phenotype of complementations compared with WT and *snd1nst1* mutants.

该实验确认了 *PtoVNS11* 是杨树 NAC 家族中影响次生壁发育的重要作用因子, 同时也证明了杨树 *PtoVNS11* 和拟南芥 NAC 家族中转录因子的功能具有保守性。由于 *SND1* 和 *NST1* 是拟南芥中控制木质部细胞发育的“开关”基因, 因此, *PtoVNS11* 是否也影响木质部细胞次生壁木质化过程, 对下游次生壁发育相关转录因子或结构基因起关键性制约作用呢?

2.3.7 超表达 *PtoVNS11* 拟南芥表型分析

我们将构建的 *Pro35S:PtoVNS11* 植物表达载体通过农杆菌 EHA105, 在野生型拟南芥中超表达, 经潮霉素筛选后得到的转基因拟南芥表型如图所示:

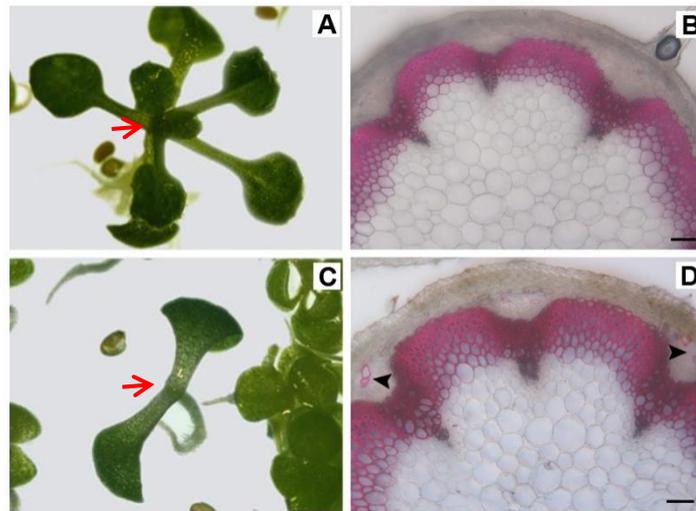
图 2.3-14 转基因超表达 *PtoVNS11* 拟南芥表型分析

Figure 2.3-14 Phenotype analysis of transgenic plants over-expressing *PtoVNS11* (WT, A, B; OE, C, D)

图 2.3-14 A,C 为 *PtoVNS11* 超表达的拟南芥生长两周后的的生长对比情况, B,D 是抽薹时期 (生长 8 周) 拟南芥茎横切片结构图。由图中可知它们的表型存在明显差异, 幼苗时期转基因苗分生组织生长滞后, 真叶延迟长出; 在成熟时期的茎秆维管组织中, *PtoVNS11* 导致木质部和皮层组织中木质素的异位沉积。因此, *PtoVNS11* 能抑制拟南芥的早期生长, 影响植物正常的生长发育; 并且引起拟南芥茎维管组织中的细胞次生壁的木质素含量增加。

2.3.8 在毛白杨中验证 *35S:PtoVNS11* 基因功能的结果与分析

尽管草本和木本植物茎发育拥有相似的次生代谢调控机制^[140], 但木材形成是一个复杂的多基因调控网络, 涉及木质纤维的合成及在细胞壁上的沉积, 木质部不同细胞类型的分化以及个体多年径向生长等过程, 远比草本植物复杂。因此, 以草本模式植物为材料取得的研究结果往往需要在木本植物再加验证。因此, 我们将 *PtoVNS11* 基因转入毛白杨中进行功能验证, 得到了更准确的实验结果。

2.3.8.1 毛白杨的遗传转化及转基因植株的获得

选择生长健壮, 根系发育好, 叶色浓绿、质地肥厚的野生型无菌苗叶片进行转化, 采用叶盘法将 *Pro_{35S}:PtoVNS11* 转入毛白杨 (*P. tomentosa* Carr.) 中。经过愈伤组织诱导、芽分化、及生根培养之后, 待幼苗长至 10 cm 左右移出瓶外, 炼苗培养直至完全适应温室环境。其过程见图 2.3-15。

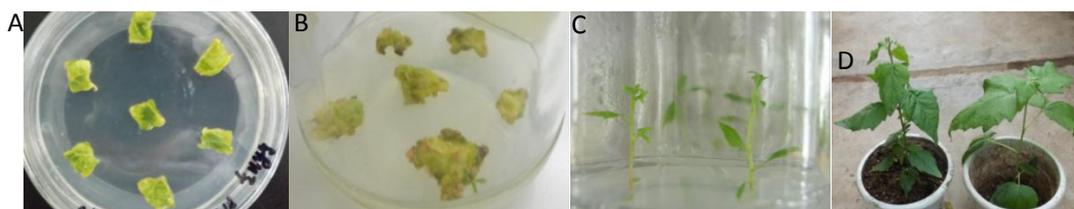


图 2.3-15 *Pro*_{35S}:*PtoVNS11* 的遗传转化过程。A 为诱导愈伤组织形成阶段，B 抗性愈伤，C 为抗性苗，D 为再生植株，E 为在温室生长 2 月之后的植株。

Figure 2.3-15 The genetic transformation process of *PtoVNS11* in Chinese White poplar. A. Transgenic callus aggregated; B. transgenic shoots regenerated from a callus; C. Regenerated transgenic whole plants on the rooting medium; D 2-month-old transgenic plants grown in a greenhouse.

2.3.8.2 转基因植株的检测与筛选

采用 CTAB 法提取抗性再生植株基因组 DNA 作模板，分别以 *Pro*_{35S}:*PtoVNS11* 质粒和野生型植株基因组 DNA 为阳性和阴性对照，设计特异引物 PCR 扩增潮霉素抗性基因 *Hpt*。扩增的电泳结果见图 2.3-16 显示，在 *PtoVNS11* 转基因植株组和阳性对照均获得一条与预期大小一致的片断(562 bp)，而阴性对照无此条带。表明携带 *PtoVNS11* 基因的外源 T-DNA 已成功整合到毛白杨基因组上。

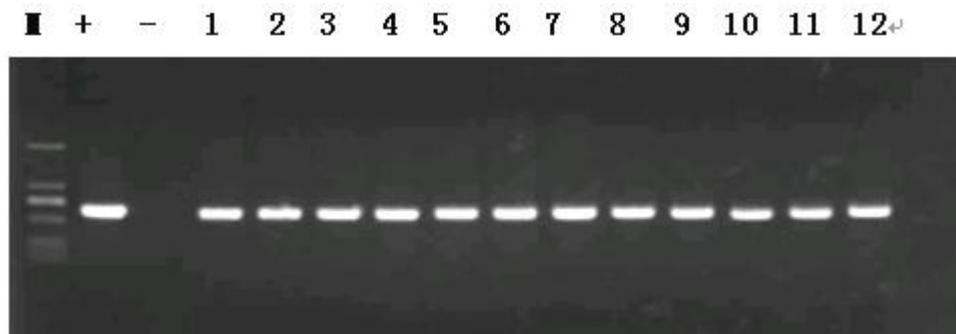


图 2.3-16 转基因植株的 PCR 验证

Figure 2.3-16 Confirmation of transgene integration using PCR

2.3.8.3 转基因植株茎木质部结构和组分分析

分别以 *Pro*_{35S}:*PtoVNS11* 的转基因株系和同时期的野生型毛白杨为实验材料（户外生长约 3 个月），取第 3、4、5 节间的茎段，通过徒手和石蜡包埋切片，分别进行间苯三酚和甲苯胺蓝染色，结果如图 2.3-17 所示：木质素在转基因植株茎秆木质部中的沉积明显高于野生型(图 2.3-17a,b,c,d,e,f)，体现在木纤维和导管细胞壁结构更加致密(图 2.3-17g,h)，表明 *PtoVNS11* 的过量表达对木质部细胞壁的木质素沉积具有促进作用。

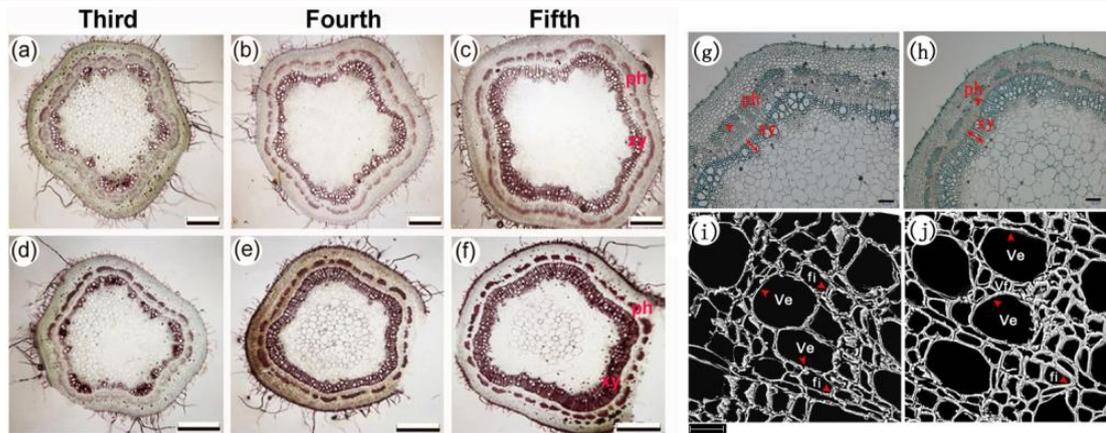


图 2.3-17 35S:*PtoVNS11* 转基因植株中的横切面组织学观察。野生型 (a,b,c,g,i)，其中;转基因 (d,e,f,h,j)，a~f 为间苯三酚染色，g, h 为甲苯胺蓝染色，I,j 为电镜扫描。xy, 木质部;ph, 韧皮部;ve, 木质部导管;fi, 木纤维。

Figure 2.3-17 Transverse histological sections were observed in *PtoVNS11* transgenic plants. The different internodes in stems of 3-month-old wild-type (a, b, c, g) and transgenic lines (d, e, f, h) were sectioned and stained for lignin with phloroglucinol-HCl or Toluidine Blue. Transverse sections were observed by scanning electron microscope (SEM) from the 4th internodes of the stems of WT (i) and transgenic plants (j). xy, xylem; ph, phloem; ve, xylem vessel; fi, xylem fiber. Bars = 200 μ m in a - f; 50 μ m in g, h; 17.5 μ m in i, j.

2.3.8.4 转基因植株的生理表型观测

NAC 转录因子参与了植物的多种生理过程，如生长发育、环境胁迫过程中的应答反应等^[141]。具体表现在它能影响植物的细胞分裂，器官分化及次生壁形成等过程^[142-144]，由于 *PtoVNS11* 同拟南芥的 *AtSND1* 氨基酸结构上高度同源(图 2.3-3)，后者是随植株的发育持续性表达的模式^[54]，即随着拟南芥居间维管束纤维和木质部纤维细胞的发生、成熟至次生木质化发生期间持续性由高到低表达，从而影响植株的生长发育。

当超表达 *PtoVNS11* 转基因杨树表现出生长侏儒化、叶片卷曲等畸形特征。从而也暗示 *PtoVNS11* 可能直接或间接影响植物的生长(图 2.3-18)。

我们通过连续观察杨树生长的其他表型变化，如株型、株高、节间长度，并做了详细的统计。将生长约 3 个月的野生型和转基因植株对比，发现高表达 *PtoVNS11* 植株明显矮化(图 2.3-18a)，并且各节间长度也显著短于野生型株系(图 2.3-18d)。说明茎的维管组织或顶端分生组织的正常发育受到了影响。

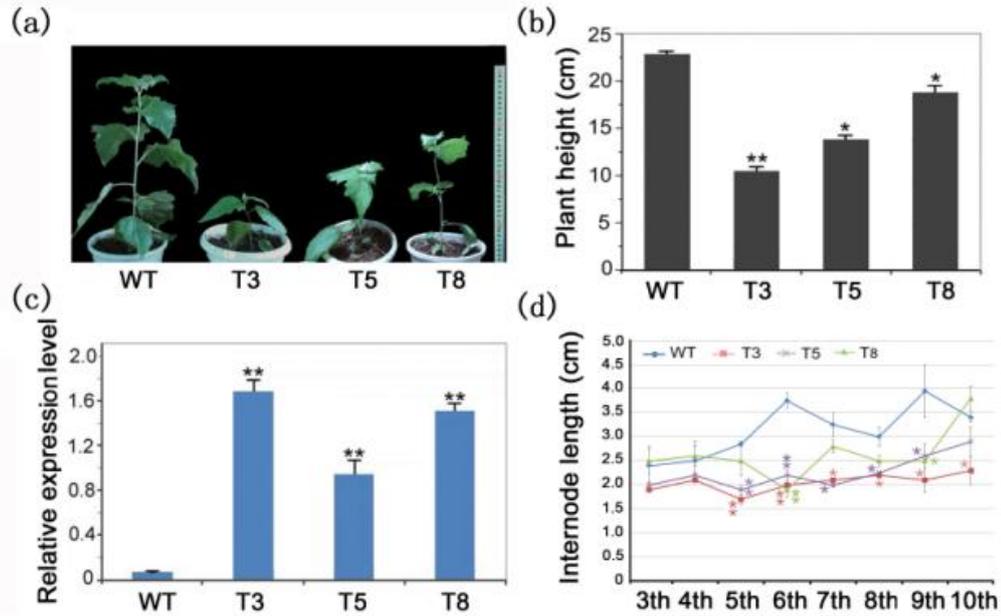


图 2.3-18 杨树中超表达 *PtoVNS11* 基因的表型观察分析，(a) 生长约 12 周的杨树对比观察；(b) 高度测量；(c) 高表达株系的定量检测；(d) 高表达株系与野生型植株见节间长度对比。

Figure 2.3-18 Phenotypic analysis of transgenic plants of overexpression *PtoVNS11* in *Populus*. (a) Phenotypes of 12-week-old *Pro*_{35S}:*PtoVNS11* transgenic plants compared with WT. Plant heights (b) and stem internode lengths (20-week-old plants) (d) of transgenic *Pro*_{35S}:*PtoVNS11* and wild-type plants. (c) qRT-PCR analysis showing the expression of *PtoVNS11* in the seedlings of three representative transgenic lines (T3, T5 and T8). The expression of the *18S* rRNA gene was used as an internal control. Results are presented as means and standard deviations ($n = 10$). Data are means \pm SE from at least 10 plants in different lines. **, * indicate significant differences in comparison with WT at $P < 0.01$, $P < 0.05$ respectively (Student's *t*-test).

2.3.8.5 转基因杨树木质素含量测定

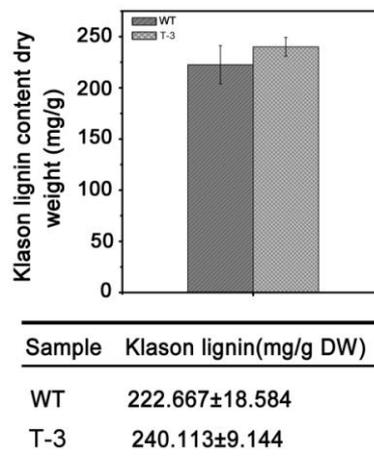


图 2.3-19 木质素含量测定

Figure 2.3-19 The content of Klason lignin of WT and transgenic line. The datas are means \pm SD of three independent expriements.

植物的生长包含木质部细胞不断生长分化的过程，在这个过程中由于次生壁加厚和木质素的沉积，植物木质茎中的木质素含量逐渐发生变化。因此，我们利用 Klason 木质素检测方法对转基因超表达 *PtoVNS11* 的杨树茎木质素含量进行了测定。

我们将生长约 3 月的野生型及转基因 *PtoVNS11* 毛白杨株系的茎秆部位第 4 节间以下的部分进行了木质素含量的测定。如图 2.3-19，和野生型对照相比，转基因植株当中的木质素含量有少量提高，高于野生型约 7.84%。然而，总体木质素含量却并没有呈现出显著性差异。可以解释的一点可能在于，由于木质素的合成是一个非常复杂的、牵涉到许多关键转录因子或者结构基因表达的庞杂网络体系，因此，对木质部发育的调控方式是多样化的。可能 *PtoVNS11* 和毛果杨中 *PtrWND1B* 类似^[145]，还存在另一种调控木质素合成的方式，即该基因的 mRNA 前体转录水平上具有不同功能的剪接异构体，从而调节或限制了基因功能表达的情况。

2.3.9 *PtoVNS11* 对木质素合成的调控方式分析

2.3.9.1 次生木质部合成相关结构基因表达检测

植物细胞次生细胞壁的形成是一个有多种细胞有序分化、多种生物或非生物调节因子共同参与协同调节其发育的生物过程。早先的研究发现，转录因子是影响维管组织或形成层发育的重要调节因素之一^[146]。而木质素是维管植物次生壁的重要组分，上述一系列表型和拟南芥中的功能相互验证实验说明 *PtoVNS11* 可能参与调节植物茎中木质素的形成，为了进一步在分子水平上研究 *PtoVNS11* 调控木质素合成的方式，找出 *PtoVNS11* 所影响的木质素合成相关基因，我们对木质素合成途径中结构基因及关键性的转录因子进行了半定量或荧光定量 PCR 检测分析。

提取野生型和 *PtoVNS11* 超表达毛白杨株系的幼嫩茎秆组织的 RNA，反转录获得 cDNA，采用半定量和定量 PCR 方法检测木质素合成相关结构基因的表达量，发现苯丙烷代谢途径的 *C4H*, *HCT*, *CCoAOMT* 等基因表达显著上升，同时木质素单体合成直接相关的下游木质素特异调节基因 *CAD*, *PO* 也显著性上升(图 2.3-20)。这说明 *PtoVNS11* 可以通过提高木质素合成途径关键酶基因的表达水平增加细胞木质素含量。然而，根据拟南芥中对 *AtSND1* 调控网络的转录组数据分析结果可知，NAC 家族对于次生壁转录调控作用存在着多级转录因子联合调控的现象，因此，我们推断 *PtoVNS11* 对这些关键酶基因的影响并不是直接的作用。而是通过调节下游其他转录因子的转录表达而间接发挥作用的。

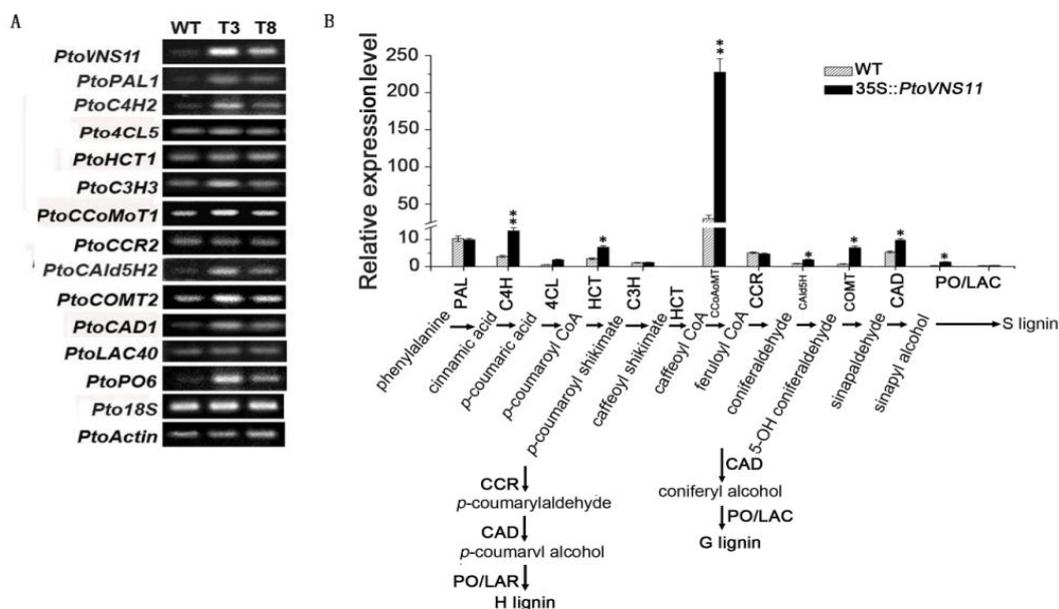


图 2.3-20 超表达 *PtoVNS11* 植株中的木质素特异调控途径上结构基因的定量及半定量检测

PAL: Phenylalanine ammonia-lyase, 苯丙氨酸裂解酶; C4H:cinnamate 4-hydroxylase, 肉桂酸-4-羟基化酶; C3H:4-coumarate 3-hydroxylase, 香豆酸-3-羟化酶; COMT:cinnamate O-methyltransferase, 咖啡酸/5-羟基阿魏酸 O-甲基转移酶; F5H:Ferulate 5-hydroxylase, 阿魏酸-5-羟基化酶; 4CL: 4-coumarate-CoA ligase, 4-香豆酸辅酶 A 连接酶; CCoAOMT:caffeoyl-CoA O-methyltransferase, 咖啡酰辅酶 A O-甲基转移酶; CCR:cinnamoyl-CoA reductase, 肉桂酰 CoA 还原酶; CAD:cinnamyl alcohol dehydrogenase, 肉桂醇脱氢酶; PO:peroxidase, 过氧化物酶。

Figure 2.3-20 Lignin biosynthetic genes expression in in *PtoVNS11* overexpressor plants by semi-quantitative

RT-PCR analysis. PAL (phenylalanine ammonia-lyase), C4H (cinnamate-4-hydroxylase), 4CL (4-coumarate:

CoAligase), HCT (p-hydroxy cinnamoyl-CoA: quinate shikimate p-hydroxy cinnamoyltransferase), C3H (4-coumarate 3-hydroxylase), CCoAOMT (caffeoyl-CoA O-methyltransferase), CCR (cinnamoyl-CoA reductase), CAlD5H (cinnamyl aldehyde 5-hydroxylase), COMT (caffeic acid/5-hydroxy cinnamaldehyde O-methyltransferase).

Error bars represent SE of three independent biological replicates. *, ** indicate significant differences in comparison with WT at $P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively (Student's *t*-test).

2.3.9.2 次生木质部形成相关转录因子表达检测

目前,对草本模式植物拟南芥的次生生长转录调节网络的研究相对比较清楚。在整个木质素合成相关的转录调控网络中不仅仅有 NAC 家族转录因子对木质素的合成起着重要的调控作用,其他转录因子家族如 MYB, bHLH 也参与其中。SND1 在整个网络当中起着“开关”的核心调控作用,与 NST1, NST2, VND6 和 VND7 共同激活 MYB46、83 等次级调控开关基因,并经由这些次级作用因子直接或间接控制纤维素、木质素或木聚糖等次生细胞壁组分合成相关的结构基因的表达,从而影响植物维管组织的形成或发育^[47, 51]。

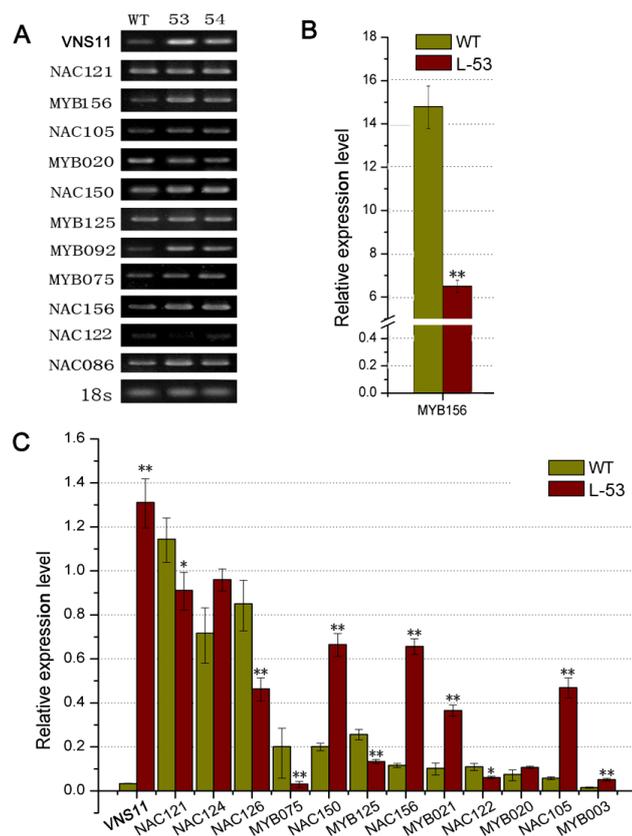
图 2.3-21 *PtoVNS11* 转基因植株的定量和半定量 PCR 检测分析

Figure 2.3-21 qRT-PCR and semiRT-PCR analysis of transcription factors in *P.tomentosa* Carr. caused by the presence of the *PtoVNS11* overexpression.

因此，对野生型和转基因植株中已知参与了木质素合成调控的转录因子的表达水平进行了检测。

为了验证超表达 *PtoVNS11* 基因会影响哪些木质素合成相关转录因子的表达，因此，我们选取了 NAC 和 MYB 家族中和木质素合成相关的一系列转录因子基因，进行了半定量和定量检测。结果发现，与野生型相比，转基因株系中 MYB 家族正向调控因子 *MYB092*，*MYB003*，*MYB021* 表达显著上升，而 *MYB75*，*MYB125* 显著性降低；NAC 家族成员 *NAC124*、*150*、*156*、*105* 都有不同程度的上升(图 2.3-21)，这一结果和杨树“开关因子”PtrWND2B 和 PtrWND6B 调控激活下一级转录因子表达结果一致；同时，在这个实验当中我们还发现与拟南芥 *AtMYB4* 同源的转录因子 *PtoMYB156* 转录表达显著下降。据早前对 MYB4 的研究工作证明，作为拟南芥中首个被鉴定的同时影响木质素代谢和黄烷酮生物合成的转录因子，MYB4 能通过抑制苯丙烷代谢途径上游的 *C4H* 基因表达，抑制下游木质素特异生化合成过程。这个结果暗示着，*PtoMYB156* 转录因子可能也通过木质素的代谢合成途径，影响了毛白杨中次生壁的发育过程。至于究竟通过哪种途径、以怎样的方式参与了这一过程，仍需要实验证明。

2.4 小结与讨论

Taylor-Teeples 等人以拟南芥为研究模型, 基于蛋白质-DNA 相互作用在转录因子和次生壁代谢合成相关酶基因之间建立了较为全面的网络调控体系^[124]。其中, 转录因子和次生壁代谢基因之间的存在复杂调控关系, 除了先前报道的 NAC 家族转录因子之外, 还有 MYB、WRKY、KNOX 等其它家族转录因子成员的参与^[147, 148]。可见, 植物次生壁的形成是一个受多种转录因子构成的复杂调控网络控制的过程。另外, 多个物种中的比较转录组学研究分析表明, 基于 NAC 家族基因主导的细胞壁合成机制在维管植物中是十分保守的^[149]。例如, 苔藓 (*Physcomitrella patens*) 中并没有典型的次生壁结构, 但是苔藓中 PpVNS 转录因子也能调控多个根据 AtSND1、AtNST1 的下游靶基因, 如 *AtMYB46*、*MYB83*、*MYB103* 和 *AtMYB85* 预测的同源的保守因子^[150]。暗示 NAC 家族因子不仅在生物学功能上是保守, 在调控方式上, 如靶基因识别和转录激活方式, 也在进化中维持着稳定^[57]。推测从低等维管植物到高等维管植物, 以 VNS-MYB 转录因子家族为基础的细胞壁修饰转录调控体系拥有共同的起源。

目前已得到证实, 有些转录因子通过识别结构基因中特有的结构元件, 参与到次生壁形成的调控网络中。火炬松 (*Pinus taeda* L.) 中的 MYB1 和桉树 (*Eucalyptus grandis*) 中的 MYB2, 以及毛白杨中的 PtoMYB092, 均能结合于木质素生物合成基因启动子区的 AC 元件, 抑制或激活次生壁中主要结构成分的生物合成, 从而影响次生壁的发育。桉树 (*Eucalyptus gunnii*) EgMYB1 和 EgMYB2 都能特异结合于 *EgCCR* 和 *EgCAD2* 的启动子区, 分别行使转录抑制因子或转录激活因子的功能。然而, 当过量表达 *EgMYB2* 时, 并不能引起转基因烟草总木质素的显著变化, 但 S/G 比值增加。对于处于转录调控网络上游的转录因子, Zhong 和 Pyo 等人通过研究 VNS 转录因子对下游基因的结合实验, 发现两个重要的结合元件 TERE(Tracheary Element-regulating Cis-elements) 元件^[151] 和 SNBE (Secondary Wall NAC-binding Elements) 元件^[152], 并且两者有部分序列是高度保守甚至重合的。它们是位于开关基因 AtVNDs 和 AtSND1/NST3 下游的级联靶基因的启动子区域中常见的序列, 并依此受上一级开关转录因子的调控。这些研究结果暗示了: 1、不同的物种中转录因子对次生壁形成的调控方式具有较大相似性。2、相同物种中不同的转录因子对次生壁形成的影响有差别。3、在处于调控网络上游的转录因子对下一级转录因子的调控很大程度上依赖基因结构的保守程度, 或者说是否具有相应的结合元件是构成转录因子之间发生调控作用的必要条件。然而, 对不同物种的植物而言它们自身的调控方式是否又具有特别之处? 那些调控模式相同的转录因子, 哪一些在功能进化上是保守的?

受上述研究结果的启示, 我们对杨树 *PtoVNS11* 的功能进行了细致的研究,

发现它与拟南芥 *AtSND1*、*AtNST1* 功能对应，作为“开关基因”参与控制植物细胞次生壁形成。对 *PtoVNS11* 的研究为我们在木本植物中挖掘更多功能上关联的转录因子提供了基础。由于 NAC 家族对于次生壁转录调控作用存在着多级联控的现象，因此，尽管在超表达 *PtoVNS11* 的杨树中发现，*PtoC4H*，*PtoHCT*，*PtoCCoAOMT* 等次生木质部合成相关的结构基因的表达发生了显著改变（图 2.3-20），然而，这可能是通过 *PtoVNS11* 调节下游其他转录因子的转录表达而间接产生作用的（图 2.3-21）。由于次生壁形成的转录调控网络中，除了激活型的转录因子外，还有一些抑制类的转录因子，共同调控木质部细胞次生壁的分化，因此，这可能可以解释在超表达 *PtoVNS11* 的杨树中检测到 NAC 家族转录激活因子成员 *NAC124*、*NAC150*、*NAC156*、*NAC105* 都有显著上调表达，而 *PtoMYB75* 或 *PtoNAC122* 等负调控因子的转录表达呈现出下降的不同表达情况。然而，*PtoVNS11* 是如何调控这些转录因子信号的？与其相关的转录因子在次生壁形成过程中的具体功能又是怎样的呢？

我们挑选了与拟南芥 *AtMYB4* 同源的转录因子 *PtoMYB156* 进行转录水平检测发现，该基因的表达水平约为野生型正常表达的 43%，下降了近 1.3 倍。根据早前 *AtMYB4* 的研究报道，作为拟南芥中首个被鉴定的同时影响木质素代谢和黄烷酮生物合成的转录因子，*AtMYB4* 能通过抑制苯丙烷代谢途径上游的 *AtC4H* 基因表达，抑制下游木质素特异生化合成过程。这个结果暗示着，*PtoMYB156* 转录因子可能也通过木质素的代谢合成途径，影响了毛白杨中次生壁的发育过程。因此，在下一章内容中，我们围绕 *PtoMYB156* 是否参与了植物次生壁的形成这一过程展开了进一步的研究。

第三章 杨树 *PtoMYB156* 基因的克隆和功能分析

前言

MYB 转录因子家族是植物中成员数量最庞大的转录因子家族之一，广泛参与植物的生长发育，如维管形成层的发育，和响应环境胁迫信号等多种生理过程^[153]。在 2013 年公布的拟南芥转录因子数据库中，鉴定并收录了 58 种类别共 2296 个转录因子，仅 MYB 家族成员就有 265 个（MYB 转录因子 168 个，MYB-Related 97 个），约占转录因子总数的 11.5%（拟南芥转录因子数据库，2013，<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/index.php?sp=Ath>）。在杨树，4288 个转录因子中 MYB 转录因子约占 11.17%（杨树转录因子数据库，2013，<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/index.php?sp=Pth>）。根据不同基因上 MYB 结构域基序重复种类和数量的不同可将 MYB 家族成员划分为三种主要类型：R1-MYB、R2R3-MYB、R1R2R3-MYB 三个亚族^[154, 155]，其中，R2R3-MYB 转录因子是最为常见的类型。

近年来，通过 RNA 测序分析发现大量 MYB 基因在杨树、桉树和松树等木本植物的木质部、维管形成层中特异表达，暗示这些基因可能与木材形成有关^[156-158]。此外，MYB 转录因子也可能同时具有多种生物学功能，如，苹果中的 MdMYB3 能同时影响花青素和黄酮合成^[176]；拟南芥中的 PAP1 被认为影响了木质素、花青素，原花青素，黄酮醇和酚酸的合成^[178]；由于拟南芥 AtMYB4 被报道参与了对苯丙烷代谢途径中 *C4H* 的直接调控，影响了下游的木质素及类黄酮化合物的合成^[159]。我们的研究发现，在超表达 *PtoVNS11* 的杨树中，AtMYB4 的同源因子 *PtoMYB156* 的转录表达水平被显著下调。因此，推测 *PtoMYB156* 在杨树中可能也参与调控苯丙烷代谢途径。本章节围绕这一问题展开了研究。

3.1 实验材料、设备

3.1.1 植物材料

同第二章 2.1.1

3.1.2 菌株和载体

同第二章 2.1.3

3.1.3 试剂及仪器设备

同第二章 2.1.4

3.2 实验方法

3.2.1 生物信息学分析

本章中序列比对使用美国 Lynnon Biosoft 公司开发的 DNAMAN8.0 进行, 载体和序列酶切位点结构分析使用 NEBcutter V2.0 在线分析工具 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) , 在使用美国能源部网站 (<http://www.phytozome.com/>) 和美国国立生物技术信息中心 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查找和 BLAST 所需近缘序列后, 用 MEGA5.0 软件完成对序列进行多重比对和系统发生树的构建。启动子结构元件分析使用 PlantCARE^[160, 161], PLACE^[162]。

3.2.2 *PtoMYB156* 组织表达模式检测

3.2.2.1 半定量检测 (semiRT-PCR)

选取温室长势良好的野生型毛白杨 (生长期约 5~6 月) 材料, 按 2.2.3 方法获得杨树各组织 RNA, 以管家基因 18S rRNA 为内参, 调整各样品 RNA 浓度, 采用 2 步法 RT-PCR 研究 *PtoMYB156* 在杨树不同组织中的表达情况。RT-PCR 的程序: 94°C 3 min, 26 个循环 (94°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 40 sec)。10 μ L 反应产物在含 EB 的 1% 的凝胶上电泳检测。

3.2.2.2 相对荧光定量检测 (RT-PCR)

以杨树各组织中的 cDNA 为模板, 按照 SYBR Premix Ex Taq™ II 操作说明进行实时定量 PCR, 确定相关基因的相对表达量。

反应条件: 95°C, 30 sec; 40 个循环 (95°C, 5 sec; 60°C 30 sec)。

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算结果。

样品反应体系如下所示:

SYBR Premix ExTaq™ II(2 \times)	12.5 μ L
10 μ mol/L F-primer	0.5 μ L
10 μ mol/L R-primer	0.5 μ L
cDNA	1.0 μ L
ddH ₂ O	10.5 μ L
总体积	25 μ L

3.2.3 启动子 *ProPtoMYB156::GUS* 在拟南芥上的报告表达

取 T2 代经筛选培养基上生长约 16 d 的转基因拟南芥小苗 10 株, 及已进入开

花生生长阶段、高度约为 20 cm 转基因拟南芥成熟植株 3~6 株作为实验材料。取幼嫩时期的小苗全株及成熟期植株根、茎、叶、花及果荚部位按照 Jefferson 等人的方法进行 GUS 组织化学定位^[128]。将不同生长时期或组织部位的材料浸入 X-Gluc 染色液, 37°C 保温 2~4 h, 经 70% 酒精脱色, 在解剖显微镜下观察 GUS 基因的表达情况。

3.2.3.1 *ProPtoMYB156*:GUS 表达载体构建

将目的基因启动子(-1423 bp 至距离 ATG 位点+12 bp 区间)连接到 pCXGUS-P 载体上, 构建 Promoter-GUS 融合表达载体, 方法参见第二章。载体构建图谱如图所示:

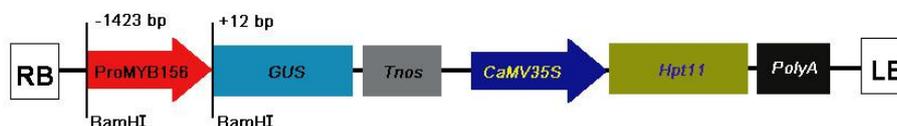


图 3.2-1 *PtoMYB156* 启动子载体示意图。LB 和 RB: 左右边界; TNOS: 胭脂碱合成酶基因终止子; *HptII*: 潮霉素磷酸转移酶; GUS: 葡糖醛酸糖苷酶; 图形长短与比例无关。

Fig 3.2-1 Schematic representation of *ProPtoMYB156*:GUS construct. LB and RB, left and right T-DNA borders, respectively; TNOS, nopaline synthase terminator; *HptII*, hygromycin phosphotransferase II; GUS, β -glucuronidase. The diagram is not drawn to scale.

3.2.3.2 *ProPtoMYB156*:GUS 转化拟南芥

转化方法同第二章 2.2.2

3.2.3.3 GUS 报告蛋白组织化学显色

获得转基因 *ProPtoMYB156*:GUS 拟南芥后显色方法同第二章 2.2.2。

3.2.4 杨树中过表达 *PtoMYB156*

3.2.4.1 *Pro35S*:*PtoMYB156* 植物超表达载体构建

植物表达载体为 pCXSN, 构建方法同第二章。所用引物见附表。

3.2.4.2 叶盘法转化毛白杨

采用叶盘法将 *Pro35S*:*PtoMYB156* 转入毛白杨叶片中, 方法同 2.2.3。

3.2.4.3 转基因毛白杨切片组织化学法染色

3.2.4.3.1 转基因植株新鲜材料徒手切片

取野生型及转基因植株的叶柄、叶脉以及茎，徒手切片。其步骤具体为：

- 1、切片前，在培养皿中盛以清水，准备好毛笔、滴管和刀片；
- 2、切片前用左手的三个指头捏住材料，稍突出于手指之上，手持双面刀片，刀口向内与断面平行，然后自左前方向后方滑行切片。注意手臂用力代替手腕用力。
- 3、材料一次切下，连续动作，切下许多薄片后用湿毛笔将薄片移入培养皿中待用；
- 4、挑选薄而均一的切片，放在载玻片上制成临时装片以不同染色方法进行染色，后放在光学显微镜下观察。

3.2.4.3.2 转基因植株材料石蜡切片及染色

方法同第二章 2.2.3

3.2.4.4 转基因毛白杨生长指标检测

株高(cm)：测定插条新生主枝的长度。为了减小试验误差，所有材料在试验开始阶段只取主茎顶端芽为最高测量点。

茎段直径：测量生长约5个月大小杨树苗各节间直径。

3.2.4.5 转基因毛白杨木质素含量检测

方法同第二章 2.2.7

3.2.4.6 木质素含量影响相关转录因子基因转录水平检测

3.2.4.6.1 半定量 PCR (Semi-quantitative reverse transcription PCR) 检测

- 1) 取温室中生长状态良好的同期野生型杨树及转基因杨树幼叶，提取 RNA；
- 2) cDNA 的反转录合成，步骤同第二章方法；
- 3) 调整各组 PCR 扩增反应体系中 cDNA 模板量，经多次 PCR 反应，选取合适退火温度及循环参数将各组内参基因 *18S* 表达水平浓度调一致，确定各组所加 cDNA 起始模板量；
- 4) 按所确定的 cDNA 模板加入 PCR 反应体系中，用对应的半定量引物扩增目的片段，反应条件同第二章中方法；
- 5) 凝胶电泳检测，分析野生型和过表达 *PtoMYB156* 基因中的不同株系间一系列转录因子或关键酶基因的表达模式。

3.2.4.6.2 相对荧光定量 PCR 检测

以 cDNA 为模板对基因进行 semiRT-PCR, qRT-PCR (Realtime RT-PCR)采用

SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒(TaKaRa)。模板 cDNA 的制备参见第二章2.2.3。其他相关操作步骤如下:

1) 样品加样反应体系:

SYBR Premix ExTaq™ II(2×)	12.5 μL
10 μmol/L F-primer	0.5 μL
10 μmol/L R-primer	0.5 μL
cDNA	1.0 μL
ddH ₂ O	10.5 μL
总体积	25 μL

每个样品设三个平行重复,以不加模板的反应体系为阴性对照。

2) 配好的反应体系放入 Takara TP800 R-1613 荧光定量 PCR 仪(Takara 公司)中进行二步法的 PCR 反应程序。

3) 数据处理:程序结束后,利用溶解曲线 Tm 值判断产物单一性以及溶解温度。用相对定量的方法,先分别测定出目的基因和参比基因 *18S* 的表达量,再求出相对于内参基因的目的基因的相对表达量,最后进行样品间相对表达量的比较;采用的计算方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ^[163]。

4) 独立重复上述步骤三次,将所得数据进行分析作图。

3.2.4.7 酵母单杂交

3.2.4.7.1 酵母单杂交载体构建

使用附件中所给陈列的相应引物,以毛白杨叶片 cDNA 为模板进行 *PtoMYB156* 基因扩增,产物经琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒纯化后,与用引物附加的同样酶切并纯化回收的载体 pGBKT7 进行连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经菌液 PCR 和测序鉴定后,将重组质粒命名为 pGBKT7-*PtoMYB156*,保存菌种备用。

3.2.4.7.2 酵母单杂交转化

转化方法见第二章2.2.5

3.2.4.8 验证与 *PtoMYB156* 相互作用的结构基因启动子载体构建

3.2.4.8.1 木质素特异合成途径上关键酶结构基因的启动子序列分析

顺式作用元件预测采用 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/>)

[Plantcare/html/](#))^[162], PLACE(<http://WWW.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.htm>)^[161], NSITE-PL 及 ScanWM-P 程序(softbe, <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)。

3.2.4.8.2 木质素特异合成途径上关键酶结构基因的启动子载体构建

以毛果杨 DNA 为模板, 利用 PrimeSTARTMHS (Premix) DNA Polymerase 高保真酶扩增 C4H、C3H、CCOAOMT、CCR、CESA 基因中包括 ATG 在内的上游启动子 (约 1.5 kb)。引物序列见附件。

3.2.4.8.3 烟草瞬时侵染转化

方法同第二章 2.2.6

3.2.5 利用 CRISPR/CAS9 技术在杨树中敲除 *PtoMYB156* 基因

CRISPR/Cas9 系统是目前科研领域应用最广泛的基因组编辑技术, 在过去两年在植物中成功修饰了拟南芥、水稻以及小麦等植物基因组。目前转化拟南芥通常采用农杆菌介导的沾花法, 而杨树当中最先报道的是使用农杆菌浸染叶盘法^[164]。本人研究课题即采用了这种方式在毛白杨中实现 *PtoMYB156* 的敲除表达。

3.2.5.1 植物材料

同第二章 2.1.1。

3.2.5.2 菌株和载体

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , 农杆菌 EHA105 (*Agrobacterium tumefaciens*) 为本实验室保存。本实验所用到的 CRISPR/gRNA 系列载体由华南农业大学刘耀光老师实验室提供, 植物表达载体 pCXS_N, 为湖南农业大学水稻基因组学实验室王国梁教授提供, 详细资料见参考文献^[125]。

3.2.5.3 试剂及仪器设备

同第二章 2.1.4

3.2.5.4 构建 CRISPR/Cas9-*PtoMYB156* 载体

3.2.5.4.1 克隆 *PtoMYB156* 基因并完成测序

同第二章, 所用引物见附表。

3.2.5.4.2 CRISPR/Cas9 靶位点选择

将测序得到的 *PtoMYB156* 序列放入网站 ZiFiT Targeter Version 4.2

(<http://zifit.partners.org/ZiFiT/Introduction.aspx>)^[165], 挑选序列中 NGG 上游第 20 碱基是 A 或 G 的序列, 优先选为靶序列。并结合该区域序列中 GC 含量的分布情况, 选中三个靶位点序为 Target1: CGCACCTTGTTTGTATGGG; Target2: GTTGCTTACATTAGAGCTCA; Target3: AACTCTTGCCACATCTAAGA。(见图 3.2-2)

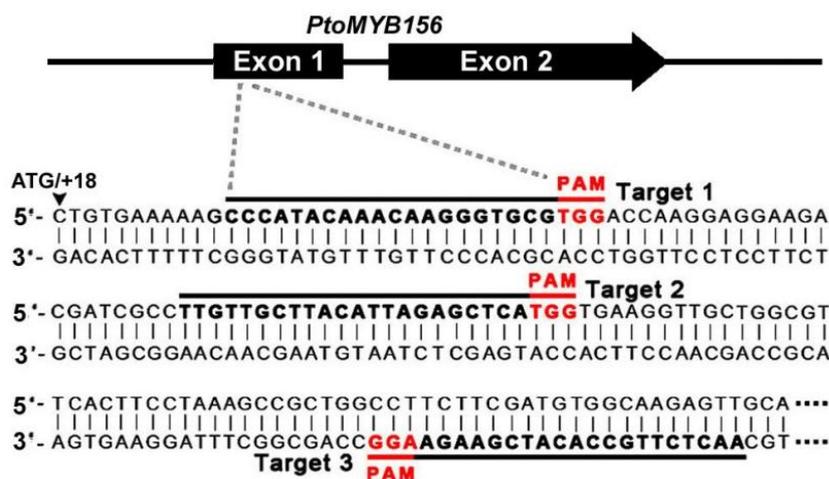


图 3.2-2 *PtoMYB156* 靶位点序列。保守的间隔相邻基序 (PAM) PAM 显示红色, 靶序列下标划线。

Figure 3.2-2 Target sequences in the *PtoMYB156* gene. The PAM (protospacer-adjacent motif) sequence is shown in red and targeted sequences are marked by line.

3.2.5.4.3 将 *PtoMYB156* 基因装载入 Cas9/sgRNA 载体系统中

本载体系统采用拟南芥 AtU3b, AtU6-1 和 AtU6-29 启动子, 分别驱动 *PtoMYB156* 编码区序列的三个靶片段, 以 Golden Gate Cloning 方法^[166]进行 Cas9 载体和多个 gRNA 表达盒片段的一次连接组合完成。采用冻融法将载体转入农杆菌 EHA105 中^[167]。

3.2.5.4.4 通过叶盘法转染毛白杨叶片并筛选敲除成功转基因植株

利用第二章 2.2.2 方法提取毛白杨叶片 DNA 为模板, 以组合引物方式扩增内源 *PtoMYB156* 靶基因序列附近片段, 将得到的 PCR 产物在 3% 的琼脂糖凝胶中电泳, 直至短序列分开。引物组合方式为: *PtoMYB156*-F, CCTCCGTCTCTAGTCCTACC; *PtoMYB156*-Cas9-R, GGAGGCTATGGAGTTTGATA。参考目的片段大小 340 bp。所分离得到的 DNA 片段进行回收并连接转化至 pMD-19 载体中测序, 用 DNAMAN7.0 序列比对软件对比参考序列, 分析内源 *PtoMYB156* 基因敲除情况。

3.2.6.4.5 CRISP/Cas-*PtoMYB156* 转基因毛白杨切片组织化学法染色

参见第二章 2.2.3.6 方法。

3.2.6.4.6 木质素含量影响相关结构基因转录水平检测 (QRT-PCR)

参见第二章 2.2.3.3 方法。引物见附表。

3.2.6 木质素单体含量检测 (HPLC)

根据碱性硝基苯氧化法测定木质素单体组成^[168, 169]。具体操作过程如下:

1. 利用苯/乙醇除去脂类, 酚类, 可溶性糖, 淀粉等非细胞壁物质: 称取 0.1000 g 木材粉末 (过40目筛), 用滤纸包好后放入含有苯/乙醇 (67:33, V/V) 溶液的索式提取仪中沸水抽提 6 h, 取出, 通风橱过夜风干至恒重, 获得秸秆残留物 (CWR)。

2. 称取 50.0 mg CWR 放入具有不锈钢保护层的聚四氟乙烯密封罐中 (25 mL), 并加入 5.0 mL 2.0 mol/L NaOH 溶液, 0.50 mL 硝基苯和 1 个转子。将整套装置拧紧密封好后, 置于 170°C 恒温油浴锅中反应 3.5 h, 转速为 15 r/min。反应完毕后, 将密封罐迅速冷却。

3. 将密封罐中反应混合液转移至 100 mL 磨口三角瓶中, 密封罐用 2.0 mol/L NaOH 溶液冲洗干净。向三角瓶中加入一定量的内标物, 内标物为乙基香兰素, 浓度配置为 4 mg/mL (2.0 mol/L NaOH 配置)。

4. 萃取: 用 30.0 mL 二氯甲烷/乙酸乙酯混合液 (1:1, V/V) 萃取反应混合液 3 次, 目的是消除未反应完的硝基苯及其衍生物。保留水相。(此步保留萃取液上层, 下层液体含有硝基苯衍生物) 将水相用 6.0 mol/L 盐酸调 pH 值至 3-4 后 (加约 5 吸管), 充分摇匀。再次用 30.0 mL 二氯甲烷/乙酸乙酯混合液 (1:1, V/V) 萃取 3 次。此步保留萃取液下层。

5. 收集有机相, 旋蒸, 得到固体残渣。

6. 将残渣用 5.0 mL 色谱纯的甲醇重新溶解后经 0.22 μm 滤膜过滤, 取 20.0 μL 用 HPLC 检测。

木质素单体 HPLC 检测条件:

- (1) 柱子类型: universal C18 反相柱, 4.6 mm×250 mm。
- (2) 流动相: 甲醇/水/冰乙酸 (25:74:1, V/V/V)。
- (3) 流速: 1.1 mL/min
- (4) 检测波长: 280 nm。温度 28°C。
- (5) 进样量: 20.0 μL

其中, 内标浓度配置为 4 mg/mL (2.0 mol/L NaOH 配置)。裂解反应后, 根据样品含木质素情况加不同体积的内标, 通常是加 200 μL。混于样品中, 萃取、旋

蒸，最终用 5 mL 色谱甲醇溶解，因此上机时的内标浓度是 0.16 mg/mL。配标曲线时的内标浓度按 0.16 mg/mL 配置。

标准曲线配制：

- 1) 配置 200 mL 内标，即称 32.0 mg 乙基香兰素溶于 200 mL 色谱甲醇中(0.16 mg/mL)。
- 2) 标准曲线的 5 个浓度分别是 0、100、200、500、1000 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.2.7 次生壁厚度定量检测

采用激光扫描共聚焦显微获得电子成像图片，随机选取 60 个细胞备为一组数据，利用成像软件(ImageJ software)测量多组数据结果(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)^[63]，采用 SPSS 统计学软件进行生物学统计。

3.3 实验结果与分析

3.3.1 生物信息学分析

3.3.1.1 *PtoMYB156* 基因克隆及氨基酸序列分析

本实验以毛白杨芽尖为材料获得 RNA，以反转录得到的 cDNA 为模板，根据已发表的毛果杨 *PtrMYB156* 的全长序列设计特异性引物，RT-PCR 反应得到该基因的全长编码序列。测序显示扩增得到的片段大小为 810 bp（见图 2.3-2），预测其编码 269 个氨基酸。在 GeneBank（<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）和 phytozome（<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST>）中进行 Blast 同源性分析，以及 MEGA5.0 中的多重序列比对发现 *PtoMYB156* 和其他 R2R3MYB 型转录因子有较高同源性，且具有典型的 R2R2MYB 转录因子的特征：在保守的 N 端含有长度分别为 53 和 47 个氨基酸的 R2/R3 功能域，C 端区域为相对不保守的功能活跃区（图 3.3-1b）。在 *PtoMYB156* 的 C 端区域具有四个典型的 MYB 第四亚家族的蛋白结构元件(图 3.3-1a)：C1 元件，LlSrGIDPxT/SHRxI/L；C2 元件，pdLNLD/ELxiG/S；锌指结构元件，CX₁-2CX₇-12CX₂C；以及 C4 结构元件，FLGLX4-7V/LLD/GE/YR/SX1LEMK^[85, 170-172]。其中，C2 元件中包含一个 EAR (ethylene-responsive factor [ERF]-associated amphiphilic repression) 结构元件。EAR 元件有多重分化形式^[173]，*PtoMYB156* 属于较为常见的 LXLXL 类型。据先前的研究指出，C1 元件（也称为 GIDP 元件），具有激活活性^[174]，C2 结构域为起抑制功能的元件^[85, 159]，在柳枝稷 *PvMYB4* 结构域中 C4 元件也有转录抑制功能^[85]。该因子在体内究竟是一个转录激活子还是抑制子，还有待实验证明。

AmMYB308、*EjMYB2* 等能够负向调控植物次生壁合成转录因子在序列上高度同源，暗示着该因子在功能上可能也是保守的。

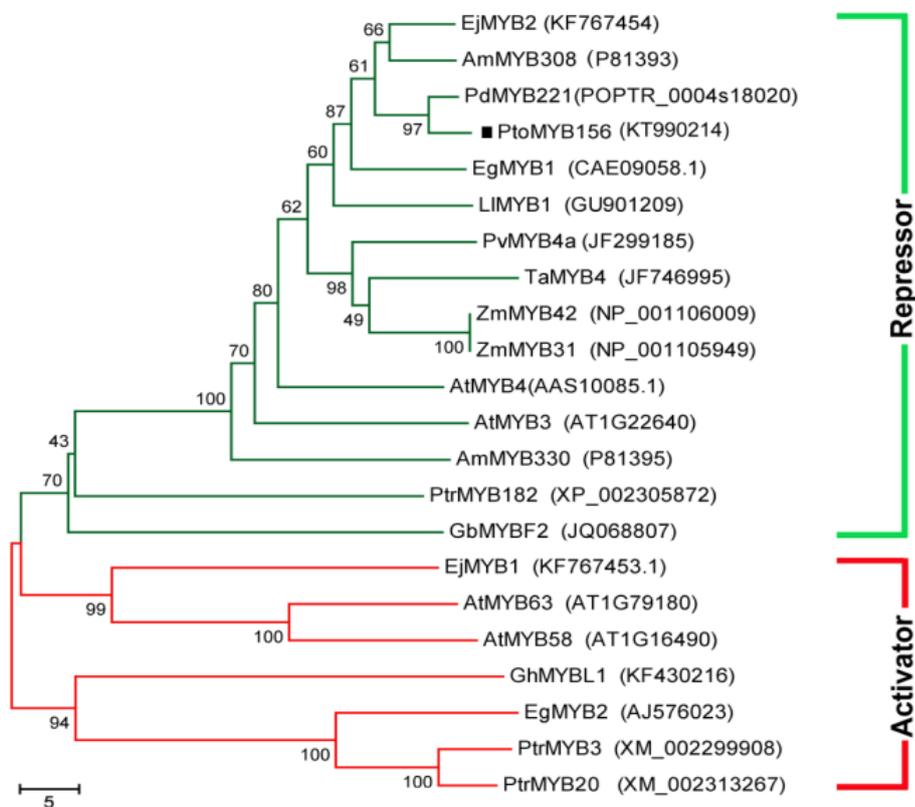


图 3.3-2 *PtoMYB156* 与其它不同物种中 R2R3MYB 类转录因子的进化树比对。

Figure 3.3-2 Phylogenetic relationship of *PtoMYB156* and other R2R3MYB transcription factors from different plant species.

3.3.2 *PtoMYB156* 表达模式分析

为了明确该基因在不同组织，及不同发育阶段的表达特性，我们根据 *PtrMYB156* 序列设计了该基因的上游启动子区段的特异性引物（见附表），以叶片 DNA 为模板，克隆得到了长为 1435 bp 的片段。接着，将该启动子连入 pCXGUS-P 载体，使之控制 *GUS* 报告基因的表达，并转化野生型拟南芥，得到经潮霉素抗性筛选的再生植株。采用 *Hpt* 引物鉴定转基因植株。

在拟南芥生长的多个时期，利用 X-gluc 组织化学染色观察报告基因的表达情况，发现幼苗阶段（生长第 15 d）的植株中，根、茎、真叶及子叶的主叶脉处都有蓝色显示。在拟南芥抽薹的茎中表皮和形成层区域 *GUS* 基因的表达分布明显。同时，在茎间互生的叶片中 *GUS* 也表达丰富。此外，还观察到在开花期蓝色较多的分布在萼片、花柱、及雄蕊中。这表明，*GUS* 报告基因在拟南芥的整个发育时期都有表达（图 3.3-3）。

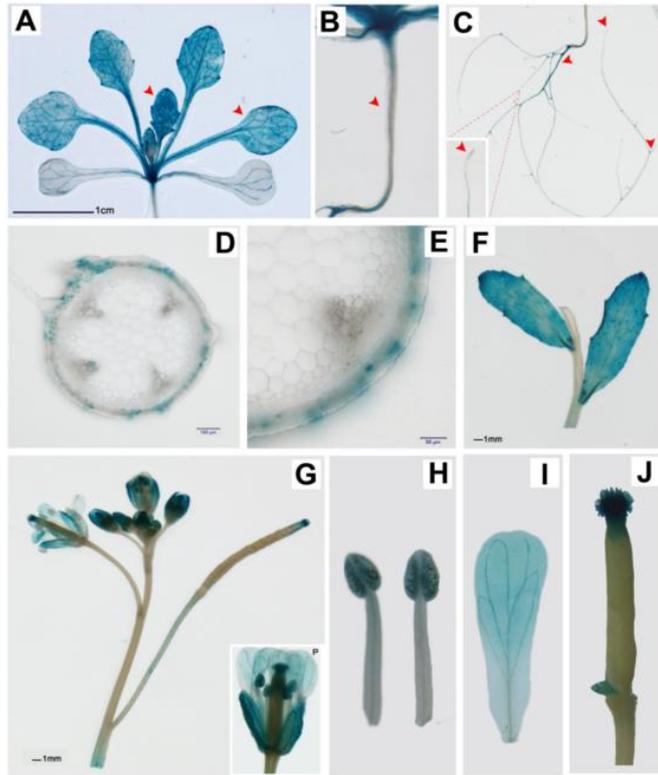


图 3.3-3 *PtoMYB156* 基因启动子的表达模式。注：长为 1435 bp 的启动子片段连接在 pCXGUS-P 载体中，转化拟南芥后观察不同时期报告基因的表达情况。

Figure 3.3-3. Promoter of *PtoMYB156* gene expression pattern. The 1435 bp promoter inserted upstream of the GUS sequence in the expression vector pCXGUS-P. Transgenic Arabidopsis plants were examined for GUS activity during different stages.

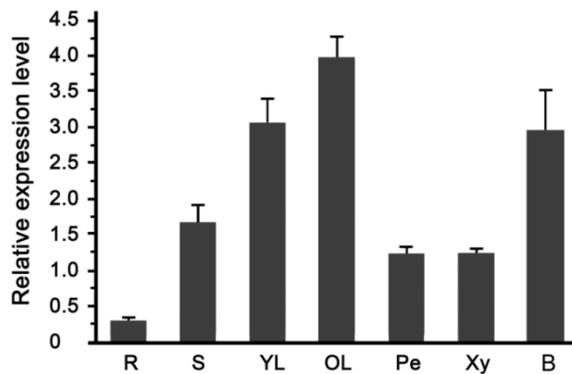


图 3.3-4 *PtoMYB156* 基因在杨树中的组织表达模式分析。

Figure 3.3-4 Expression patterns of *PtoMYB156* in different tissues of poplar.

为了检测 *PtoVNS11* 在各组织器官中的相对表达模式，通过分别提取杨树各组织和器官的 mRNA，并反转录成 cDNA，通过定量 PCR 检测 *PtoMYB156* 基因的表达。结果表明，毛白杨 *PtoMYB156* 基因在植株的根、茎、叶、叶柄、木质部和韧皮部中均有丰富的表达，且在叶片和韧皮组织中的表达高于其他组织（图

3.3-4)。结合在拟南芥中的启动子 *GUS* 表达检测结果，这预示着该基因很可能参与了植物生长发育的多个时期，并对茎中维管组织的发育起作用。

3.3.3 *PtoMYB156* 的亚细胞定位分析

转录因子调控基因表达的功能，需要在细胞核内完成。根据生物信息学分析，发现 *PtoMYB156* 在其氨基酸序列的 N 端具有核定位信号。我们构建了 *PtoMYB156* 和 GFP 的融合表达载体 *35S:PtoMYB156-GFP*，并转化烟草 BY-2 细胞。通过激光共聚焦显微镜观察，发现在细胞中 GFP 荧光信号的定位，与 DAPI 信号在位置上相互重合，表明融合蛋白特异的定位在细胞核内。见图 3.3-5A。由于 *PtoMYB156-GFP* 融合蛋白的分子量超过 50 kDa，理论上不能以自由扩散的方式入核。因此，该实验证明了植物细胞中 *PtoMYB156* 因子能主动定位于细胞核内表达。

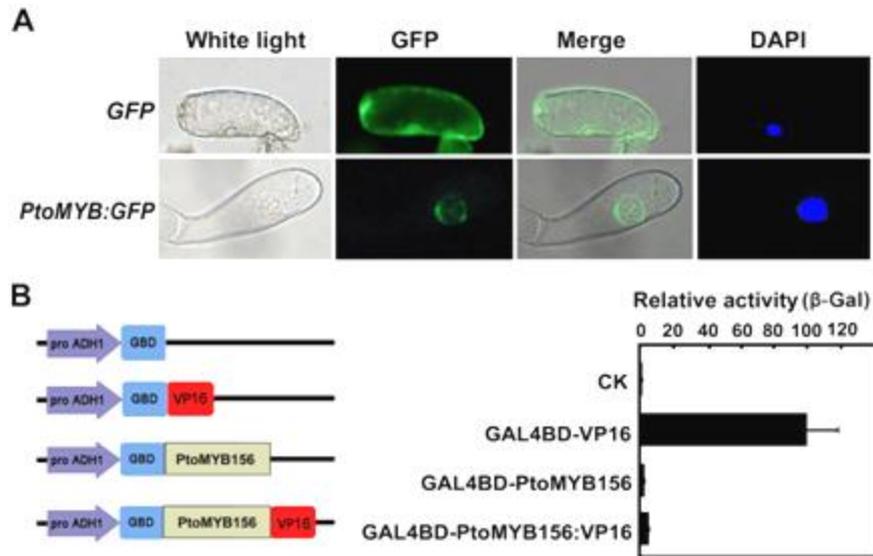


图 3.3-5 *PtoMYB156* 的亚细胞定位实验及转录激活活性实验。(A) *35S-PtoMYB156:GFP* 融合表达载体在烟草 BY-2 悬浮细胞中的瞬时表达。细胞核定位经过 DAPI 染色显示。(B) *PtoMYB156* 嵌合 VP16 转录激活序列后测试其转录激活活性实验。GBD, GAL4 DNA-binding 结构域; VP16, VP16 蛋白激活元件; GALBs, GAL4 蛋白结合位点。

Figure 3.3-5 Subcellular localization and transactivation assays of *PtoMYB156*. (A) Transient expression of *35S:PtoMYB156-GFP* fusion proteins in tobacco BY-2 cells. The position of nucleus was ensured by DAPI staining. A tobacco BY-2 cell expressing *PtoMYB156:GFP* or GFP alone shows its localization in the nucleus or in the cytoplasm, respectively. Fused GFP-protein highlight and bright-field images were compared. *35S-GFP* was used as control. (B) Transcriptional activation analysis of *PtoMYB156* analyzed by the chimeric reporter/effector assay in yeast. GBD, GAL4 DNA binding domain; VP16, activation motif of the VP16 protein; GALBs, GAL4 protein binding sites. Data represent mean of three biological repeats \pm SD. GAL4DB null vector was used as a negative control and GAL4BD fused with VP16 was used as a positive control.

3.3.4 *PtoMYB156* 的转录抑制活性验证

根据前面对 *PtoMYB156* C-端结构域氨基酸序列的分析,发现该序列上含有 EAR 元件,该元件可能影响转录因子的转录特性,一般被认为是转录抑制因子所特有的结构。为了进一步证实 *PtoMYB156* C 端结构域的抑制活性,我们构建了三个融合蛋白质粒,一个包括 Gal4 的 DNA 结合域和单纯疱疹病毒蛋白 (Herpes Simplex Virus Protein) VP16 的转录激活域(命名为 GAL4BD-VP16)^[175],另一个是 Gal4BD 和 *PtoMYB156* 的融合蛋白质粒 (GAL4BD-*PtoMYB156*),以及将 Gal4 和 *PtoMYB156* 及 VP16 共建的融合质粒 (GAL4BD-*PtoMYB156*:VP16)。其中 GAL4BD-VP16 和 C 端未连接片段的 GAL4BD 载体分别作为阳性对照和阴性对照。结果发现:阳性对照融合蛋白质粒能活化报告基因活性,在 SD/His⁻ (一缺),和 SD/-Trp, -His, -Ade (三缺)营养缺陷型培养基中正常生长,并且能酶解 X-gal 显示蓝色。但这种活性被 *PtoMYB156* 所抑制, GAL4BD-*PtoMYB156* 及 GAL4BD-*PtoMYB156*:VP16 在三缺培养基上不生长或生长极其缓慢,且检测 Laz 酶活性的检测和对照相比,活性显著下降了(见图 3.3-5B)。说明 *PtoMYB156* 是一个转录抑制因子。

3.3.5 超表达 *PtoMYB156* 的转基因杨树形态观察

生长约 4 个月的 *PtoMYB156* 超表达转基因杨树和野生型杨树相比,表型有明显的差异。OE-*PtoMYB156* 转基因杨树生长体积变小,植株顶端趋于弯曲倒伏,成熟叶(第 7 节间叶片)叶边缘卷曲呈杯状、叶色黄绿;地下部分的侧根系也较少(见图 3.3-6A)。选取两个超表达株系:L-3、L-4 进行定量分析结果显示,转基因株系在高度上比野生型下降 60%左右,直径下降了约 30%。同时茎的生物量也显著降低。结果见图 3.3-6B。以上结果表明,超表达 *PtoMYB156* 对杨树的生长起抑制作用。

研究表明,与 *PtoMYB156* 同属于 R2R3-MYB 转录因子第 4 亚家族的成员桉树 *EgMYB1* 超表达导致植株矮化、叶片向上蜷曲呈“杯状”(Cup-shaped leaves)^[67],并且 *EgMYB1* 是一个影响木质素沉积时空特异性的负调节因子,对次生壁形成过程有精细的调节功能。从上述试验观察结果来看,*PtoMYB156* 的超表达在杨树中显现的一系列表型特征:抑制杨树的正常生长,导致植株株高降低、叶形发生改变等不仅与 *EgMYB1* 功能类似,并且这与 *PtoMYB156* 基因的组成型表达模式是相吻合的(图 3.3-3, 3.3-4),暗示该转录因子在杨树的生长发育中起关键的负调控作用,并且极有可能参与了植株的维管组织发育过程。

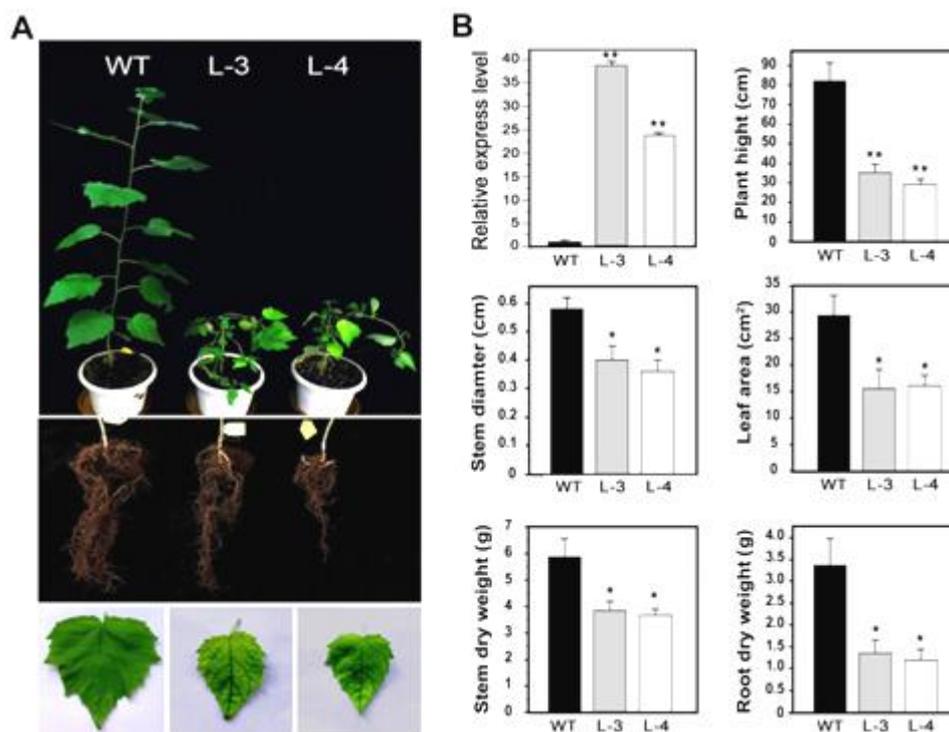


图 3.3-6 超表达 *PtoMYB156* 和野生型杨树生长表型对照。A、超表达 *PtoMYB156* 转基因杨树和 WT 植株表型，第七片叶，植株根部照片放大图；B、超表达 *PtoMYB156* 引起植株生长滞后。对生长 4 个月的杨树株高，茎生物量及茎直径检测结果统计。

Figure 3.3-6 Phenotype of overexpressing (OE)-*PtoMYB156* transgenic poplar compared with WT. A. WT and OE-*PtoMYB156* poplar plants after 4-month growth in greenhouse. Leaf sizes at 7 leaf plastochron index (LPI)^[176] and root sizes, photos detail of cup-shaped leaves of *PtoMYB156* transgenic poplar plants. B. Overexpressing *PtoMYB156* caused retarded growth in transgenic plants. Plant heights, biomass of stem and root and stem diameters of basal parts of 4-month-old plants grown in the greenhouse. Results are presented as means and standard deviations (n=10). Single asterisk, double asterisk indicate significant differences in comparison with WT at $P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively (Student's *t* test).

3.3.6 超表达 *PtoMYB156* 杨树的木质素含量测定

与野生型相比，超表达 *PtoMYB156* 的转基因杨树的生物量明显下降(图 3.3-6)。而植物的木质部具有提供植物机械支撑、水和无机养分运输的重要职能^[177]，是植物生物量组成的重要组分，G/S 木质素单体组分比值也是决定木本植物材性的重要参数。因此，我们将生长约 4-5 月的野生型及转基因 *PtoMYB156* 毛白杨株系的茎秆部位第 4 节间以下的部分进行了 Klason 木质素总量及单体含量的测定。如表 3，和野生型对照相比，L-3 及 L-4 株系的转基因总木质素含量均显著减少，最高降低了约 14.3%；而经过 HPLC 检测的 G/H/S 三种木质素单体含量几乎没有变化(表 1)。

表 1 利用高相液相色谱法测定野生型和转基因杨树中 S/G/H 单体木质素的组分比例, 及总单体量比率

Table 1. Syringyl, guaiacyl, and p-hydroxy phenyl monomer composition, and total monomer yield of WT and *PtoMYB156*-transformed poplar (% dry matter), as determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Each data point is the mean \pm SE of three replicates. * indicate significant differences (*t* test at $P < 0.05$) when compared with the wild type (n = 3).

Sample	Klason lignin (mg/g)	H %	G %	S %	S/G
WT	245 \pm 8.7	0.24 \pm 0.02	42.32 \pm 2.33	57.44 \pm 2.71	1.36 \pm 0.01
L-3	203.4 \pm 9.8*	0.84 \pm 0.10	46.58 \pm 3.60	52.59 \pm 1.97	1.10 \pm 0.04
L-4	211.9 \pm 10.1*	0.85 \pm 0.09	42.34 \pm 2.88	56.81 \pm 4.20	1.35 \pm 0.01

3.3.7 超表达 *PtoMYB156* 杨树的木质部细胞显微结构观察

将野生型和超表达株系 L-3, L-4 茎徒手切片后, 对木质部细胞进行了激光扫描共焦显微观察, 并通过统计数据的对比分析得知, 超表达株系 (L3, L4) 中的木质部、韧皮部细胞管径面积减小, 木质部和韧皮部组织相对于茎横切面积比例也有不同程度的降低, 且韧皮部组织的缩小相较于野生型有显著性差异(见表 2)。更值得注意的是, 木质部的导管、木纤维分子细胞壁的厚度相较于野生型分别降低了 13%, 28%。见表 3。

表 2 转基因和野生型杨树的解剖学特征

Table 2 Anatomical properties of wild-type and transgenic poplar. Data are means \pm SE. * indicate significant differences (*t* test at $P < 0.05$) when compared with the wild type .

Line	Area of Xv (μm^2)	Area of Xf (μm^2)	Area of X (μm^2)	Ratio of X area/STS	Area of P (μm^2)	Ratio of P area/STS
WT	1248.92 \pm 89.02	298.72 \pm 22.70	61412.10 \pm 7014.53	31.94 \pm 2.23%	3778.50 \pm 12.22	5.17 \pm 0.76%
L-3	1189.59 \pm 40.48	247.18 \pm 18.86	54396.65 \pm 236.70	26.55 \pm 4.65%	2306.21 \pm 15.28*	4.23 \pm 0.01%
L-4	1200.29 \pm 55.21	254.20 \pm 21.10	52276.30 \pm 118.30	27.34 \pm 5.37%	2128.32 \pm 17.36*	3.99 \pm 0.86%

Xv, xylem vessel cell; Xf, xylem fiber; X, xylem; STS, stem transverse section area; P, phloem.

表 3 转基因和野生杨树中木质部次生壁厚度检测

Table 3. Measurements of secondary cell wall thickness in the xylem of wild type and transgenic poplar. Data are means \pm SE.

Sample	Xylem vessel/ μm	Xylem fiber/ μm
WT	3.78 \pm 0.618	4.18 \pm 0.50
L-3	3.2 \pm 0.73	3.53 \pm 0.42
L-4	3.53 \pm 0.89	2.93 \pm 0.69

同时，取生长同一时期的杨树第4节间叶片，在UV激发的荧光显影条件下对木质素的沉积情况进行观察，发现转基因 *Pro35S:PtoVNS11* 杨树叶脉和茎中木质素含量明显低于对照（图 3.3-7A, D, C, F）。将野生型和转基因植株茎制作石蜡切片，并以0.01%的卡弗卢（Calcofluor White）染色示踪纤维素含量，显示木质部中纤维素分布也低于野生型杨树。HCl-间苯三酚及甲苯胺蓝对木质部细胞的特异显色也表现出，转基因杨树中的木质部细胞层数减少，发育相对野生型滞后的特征（见图 3.3-7G, H, K, L）。表明 *PtoMYB156* 对杨树的次生生长起到了抑制作用。

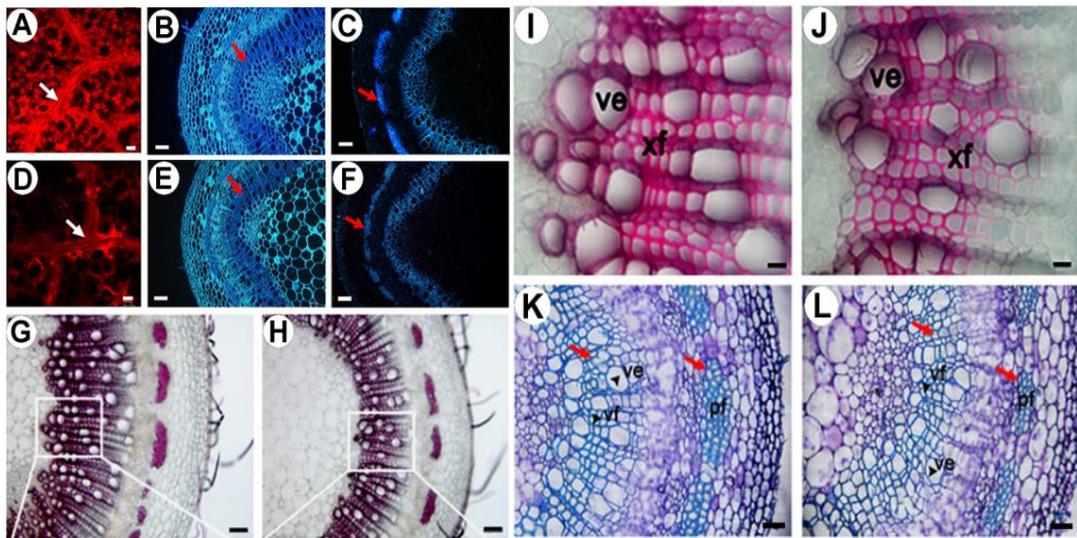


图 3.3-7 OE-*PtoMYB156* 和野生型对照杨树茎秆切片显微观察。A, D 和 C, F 为杨树叶脉或茎横切面木质素荧光自显影。B, E 为卡弗卢（Calcofluor White）染色，观察茎中纤维素含量；I, J, G, H 为间苯三酚染液示踪茎中木质素沉积情况，野生型(I, G)，转基因型 (J, H)。K (WT) 和 L(OE-*PtoMYB156*) 为茎横切片的甲苯胺蓝显示结果图。Xf, 木质纤维；Ve, 导管。

Fig. 3.3-7 Microscopic analyses of stems from control and OE-*PtoMYB156* poplar plants. Lignin auto-fluorescence (A, D, C, F) images of a wild-type leaf (A) or stem (C) shown the less lignified secondary wall thickening in veins (ve) or cross-sections. Secondary wall cellulose staining observation by incubating sections with Calcofluor White (B, WT; E, OE). (G–J) General view of stem vascular tissues stained by phloroglucinol-HCl in transverse sections of stem. (K, L) General view of stem vascular tissues stained by Toluidine blue-O in stem transverse sections of WT (K) and OE-*PtoMYB156* (L) plants. Xf, xylary fiber; Ve, vessel; Scale Bars: 100 μm in B, C, E, F, G, H; 50 μm in K, L; 20 μm in A, D, I, J.

3.3.8 *Pro35S:PtoMYB156* 转基因杨树的基因表达检测

许多研究表明，MYB 转录因子对植物次生壁的发育，木材的形成发挥了重要的调控作用。我们接下来通过 qRT-PCR 方法，检测了与次生壁中纤维素、木质

素和木聚糖合成相关酶的编码基因在 *PtoMYB156* 超量表达植株中的表达水平(图 3.3-8)。结果显示,在超表达植株中木质素合成关键酶基因 *F5H*、*CCoAOMT*、*C4H*^[178, 179], 纤维素合成酶基因 *CesA17*、*CesA18*, 及木聚糖合成基因 *GT43B*^[180] 的表达均显著降低。这说明 *PtoMYB156* 负调控植物次生壁合成,影响了植物细胞次生壁加厚,导致总木质素含量降低(表格 3.5-Table 3)。值得引起注意的是,在木质素单体合成途径中,*F5H* 及 *CCoAOMT* 是调控三种单体 G/H/S 的重要决定因子,然而,我们发现超表达植株中 *F5H*、*CCoAOMT* 基因的表达水平的显著降低,但没有引起木质素单体成分或 G/S 比例发生明显的变化(见表 3),这可能是由于木质素合成网络存在多级反馈调节的原因导致。

Zhong 等人在早先的研究结果证明, NAC 及 MYB 两大家族的转录因子成员在调控拟南芥及杨树的木质素合成过程起到了重要的转录调控作用^[79]。NAC 是影响次生壁合成的上游“开关”; MYB 转录因子往往处在下游的位置,参与调控次生壁的生物合成。当超表达与拟南芥中 *SND1/NST1* 同源关系最相近的 *PtoVNS11* 时,引起杨树中木质素特异途径中关键酶基因表达水平显著上升,而在 *OE-PtoMYB156* 株系中的这些基因呈现下调趋势。因此,我们进一步断定 *PtoMYB156* 在植物次生壁发育过程中起到了负调节的作用。

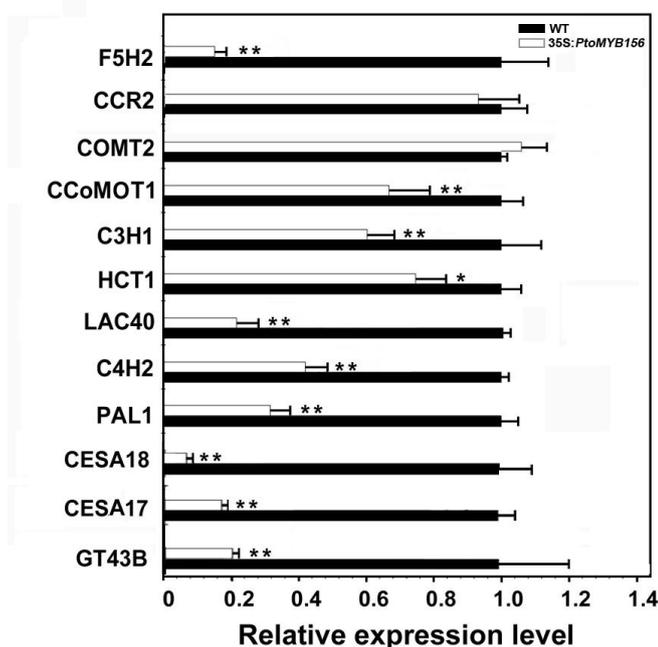


图 3.3-8 在 *PtoMYB156* 超表达及野生型植株中检测次生壁合成相关基因的表达情况

Fig.3.3-8 Gene expression analysis of several genes associated with secondary wall biosynthesis of wild-type and *PtoMYB156* overexpression plants.

3.3.9 *PtoMYB156* 可以通过结合结构基因启动子影响该基因的表达

为了验证 *PtoMYB156* 对次生壁合成关键酶基因启动子上 MYB 识别序列的结合, 我们通过农杆菌注射的方式将 *PtoMYB156* 表达载体及 *CesA17*、*C4H*、*GT43B* 基因启动子融合 GUS 报告基因的载体共转化烟草叶片, 并将带有空质粒的表达载体及相应的报告载体共转化作为对照。结果显示, 共表达 *PtoMYB156* 能引起连有 *PtoCesA17*、*PtoC4H2*、*PtoGT43B* 启动子控制的 GUS 活性显著性降低 ($P < 0.05$)。见图 3.3-9。说明在植物细胞内, *PtoMYB156* 能够直接结合 *PtrCesA17*、*PtrC4H2* 及 *PtrGT43* 的启动子, 并抑制它们的表达。暗示 *PtrMYB156* 作为负调控因子, 能识别这些次生壁合成相关关键酶基因的启动子元件, 抑制基因表达从而降低该酶的含量, 进而影响到木质素、纤维素及木聚糖的合成。

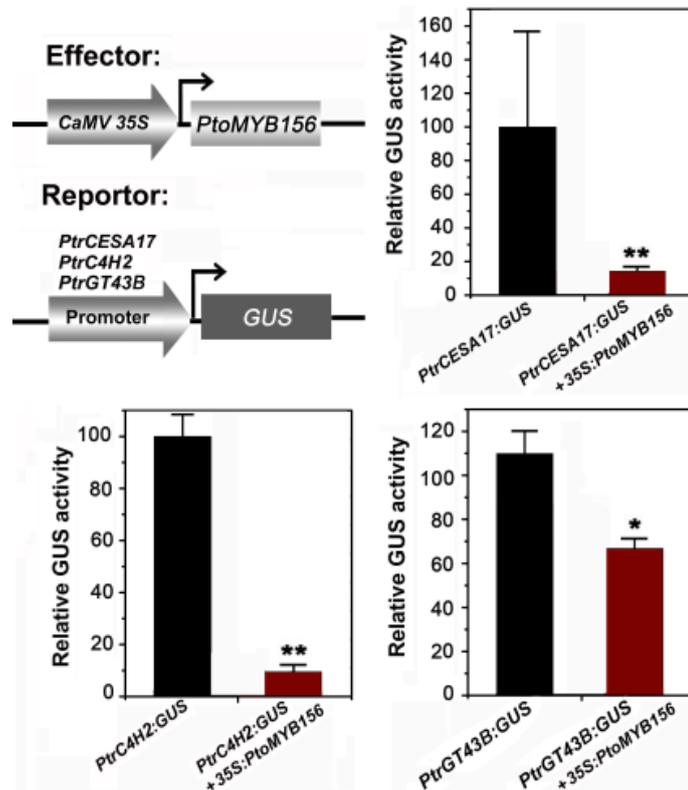


图 3.3-9 *PtoMYB156* 可以通过结合结构基因启动子抑制报告基因的表达

Fig. 3.3-9 Repression of the secondary cell wall biosynthetic gene promoters by *PtoMYB156*.

A, Diagrams of the effector and reporter constructs used for transcription activity analysis. B, Transcription activity analysis showing that *PtoMYB156* represses the promoter-driven expression (*C4H2*, *CESA17*, and *GT43B*) of the GUS reporter gene. The GUS expression in tobacco leaf transfected with no effector was used as a control and was set to 1.

Error bars represent \pm SD of three biological replicates. (Statistical significance, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

3.3.10 *PtoMYB156* 基因敲除杨树的木质素测定

CRISPR/Cas9 技术是一种被广泛应用于酵母、细菌及动物基因组编辑的新兴技术手段^[181]。作者所在实验室利用华南农业大学刘耀光老师实验室改良的 CRISPR/Cas9 多靶点载体系统，已在杨树中实现了对内源八氢番茄红素脱氢酶 (Phytoene dehydrogenase, *PDS*) 基因定点敲除^[164, 182]。为了进一步研究 *PtoMYB156* 在杨树中的功能，我们利用该技术敲除了毛白杨内源的 *PtoMYB156* 基因，获得了 *PtoMYB156* 功能缺失的杨树株系。

3.3.10.1 筛选敲除突变体

通过提取野生型和转入 CRISPR/Cas9-*PtoMYB156* 敲除系统的杨树基因组 DNA，以此为模板设计引物，对内源的 *PtoMYB156* 片段进行扩增后，电泳显示结果如图 3.3-10。不含 DNA 模板的空白组 (CK-) 是 PCR 扩增的阴性对照；WT 是以野生型 DNA 为模板的对照组；多个株系如 L-5, L-7 等 (见图 3.3-10A) 是以转基因植株 DNA 为模板的实验组。从电泳结果上可以看到，L-5 及 L-7 为代表的泳道出现了大小明显不同的条带，证明内源 *PtoMYB156* 基因组序列发生改变。

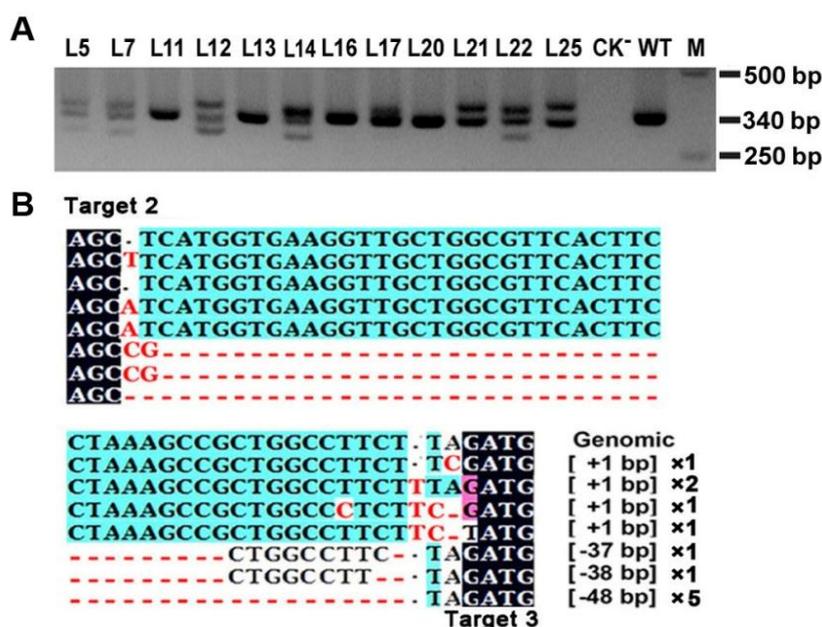


图 3.3-10 筛选杨树敲除突变体。(A) PCR 扩增转基因突变体杨树 DNA 实验。(B) 根据电泳条带大小克隆至中间载体并测序验证 CRISPR/Cas9 敲除 *PtoMYB156* 基因成功的序列。WT: 野生杨树; 5~25: 转基因杨树植株; M: Marker DL2000

Figure 3.3-10 Screening for CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of poplar. (A) DNA samples from independent transgenic poplar were analyzed for mutations by PCR assays. (B) The PCR products from poplar plant were separated by their size and cloned and sequenced to validate the deletion directed by CRISPR/Cas9 in the *PtoMYB156* gene. WT: Wild type poplar; 5~25: Transgenic poplar; M: Marker DL2000.

将 L-5、L-7 泳道的片段切胶回收，连接 pMD19-T 转化大肠杆菌，挑取单菌落测序。将测序结果与野生型内源 *PtoMYB156* 基因参考序列进行比对，发现 L-5、L-7 的扩增片段中出现了序列缺失或位点突变的情况，代表这两个株系基因组上内源的 *PtoMYB156* 基因发生了突变。见图 3.3-10B。具体分析发生改变的序列，其中既有大片段的缺失（37~48 bp）也有单个碱基插入突变的情况。在 L-7 株系测序结果的统计中，突变的概率达到了 58%。

3.3.10.2 对敲除突变体组织切片染色结果分析

将野生型和 *PtoMYB156* 敲除突变体杨树茎进行徒手切片，选取合适的样本进行 HCl-间苯三酚染色，放在显微镜下观察。发现和野生型杨树相比，突变体杨树的木质部导管和纤维细胞次生壁更厚，且在韧皮部和木质部中间的形成层区域内出现了明显的木质素异位沉积现象（图 3.3-11）。据此结果，我们推测 *PtoMYB156* 负调控杨树次生壁的发生过程。当 *PtoMYB156* 基因敲除后，该基因的抑制功能被解除，使得木质素合成途径的多个关键酶基因上调，木质素合成沉积加剧，呈现次生壁加厚的表型特征。

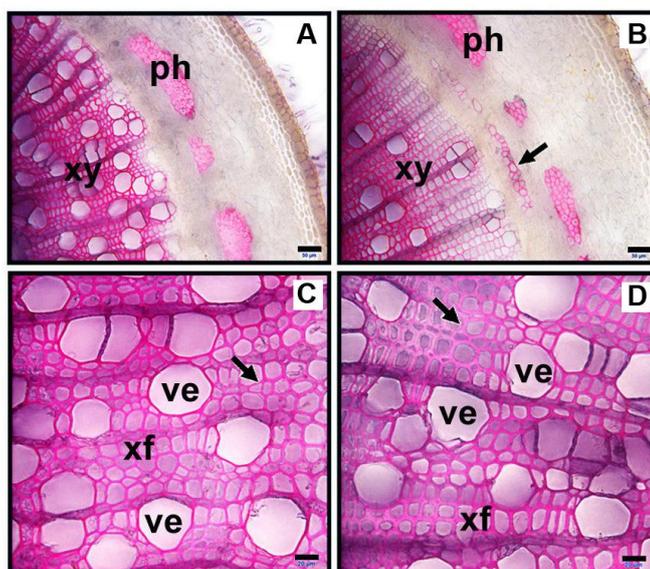


图 3.3-11 野生型 (WT) 及 CRISPR/Cas9-*PtoMYB156* 突变体杨树的茎切片显微分析

Figure 3.3-11 Microscopic analyses of stems section from WT(A, C) and CRISPR/Cas9-*PtoMYB156*(B, D) poplar plants.

3.3.10.3 对敲除突变体植株进行 QRT-PCR 分析

为了进一步确定 *PtoMYB156* 基因与次生壁生物合成途径中参与作用的结构基因的调控关系，我们接下来对这些关键酶基因进行了定量分析（图 3.3-12）。通过荧光定量 PCR 检测结果发现，*PtoMYB156* 突变体杨树中与次生壁合成相关的 *CAD*、*CCR*、*GT43B*、*CESA2B* 等基因的表达量明显升高，跟 *PtoMYB156* 超表

达植株中检测情况相反，符合该因子作为次生壁合成抑制性转录因子的功能。上述结果证明 *PtoMYB156* 能参与对苯丙氨酸代谢途径的调节，并影响了植物细胞次生壁的合成。

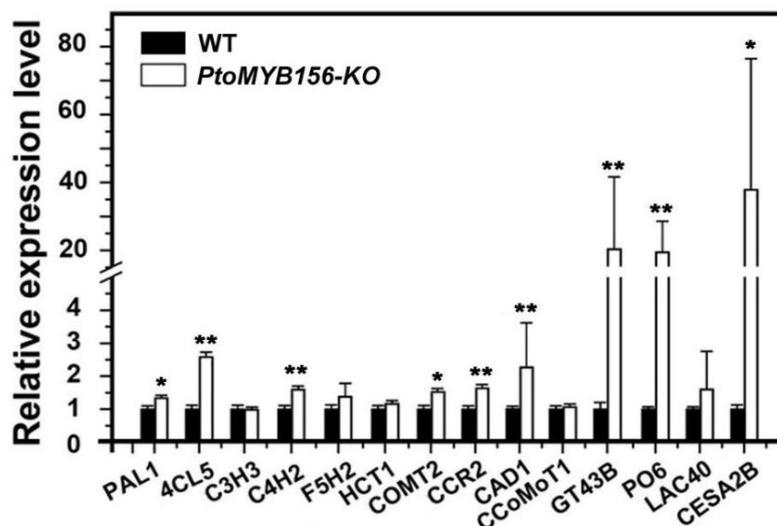


图 3.3-12 QRT-PCR 检测 WT 和 CRISPR/Cas9-*PtoMYB156* 杨树中次生壁合成途径中关键酶基因的表达水平

Figure 3.3-12 QRT-PCR analysis of genes associated with secondary wall biosynthesis of wild-type and CRISPR/Cas9-*PtoMYB156* transgenic plants.

3.4 小结与讨论

迄今为止，在木本植物中已有功能报道的 MYB 转录因子多集中在杨树^[78, 103, 183]、松树^[184]、桉树^[67, 80]中。此前的研究发现，当 *PtrMYB152*、*PtMYB1* 和 *EgMYB2* 在拟南芥或烟草中异源表达时，能引起木质素在次生细胞壁的异位沉积，暗示这些转录因子参与了木材形成期间木质素合成的调控。为了验证 *PtoMYB156* 转录因子在木质素合成途径中的调控功能，我们在拟南芥和杨树中分析了 *PtoMYB156* 编码基因的组织表达特异性；在烟草细胞和酵母中验证了其亚细胞定位和转录活性；在 *PtoMYB156* 超表达或敲除突变体杨树中研究了该因子的生物学功能，检测了它对次生壁组分木质素、纤维素、木聚糖合成相关结构基因表达水平的影响；通过瞬时表达验证了该因子对其直接靶基因启动子的结合和调控方式。

我们的结果表明，*PtoMYB156* 基因在根、茎等多个器官中都有较高表达，尤其在叶片中含量最为丰富，在拟南芥的花器官中也有表达。在杨树中超表达 *PtoMYB156*，引起植株倒伏、叶片皱缩上卷等表型；导致叶脉维管束次生壁上沉积的木质素含量下降，总木质素含量降低了约 14.3%；同时抑制了 *PAL*，*C4H*，*LAC40*，*CesA17*，*GT43B* 基因的表达水平。而敲除内源 *PtoMYB156* 则促进了次生壁的形成和木质部细胞中木质素的沉积；导致 *PAL*，*GT43B*，*LAC40* 的表达显

著上升。此外，*PtoMYB156* 转录因子可以结合 *CESA17*、*C4H2* 及 *GT43B* 的启动子上的关键元件，并抑制上述启动子的活性。综上所述，*PtoMYB156* 转录因子对次生壁发育的负调控功能很可能是通过下调次生壁发育相关的结构基因的表达来实现的。

这一系列研究结果不仅首次证明了 *PtoMYB156* 是杨树中位于上游开关基因 *PtrVNSs* 和下游相关酶基因之间，调控次生壁合成的因子。同时，也启示我们：尽管经历了一亿多年的生物演化历程，拟南芥和杨树的维管组织次生细胞壁的生物合成调控机制依然存在相当的保守性。

第四章 PtoMYB156 在影响拟南芥的抗 UV-B 辐射适应性方面的功能研究

4.1 前言

光合作用是高等植物适应生存环境，完成生长发育的重要条件。因此，阳光成为了给植物供给能源及影响它们整个生活周期的不可或缺的环境因子。经过臭氧的过滤，大气层上方一部分超过 290 nm 的光波能到达地球表面，然而并非所有对生物不利的光波都能被过滤，例如波长范围为 280 nm~315 nm 的 UV-B 光线有少部分到达地面。研究证明，UV-B 能破坏 DNA 结构、抑制光合作用、干扰正常细胞的分化过程^[185]。为了适应不同波长的光波辐射，高等植物进化出了能耐受紫外线伤害和损伤修复的机制。

早在 1978 年，由 Biggs 等人在对包括花生、棉花、大麦等 70 多种农作物进行 UV-B 辐射处理的实验，得知不同的植物品种对 UV-B 辐射的抗性差别明显^[186]。Teramura 认为，UV-B 辐射主要影响植物的营养生长和种子的产量，尤其是光合作用场所最为集中的叶片部分^[187]，超过 60% 的作物叶面积明显减少。随着研究的深入，人们了解到植物有多种适应 UV-B 辐射的适应方式：在形态上，植物通过缩小叶面积，矮化高度及改变根冠比等来适应 UV-B 辐射；在生殖系统中，植物可以通过改变繁殖策略，增加分蘖数等来适应一定范围内的 UV-B 辐射；在植物次生代谢过程中，酚类和萜萜类化合物能降低紫外线穿透植物叶表皮的能力，从而增强防御能力；再者，UV-B 辐射下植物细胞会启动响应 DNA 损伤的修复机制^[188]。因此，UV-B 辐射不单单只是一种环境胁迫因子，更是一种植物光信号传导的调节因子。当受到 UV-B 辐射生长胁迫时，受光调控的转录因子通过与结构基因启动子结合，共同响应光信号，调节结构基因的表达。在生理生化层面上会直接表现出，调节合成紫外吸收物质的含量，以应答 UV-B 辐射的过程^[189]。为了研究某些类黄酮化合物对 UV-B 辐射方面的作用，研究人员将突变型拟南芥暴露在 UV-B 光照中，对这些黄酮化合物进行功能分析，证实它们是植物中最重要的 UV-B 保护性成分^[190]。1993 年，Li 等人报道黄酮醇合成关键基因的缺失突变体 *tt4* (CHS, chalcone synthase)，*tt5* (CHI, chalcone isomerase) 对 UV-B 辐射有着极高敏感度。因此，CHS 基因的表达被视为检测植物适应 UV-B 光胁迫环境下的标记之一^[191, 192]。在 *myb4* 敲除突变体的功能研究中发现，MYB4 基因能负调控 C4H，由此降低了植株对 UV-B 光照的耐受性^[159]。

在上一章对 PtoMYB156 和拟南芥中的 MYB4 的序列结构分析得知，两者具有较高同源性。PtoMYB156 在编码区的特征、蛋白抑制域结构特征，以及预测蛋白的 C 端基序上，与 AtMYB4 非常相似。且是属于同一进化分支的 R2R3 类第 4

亚家族的转录因子，因此推断 PtoMYB156 以负调控因子的形式参与了调控苯丙烷代谢途径中的类黄酮次生化化合物的合成。在本章内容中，我们即围绕 PtoMYB156 对于类黄酮化合物的合成和影响和调控机理展开了研究。

4.2 实验材料与仪器

4.2.1 植物材料

本实验所用的毛白杨 (*P. tomentosa* Carr.) 为本实验室 (西南大学资源植物研究所) 温室长期栽培保存品种，用于遗传转化；拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* Columbia) 为本实验室保存品种，用于遗传转化。

4.2.2 主要试剂和药品

参见第二章 2.1.3。

4.2.3 实验仪器

同第二章 2.1.4。

4.3 实验方法

4.3.1 转基因杨树叶片中缩合单宁含量和组分的测定

采用分光光度计法进行杨树总可溶性缩合单宁含量的测定，方法如下：

- 1) 取 0.5 g 转基因毛白杨相同生长时期的叶片，液氮速冻研磨；
- 2) 加入 5 mL 提取液(丙酮为 70%，V/V=7:3,含有 0.1% [W/V]的抗坏血酸)，超声处理 1 h,室温黑暗提取 24 h;
- 3) 10000 r/ min 离心 10 min 取上清于另一洁净离心管中，在上清中加入 NaCl 使水相和丙酮分层，吸取丙酮相，弃水相；
- 4) 重复 2，3 步；
- 5) 将提取液冷冻干燥，用 2 mL 甲醇(含有 0.1% [W/V]的抗坏血酸)溶解，过滤保存；
- 6) 在洁净试管中加入洁净 0.5 mL 最终提取液,3 mL 香草酸(质量分数为 3%，甲醇溶)，1.5 mL 浓盐酸反应 15 min，反应中试管用锡箔纸包紧；
- 7) 测定反应液在 550 nm 下的吸光度，对照标准曲线计算出可溶性缩合单宁含量。

4.3.2 花青素含量的测定

采用盐酸-甲醇法提取花青素,方法如下^[193]：

- 1) 取 0.5 g 材料液氮研磨；

- 2) 加入 5 mL 酸化的甲醇（60% V/V 甲醇含有 0.1% w/V 抗坏血酸），超声处理 1 h;
- 3) 120 r/min，黑暗条件下摇床震荡 24 h;
- 4) 2500 r/min，离心 10 min，2 次;
- 5) 取 1 mL 上清与 1 mL 水混合，然后加入 1 mL 氯仿移去叶绿素后，测定反应液在 530 nm 处的吸收值;
- 6) 根据矢车菊素建立的标准曲线算出花青素含量。

4.3.3 总酚含量的测定

总酚含量以修饰过后的福林酚比色法进行^[194]。

- 1) 新鲜的叶片组织 100 mg 在 1 mL 的 80% 甲醇中提取，4° 避光孵育 2 h;
- 2) 离心去沉淀。取上清，移入加有 3 mL 蒸馏水离心管中;
- 3) 取 0.5 mL 福林酚试剂（1:1 混水），及加入 2 mL Na₂CO₃（20%）;
- 4) 溶液在 45°C 水浴反应 15 min;
- 5) 取出冷却至室温，检测 650 nm 处的吸光值。

总酚标准曲线以没食子酸为标准建立，根据标准曲线算出总酚含量。

4.3.4 拟南芥黄酮苷（山奈酚和槲皮素）含量的测定

采用高效液相色谱法（HPLC）法进行拟南芥种子中山奈酚和槲皮素含量的测定^[195]，实际方法如下：

- 1) 将种子铺于 1/2MS 培养基上，生长 14 d 后，取材;
- 2) 液氮研磨，每 0.1 g 鲜重加 1000 μL 冷的丙酮及研磨珠，在低温组织研磨机中以 65 HZ，60 s 条件下粉碎;
- 3) 离心样品，超声降解 2 min，12000 rpm 离心 10 min;
- 4) 取上清，加入等体积的 2M 盐酸，70°C 水浴 40 min;
- 5) 加入等体积的乙酸乙酯，漩涡振荡，12000 rpm 离心 10 min;
- 6) 取上层有机相，40°C 冷冻真空离心干燥，用 2 mL 甲醇重悬备 HPLC 的测定;
- 7) 360 nm 处检测山奈酚（Kaempferol）和槲皮素（Quercetin）。

4.3.5 拟南芥种子中可溶性缩合单宁表儿茶素含量的测定（HPLC）

单宁提取：

- 1) 取 0.5 g 成熟的拟南芥种子，液氮研磨成粉末;
- 2) 加入 5 mL 提取液（70% V/V 丙酮中含有 0.1% W/V 抗坏血酸）;
- 3) 黑暗条件下摇晃 24 h;

- 4) 加入 NaCl 使水相与丙酮分离, 有机相保留水相再用饱和 NaCl 的丙酮萃取;
- 5) 合并两次有机相真空干燥;
- 6) 固体再用 750 μL 60% 的甲醇 (含有 0.1% 抗坏血酸) 溶解, 12000 g 离心 10 min;
- 7) 取上清黑暗冷冻保存。

HPLC 上机检测条件参考文献^[196]。

4.3.6 拟南芥种子 DMACA 染色

取生长成熟的种子, 用 30% 的乙酸(V/V, 乙酸/甲醇)脱色处理 12 h 后, 用 75% 的乙醇冲洗三次, 用 DMACA 染液染色 1 min, 在显微镜下观察着色情况并拍照。

4.3.7 UV-B 辐射处理

4.3.7.1 拟南芥幼苗时期的 UV-B 辐射处理

参照 Ryan 等 UV-B 辐射处理方法^[197]。UV-B 辐射处理的拟南芥幼苗 (生长 2 周, 4 片真叶), 施以 UV-B 辐射, 辐射强度 $40 \mu\text{w} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。连续处理 7 h 后, 每个样品至少 3 个重复。UV-B 处理完成后观察表型。

4.3.7.2 成苗时期转基因 *ProPtoMYB156::GUS* 拟南芥 UV-B 辐射处理

对于生长 20 d 左右的拟南芥, 挑取长出 4-5 对真叶、生长良好的实验组。取生长时期一致的拟南芥叶片, 部分对其遮光处理, 部分使其暴露于 UV-B 辐射条件下 4-5 h。

4.3.7.3 对杨树叶片中不同时间点 UV-B 处理

取生长时期相同, 长势旺盛的约 3 月大的野生型杨树, 施以 UV-B 辐射, 辐射强度 $40 \mu\text{w} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。连续处理 48 h 并在不同时间段取叶片, 提取 RNA 后于液氮中速冻。后续每个样品 3 个重复。UV-B 处理 48 h 完成后统一将冻存的 RNA 反转为 cDNA, 准备后续的 RT-PCR 反应。

4.3.8 在拟南芥中超表达 *PtoMYB156* 基因

方法参见第二章 2.2.2 内容

4.3.9 烟草瞬时共表达实验

参见第二章实验方法 2.2.6

4.4 实验结果与分析

4.4.1 杨树内源 *PtoMYB156* 的表达响应 UV-B 辐射

为了研究 *PtoMYB156* 在不同辐照时间内 (0~48 h) 对 UV-B 的表达情况, 我们对生长 3 个月左右的野生型杨树进行了 0、6、12、24、36、48 h 六个时间的 UV-B 辐射实验。

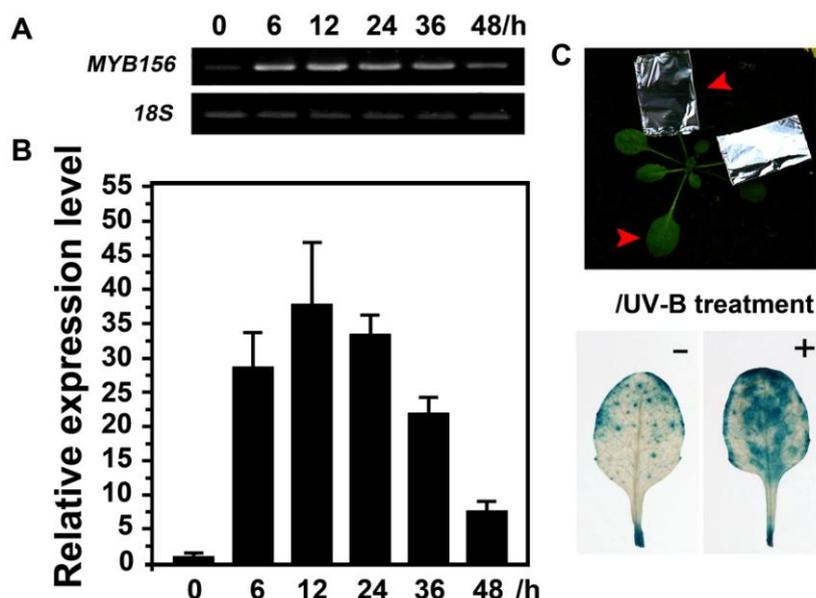


图 4.3-1 *PtoMYB156* 基因及启动子响应 UV-B 辐射后表达情况的分析

Figure 4.3-1 Analysis of *PtoMYB156* gene and promoter expression in poplar or Arabidopsis leaves after exposure to UV-B light.

将不同时长 UV-B 处理后的杨树叶片, 分别提取 RNA 后反转录合成 cDNA, 半定量检测 *PtoMYB156* 的转录水平。如图 4.3.1 所示, *PtoMYB156* 的表达量随着 UV-B 辐射处理时间的增加而逐渐增高, 在 12 h 达到峰值, 此后在 48 h 的时间范围内, 表达水平又逐渐降低。同时, 克隆 *PtoMYB156* 基因的启动子片段, 融合 GUS 蛋白后在拟南芥中表达; 发现 UV-B 辐射处理后, 莲座叶中 GUS 染色相较于对照更深一些 (图 4.3-1 B)。这些结果说明 *PtoMYB156* 参与了植物对 UV-B 辐射信号的应答反应, 在一定的时间内对 UV-B 的诱导表达敏感。因为类黄酮化合物在植物中具有抗紫外辐射的作用, 暗示 *PtoMYB156* 转录因子可能调控了类黄酮物质的生化合成过程。

4.4.2 *PtoMYB156* 超表达杨树中苯丙烷代谢产物含量检测

取生长 6 个月的超表达及野生型杨树叶片, 以分光光度法检测苯丙烷代谢途径的产物—总酚、花青素、总黄酮及可溶性单宁的含量。结果如 4.3-2 图所示,

和对照组相比，转基因杨树叶片中总酚、花青素、总黄酮及可溶性单宁的含量均明显下降 ($P < 0.05$)。说明 *PtoMYB156* 在杨树中超表达，对苯丙烷代谢途径下游的多个次生化化合物的合成具有抑制作用。

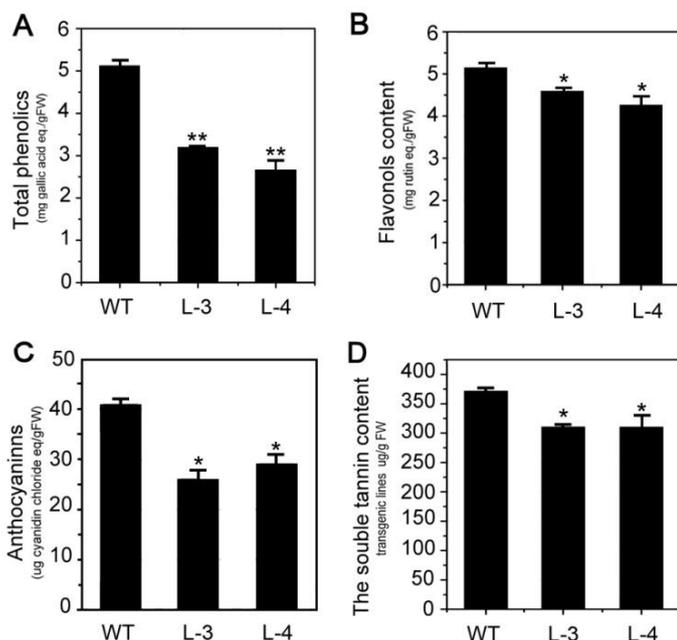


图 4.3-2 野生型和超表达杨树中多种苯丙烷代谢产物含量的测定。(A) 定量检测野生型和转基因杨树中总酚物质含量；(B) 对转基因杨树和对照中总黄酮化合物含量的检测；(C) 对转基因杨树和野生型杨树中花青素含量的检测；(D) 对转基因和野生型杨树中可溶性单宁的定量分析

Figure 4.3-2 Determination of secondary metabolites of phenylpropanoid pathway in overexpressional and wild-type poplar. (A) Quantification of phenolic compounds from WT and transgenic plants; (B) Quantification of flavonols content in leaves of WT and transgenic plants; (C) Quantification of anthocyanins compounds from WT and transgenic plants; (D) The soluble tannin content in WT and transgenic plants. The data are means \pm SD of three independent experiments. **, * indicate significant differences in comparison with WT at $P < 0.01$, $P < 0.05$ respectively (Student's *t*-test).

4.4.3 超表达 35S:*PtoMYB156* 转基因杨树中黄酮合成相关酶的表达水平的变化

根据已有的研究，花青素、类黄酮合成途径中单个结构酶基因表达水平的高低可能直接或间接影响下游的代谢产物含量。因此，我们检测了 *PAL*、*CHS* 等多个关键酶及限速酶的转录水平（见图 4.3-3）。

PtoMYB156 超表达杨树中，*C4H* 作为苯丙烷代谢途径上游的，能直接影响植物木质素及黄酮类化合物产量的关键酶基因^[198]，转录丰度明显降低了（图 4.3-3）。*C4H* 的表达于植物的木质化进程密切相关^[199]，同时也是苯丙烷代谢途径中类黄

酮合成的关键酶基因，它的表达水平也被抑制了。这两个基因的表达沉默，与前文中检测到的超表达杨树的总黄酮含量降低是一致的。此外，*PtoMYB156* 超表达引起 *LAR*、*ANS*、*ANR* 三类花青素相关酶基因的表达下调，也与植物花青素含量减少的检测结果一致。同时，*FLS*、*DFR* 作为黄酮类合成必须的酶基因，在转基因植株中表达水平的下降预示着 *PtoMYB156* 的超表达可能引起了植物某些黄酮醇含量的降低。上述结果表明，*PtoMYB156* 可能通过抑制 *C4H*、*CHS*、*LAR* 等结构基因的表达，从而降低植物体内苯丙烷代谢途径中的生物合成代谢速率，影响体内总黄酮、可溶性单宁、花青素和总酚物质的含量。并依此推测，该基因的超表达可能会引起植物对抗非生物胁迫时环境适应性能力的改变。这部分内容将在后面进行详细分析。

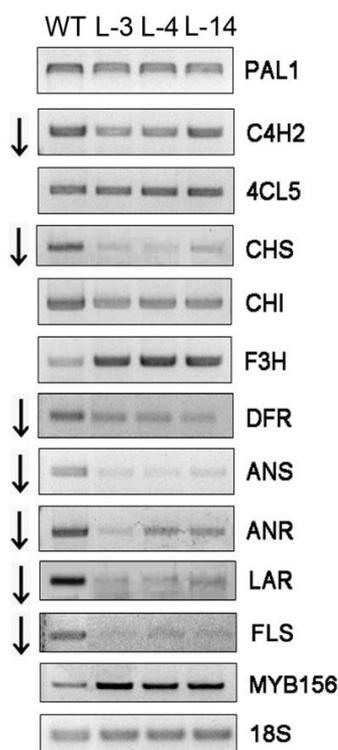


图 4.3-3 野生型和超表达杨树中检测黄酮类化合物相关基因的表达

Figure 4.3-3 Gene expression analysis of flavonoids metabolism related genes of wild-type and *PtoMYB156* overexpression in poplar plants.

4.4.4 异源超表达 *PtoMYB156* 的拟南芥表型和组分分析

4.4.4.1 转基因拟南芥的营养生长受抑制

在上一章中，研究发现超表达 *PtoMYB156* 基因能引起杨树叶片向上蜷曲、植株生长滞后，茎倒伏等性状。为了进一步观察 *PtoMYB156* 基因对植株整个生长周

期过程中产生的影响，我们将 *PtoMYB156* 转基因再转入拟南芥中。

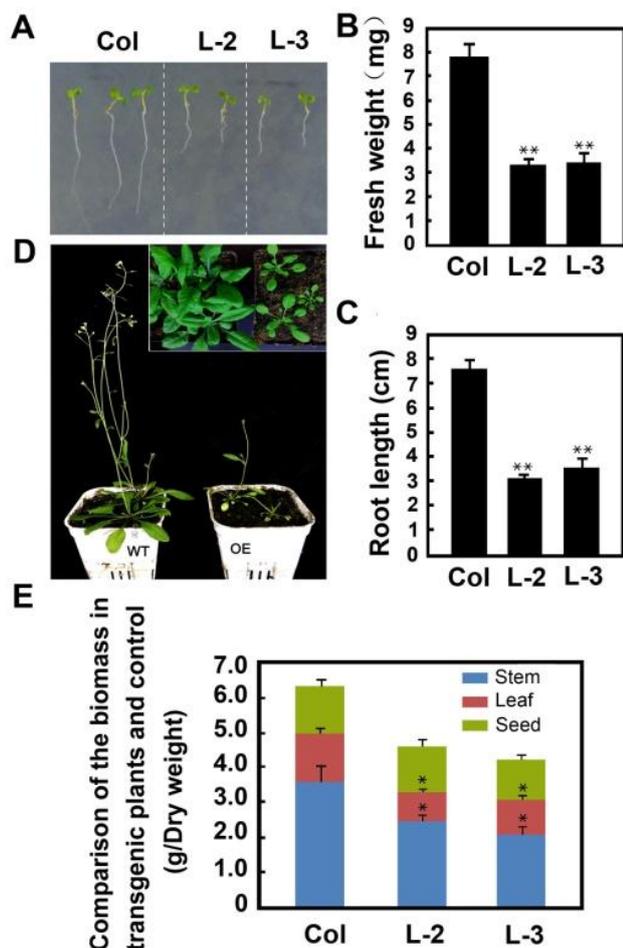


图 4.3-4 超表达 *PtoMYB156* 引起拟南芥生长和生物量合成受到抑制

Figure 4.3-4 Transgenic Arabidopsis show inhibition of growth and biomass.

通过表型观察发现，从幼苗发育时期到进入抽薹开花时期，转基因植株在生长上明显滞后于野生型，这与我们在杨树中观察到的结果相似。同时，对同一时期的野生型和转基因植株，测量鲜重、根长（统计生长第 7 d，图 4.3-4C），统计不同组织（茎、叶、带荚种子）的生物量（生长进入第 9 w）。结果显示，*PtoMYB156* 的外源表达的确能引起拟南芥的营养器官生长发育滞后和总生物量的降低（图 4.3-4B,C,E）。上述结果表明，*PtoMYB156* 具有抑制植株生长发育的作用。

4.4.4.2 转基因拟南芥的种皮颜色变化

除了观察到转基因拟南芥在生长体型上的差异之外，我们还发现超表达 *PtoMYB156* 能明显改变拟南芥种子表皮的颜色（图 4.3-5 a, b）。在正常情况下，自然成熟的拟南芥角果果荚剥落后，假隔膜上附着的种子外皮颜色呈深褐色（图 4.3-5 c），而本实验得到的转基因拟南芥种子表皮颜色呈浅黄褐色（图 4.3-5 d）。

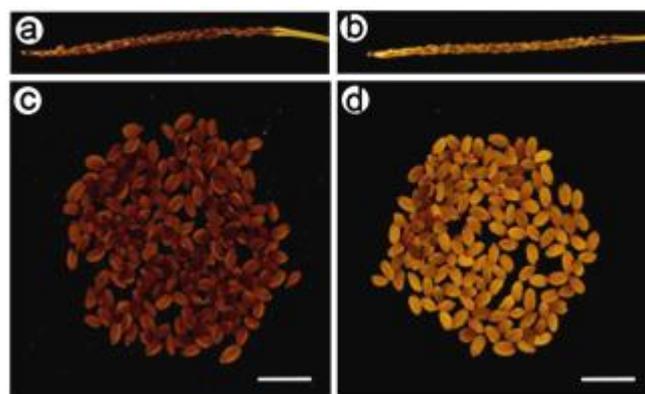


图 4.3-5 拟南芥 F2 代种子表皮在光学显微镜下观察

Figure 4.3-5 The seed color of the F2 progeny was examined by light microscope

4.4.4.3 拟南芥种子 DMACA 染色

根据前人对拟南芥种皮色素合成的研究报道，正常的拟南芥种皮中色素积累与单宁在种子内皮层的累积密切相关^[200, 201]。拟南芥中类黄酮途径的研究表明，种子发育早期，黄烷醇（儿茶素和表儿茶素）首先被合成无色的原花色素聚合物，随着种子的成熟原花色素被转运至细胞壁，再经过一系列氧化聚合反应形成不可溶的聚合物，该聚合物与种子内皮层中细胞壁交联，促进了正常的褐色种皮的形成^[202, 203]。

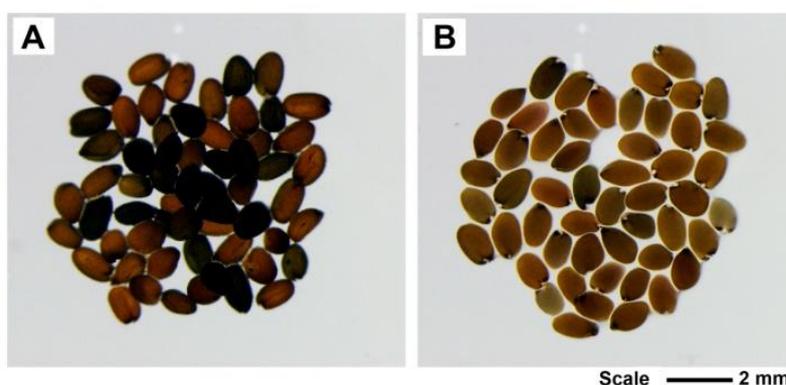


图 4.3-6 经对二甲氨基肉桂醛（DMACA）染色后转基因及对照拟南芥种皮表型。A，Col 拟南芥种子；B，*PtoMYB156*-OE 拟南芥种子。

Figure 4.3-6 Seed coat phenotypes of WT and transgenic Arabidopsis stained with dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA). A, Wild-type seed; B, Transgenic Arabidopsis seed.

具有黄色种皮特征的油菜种皮中往往是因为缩合单宁含量低，不能轻易与对二甲氨基肉桂醛(DMACA)形成蓝色物质。因此，当我们用对二甲氨基肉桂醛（DMACA）对上述野生型及转基因拟南芥种子中的单宁特异染色后发现，相较于前者而言，超表达 *PtoMYB156* 的转基因拟南芥蓝色着色明显变浅了(图 4.3.6)。由

于单宁是双子叶植物类黄酮代谢途径中的次生代谢产物，因此，可以预测 PtoMYB156 转录因子也参与了植物种皮色素形成时的类黄酮合成过程。

4.4.5 转基因拟南芥种子中单宁含量的检测

Marles 和 Gruber 通过分析油菜种皮色素的研究证实，由于种子发育过程中种皮的不溶性原花色苷（缩合单宁）累积的总量较高，因此形成了黑色、黄色种皮颜色上的差异^[204]。因此，在拟南芥种子中我们通过 DMACA 的单宁染色结果，比较直观的印证了这一点。在浅色表皮的拟南芥种子中单宁的含量较野生型更低，因此蓝色显示不明显（图 4.3.6）。由于缩合单宁的合成需要表儿茶素的参与，我们进一步检测了拟南芥种子中的表儿茶素含量。

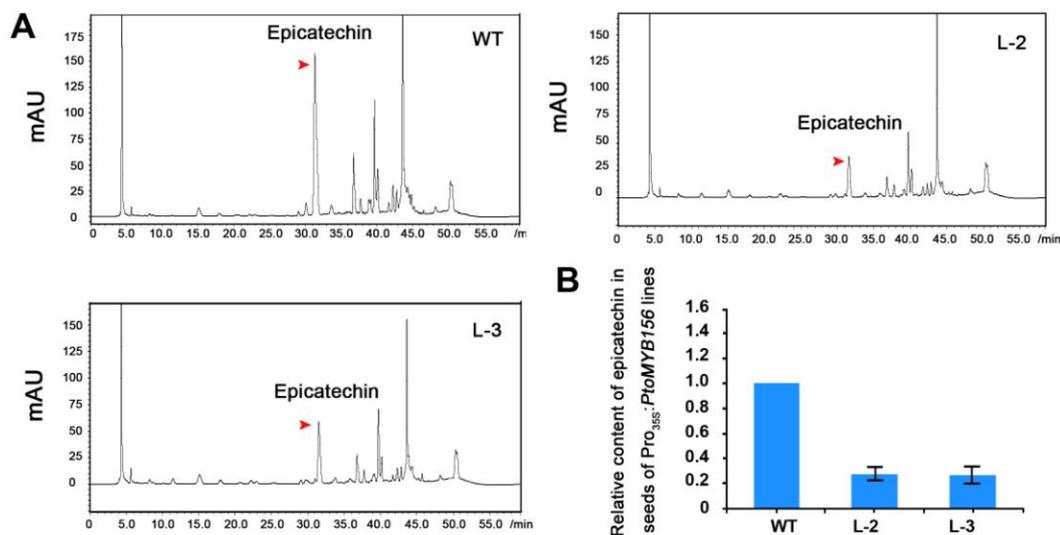


图 4.3-7 HPLC 串联二极管阵列检测器检测拟南芥种子中表儿茶素含量。(A) 野生型和转基因拟南芥 (L2、L-3) 种子中表儿茶素检测的色谱图；(B) 相对野生型种子中表儿茶素含量的定量统计结果。

Figure 4.3-7 (A) HPLC–diode array detection (DAD) analysis of epicatechin content in seeds of WT and transgenic *Arabidopsis*. (B) Relative content of epicatechin in the mature seeds of OE-*PtoMYB156* and WT lines. The epicatechin content of WT was set to 1. Data represent means \pm SD from three biological repeats.

通过 HPLC-DAD 检测方法对拟南芥种子缩合单宁含量做了进一步的定量检测。在相同检测条件下，从高效液相色谱结果图中发现，转基因种子中的表儿茶素含量降低了（图 4.3-7B）。同时也说明，*PtoMYB156* 能抑制拟南芥种皮中缩合单宁的合成。并且转基因拟南芥种子中缩合单宁含量的降低，很可能是因为表儿茶素含量的不足导致的。

4.4.6 超表达 *PtoMYB156* 降低拟南芥对 UV-B 辐射耐受性

作为抵御 UV-B 辐射的重要防御性次生代谢产物，黄酮醇能吸收波长范围为

280~320 nm 波长区间的紫外线，从而增强植物适应非生物环境胁迫的能力^[205]。前面的基因表达水平检测中，发现转基因植株中 *FLS* 的表达水平也显著下降。此前的报道认为，植物中 *FLS* 表达水平的高低反映了植物中黄酮醇化化合物的含量。因此，我们通过 UV-B 辐射处理实验，来研究 PtoMYB156 在植物 UV-B 防御响应和黄酮合成调控中的功能。发现和野生型拟南芥相比，转基因植株更早显示叶片萎缩、并逐渐发黄的表型特征（4.3-8 A, B）。此外，在辐射处理后，拟南芥继续生长约 10-15 d 后统计结果得知，转基因拟南芥的存活率相比野生型大大降低了（4.3-8 D）。

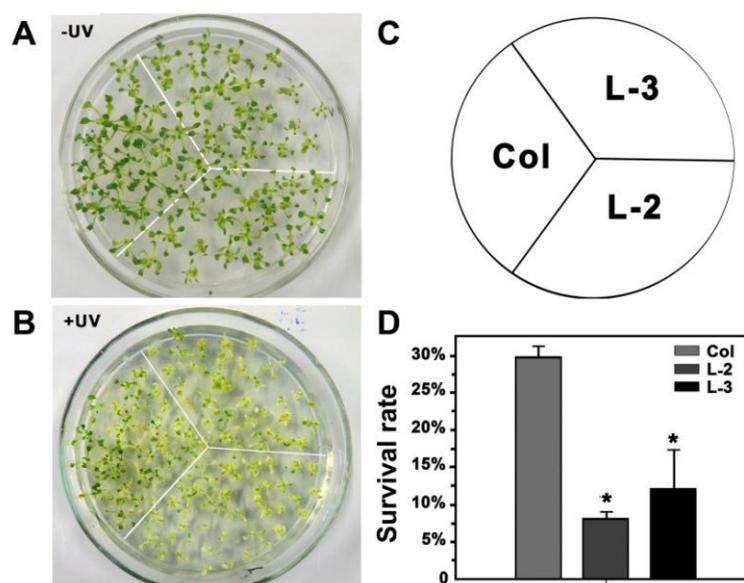


图 4.3-8 14 d 的 WT 和转基因拟南芥接受 UV-B 辐射后的表型和存活率统计分析。

Figure 4.3-8 Phenotype and statistical analysis of survival rate of 14-day-old WT and transgenic plantlets submitted to UV-B irradiation. Error bars represent SE of three independent biological replicates. * indicate significant differences in comparison with WT at $P < 0.05$ (Student's *t*-test).

这些结果表明 *PtoMYB156* 的异源表达降低了拟南芥对 UV-B 辐射的抵御能力。而对于这种防御能力的影响是否通过降低与抗 UV 辐射相关的黄酮苷化合物，如山奈酚和槲皮素含量实现的呢，这一问题尚不清楚。

4.4.7 超表达 *PtoMYB156* 拟南芥植株中抗 UV-B 辐射相关黄酮苷的检测

山奈酚和槲皮素是植物中常见的黄酮苷，它们的衍生物在双子叶植物的表皮细胞中具有吸收紫外辐射的重要生物功能^[206, 207]。为了验证 *PtoMYB156* 转基因拟南芥对紫外防御能力的降低是否与其调控槲皮素和山奈酚的合成有关，我们对植株中这两种物质的含量进行了检测，结果表明，和野生型对照相比，转基因拟南芥体内的山奈酚和槲皮素含量都有不同程度的下降。尤其是槲皮素，含量降低了

超过 50% (图 4.3-9D)。这个结果与 UV-B 处理下, 转基因拟南芥抗 UV-B 能力减弱的表型是相符的。

在苯丙烷代谢途径中, *CHS* (查尔酮合成酶) 和 *FLS* (黄酮醇合成酶) 是影响槲皮素和山奈酚合成的限速酶基因。其中, *CHS* 位于苯丙烷代谢途径上游, 而 *FLS* 能直接影响二氢山奈酚形成山奈酚的过程。在前述研究中检测到 *FLS* 和 *CHS* 表达明显下降, 可能是 PtoMYB156 引起槲皮素和山奈酚含量下降的分子基础。

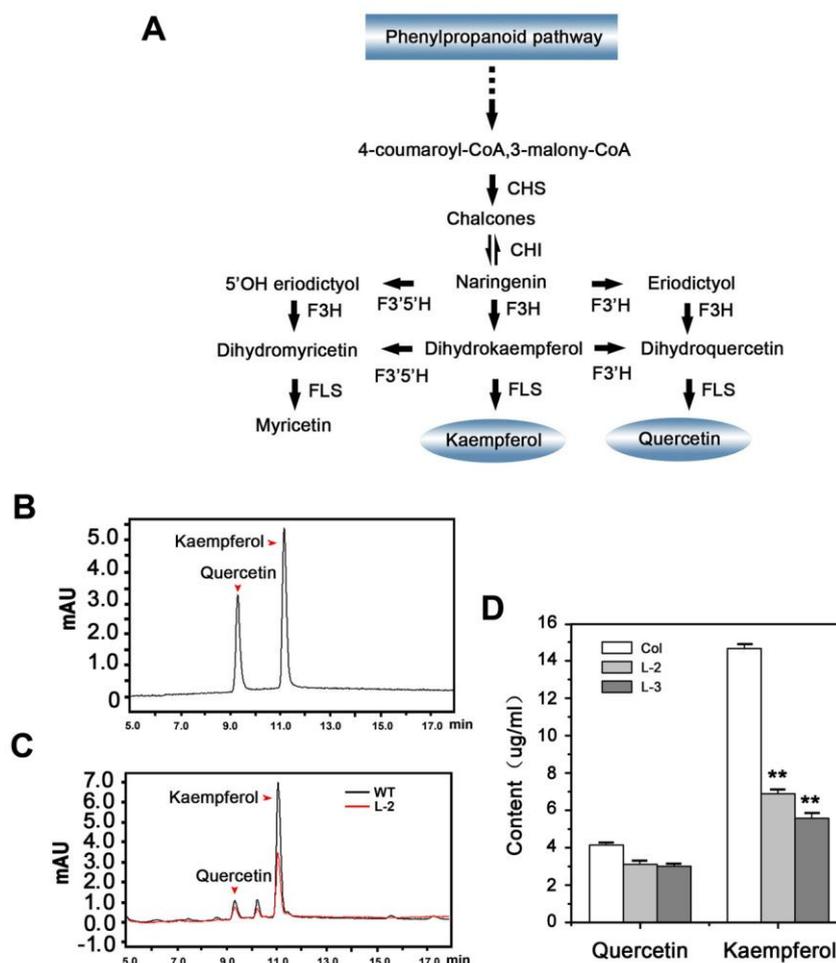


图 4.3-9 超表达 *PtoMYB156* 基因抑制拟南芥中槲皮素和山奈酚的生物合成。(A) 黄酮化合物合成分支途径; (B) 高效液相色谱法检测槲皮素和山奈酚标准品图谱; (C) 高效液相色谱法检测样品的槲皮素和山奈酚图谱; (D) 槲皮素和山奈酚定量统计结果

Figure 4.3-9 Overexpression of *PtoMYB156* repressed kaempferol and quercetin biosynthesis in Arabidopsis. (A) The flavonoids metabolism biosynthetic pathway. (B)(C) HPLC-diode array detection (DAD) chromatograms of quercetin and kaempferol content in WT and transgenic Arabidopsis (Line-2). (D) Kaempferol and quercetin were quantified in WT and transgenic Arabidopsis. Error bars represent the SE from three biological replicates. ** indicate significant differences in comparison with WT at $P < 0.01$. (Student's *t*-test).

4.4.8 转基因拟南芥中黄酮合成途径相关酶基因表达水平分析

为了在分子水平上确定 PtoMYB156 转录因子与转基因拟南芥中表儿茶素含量变化的关系，我们对类黄酮代谢途径中关键酶基因的表达进行了检测。

苯丙烷代谢途径中的 *CHS*、*CHI*、*F3H* 等是调控类黄酮化合物合成的几个重要关键酶基因^[208]，由它们催化生成的黄烷醇产物影响了种皮颜色。本实验取拟南芥幼苗（生长 7 d）进行半定量 PCR，结果显示转基因拟南芥中 *CHS*、*CHI*、*F3H* 和 *FLS* 的表达和野生型相比明显下降（图 4.3-10）。这些结果证明，PtoMYB156 在拟南芥营养生长的早期阶段就参与了对类黄酮次生化合物形成的代谢途径的调控，并且种子中缩合单宁含量的降低可能也与 *CHS*、*CHI*、*F3H* 及 *FLS* 这些关键酶基因的表达活性的下降紧密相关。

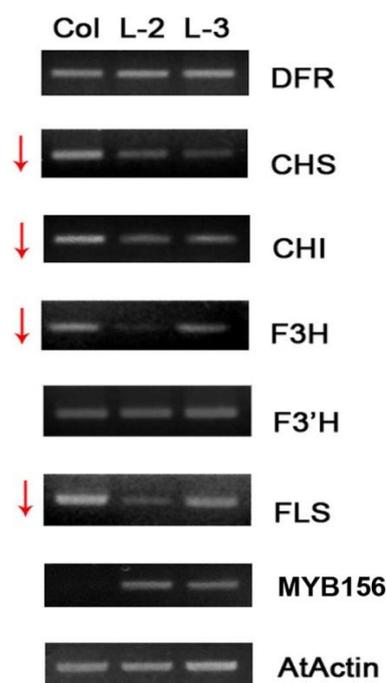


图 4.3-10 转基因拟南芥植株中检测黄酮合成途径相关基因的表达情况

Figure 4.3-10 Transcript level of flavonoids metabolism related genes of wild-type and *PtoMYB156* overexpression *Arabidopsis* plantlets.

4.4.9 PtoMYB156 与杨树中 *FLS*、*LAR* 的启动子瞬时共表达分析

为了验证 PtoMYB156 转录因子是否通过结合类黄酮合成关键酶基因启动子而调控槲皮素和山奈酚化合物的合成。我们通过农杆菌注射的方法将 PtoMYB156 表达载体及 *FLS*、*LAR* 基因启动子融合 GUS 报告基因的载体共转化烟草叶片，并将带有空质粒的表达载体及相应的报告载体共转化作为对照。

定量检测 GUS 蛋白活性的结果显示，*ProLAR:GUS* 和 *ProFLS:GUS* 与

PtoMYB156 共转化导致 *GUS* 报告基因所编码的蛋白活性降低。其中 *PtoFLS* 和 *PtoLAR* 启动子所控制的 *GUS* 活性分别降低了近 90%，70%（见图 4.3-11B）。说明在植物细胞内，PtoMYB156 能够直接结合杨树中 *FLS* 及 *LAR* 基因的启动子序列，抑制它们的表达。暗示 PtoMYB156 作为负调控因子，能识别这些类黄酮关键酶基因启动子上的相关调控元件，抑制基因表达从而降低该酶的表达活性，进而影响到槲皮素和山奈酚的合成。

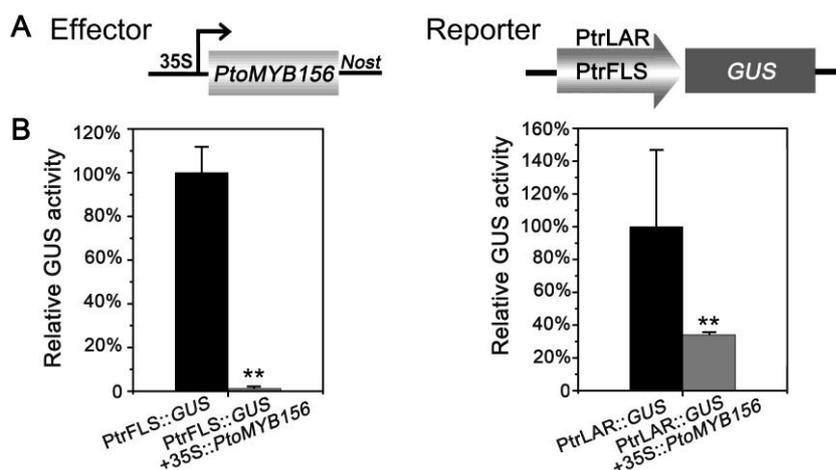


图 4.3-11 PtoMYB156 对黄酮代谢途径上合成酶基因的抑制实验。（A）效应子和报告载体结构图；（B）PtoMYB156 和 *PtrLAR* 及 *PtrFLS* 启动子的共表达实验。

Figure 4.3-11 Repression of the promoters of poplar flavonoids metabolism biosynthetic genes by PtoMYB156. A, Diagrams of the effector and reporter constructs used for the expression analysis. B, co-expression analysis of the PtoMYB156 and *GUS* reporter gene driven by the promoter of *PtrFLS* and *PtrLAR*. *GUS* activity in tobacco leaves transfected with the reporter construct alone was used as a control. The activity of control was set to 1. Error bars represent SE of three biological replicates.

4.5 小结与讨论

MYB 转录因子参与植物多种生理代谢活动，并对细胞周期分化、器官的建成具有重要的调节作用^[209, 210]。了解不同类型 MYB 转录因子在转录水平上对植物在逆境过程中调控机制的相关信息，对于解析多样性的 MYB 转录因子对植物生理代谢调控及非生物逆境胁迫中的应答机制具有重要意义。

本研究根据拟南芥中 MYB4 和毛白杨中 PtoMYB156 结构上的保守性，预测两者功能上可能相似。利用同源克隆的方法，从毛白杨中分离得到了 *PtoMYB156* 基因。启动子表达特性实验和实时定量 PCR 分析显示，*PtoMYB156* 不仅在毛白杨的茎、根、木质部和茎皮等表达水平较高，而且在叶片及叶柄等组织中含量也比较丰富。推测 *PtoMYB156* 是组成型表达的基因，可能参与植物的次生长过程。

前人的多项研究证明, MYB 转录因子不仅能广泛参与植物生长发育及各项生理代谢功能的调节^[211, 212], 而且能对紫外辐射的胁迫应答、并调控植物体中相关结构基因的表达^[213]。植物次生代谢产物是植物在长期进化过程中对周围环境适应的结果, 许多植物在受到生长胁迫时, 产生并累积大量的小分子次生代谢产物, 以抵御伤害。类黄酮是其中一类重要的次生化合物, 其中的山奈酚和槲皮素不仅在植物的基础代谢中发挥间接作用, 并且还具有保护植物细胞免受紫外辐射伤害的功能。实验表明, *PtoMYB156* 随着紫外辐射在一定时间内的增长, 其表达量随之上升, 显示 *PtoMYB156* 对 UV-B 辐射具有明显的应答反应, 而当 *PtoMYB156* 在拟南芥或杨树中的超表达, 也使得受体植物中相应的黄酮代谢途径相关的 *CHS*、*CHI*、*FLS* 等关键酶基因的表达量明显下调, 最终导致总黄酮量的含量下降了。在拟南芥的 UV-B 胁迫生长处理实验中, *Pro35S:PtoMYB156* 转基因拟南芥的死亡率显著低于野生型对照。因此, 推测 *PtoMYB156* 的表达可能与植物的响应 UV-B 辐射胁迫的耐受性有关。

在对金鱼草中的 *AmMYB308* 和 *AmMYB330*, 拟南芥中的 MYB4 及草莓果实中的 *FaMYB1*、柳枝稷 (*Panicum virgatum* L. cv Alamo) *PvMYB4* 等这一类 MYB 转录因子的 C 端都具有保守性基序 pdLNLD/ELxiG/S。该基序的存在与转录因子的抑制性功能相关。*PtoMYB156* 的转录抑制功能可能与该结构的存在有较大相关性, 在上一章中我们证明了这一转录抑制调控活性特征。在这里我们利用烟草叶片瞬时共表达实验, 证明了 *PtoMYB156* 能抑制黄酮合成途径关键酶 *LAR/FLS* 的表达。该实验结果证明杨树中 *PtoMYB156* 可能通过调节类黄酮化合物含量, 抑制了植物对 UV 辐射环境胁迫的应答反应。

在本章的实验中我们还发现, 超表达 *PtoMYB156* 的拟南芥种皮颜色相较野生型变浅, 呈现淡黄色 (见本章图 4.3-4)。我们在实验中对转基因拟南芥种子进行了 DMACA 的染色实验, 发现和野生型拟南芥相比, 蓝色相对较浅。证明 *PtoMYB156* 降低了缩合单宁化合物的合成。而这种影响方式, 可能与控制类黄酮合成的结构基因有关, 也可能由于 *PtoMYB156* 通过影响直接调控种皮类黄酮合成的转录因子的编码控制过程有关, 如 *AtTT1*, *BrTT12* 等。Sagasser 等人在拟南芥中证明了, *TT1* 基因通过调控 *ANR* 基因启动子, 从而控制表-3-羟基黄烷酮 (epi-flavan-3-ols) 的合成来影响拟南芥种皮颜色的深浅^[214-216]。是否 *PtoMYB156* 对拟南芥种皮颜色的影响是否涉及到其他转录因子的参与, 还需要更多的实验来证明。

第五章 总结与展望

5.1 研究总结

NAC、MYB 转录因子家族参与植物生长发育、逆境下胁迫应答等多种生命活动的信号传导过程，是木本植物长期生活环境过程中的重要功能分子。在拟南芥中已有明确报道，SND1/NST1 是植物次生壁合成转录调控的一级调控开关，能影响植物维管组织的正常发育。由于 NAC 结构域在进化上存在极大保守性，因此推测木本植物毛白杨中也存在类似功能的转录因子，对杨树木质部发育、维管组织分化过程中起到了关键的调控作用。

为了研究杨树中次生壁发生的规律，找到对木本植物后生木质部发育过程中具有特异调控效应的作用因子。本文以杨树为实验材料，采用离体培养、遗传转化等实验系统，利用细胞生物学、分子生物学、生物化学、生物信息学等研究手段，揭示了 PtoVNS11 和 PtoMYB156 参与调控苯丙烷代谢途径中多种重要次生产物合成的生物学功能，并着重解析它们在影响细胞次生壁主要成分的调控机制；阐明了不同的转录因子对木质部细胞分化的调控方式。

5.1.1 杨树 PtoVNS11 转录因子对次生壁形成的调控

首先，本论文使用生物信息学分析方法，在木本植物毛白杨中筛选并克隆得到了 PtoVNS11 基因（NCBI 网站登录号 KU049786），对其在对木本植物中次生壁合成发挥的作用进行了一系列功能分析。

(1) PtoVNS11 在结构上和 AtSND1/AtNST1 属于同一进化分支，并在毛白杨中具有极高的木质部表达特异性。构建 *snd1nst1* 双突变体，并进行 *Pro_{35S}:PtoVNS11* 的回复实验，发现植株生长倒伏，维管束间纤维细胞次生壁发育缺陷等表型特征得到恢复。暗示 PtoVNS11 是一个影响杨树次生壁形成的重要调控基因。

(2) 超表达 *Pro_{35S}:PtoVNS11* 会引起拟南芥韧皮部细胞壁中异常的木质素沉积现象，且在杨树中能促进木质部发育，增加茎组织中木质素含量。在杨树中检测木质素合成关键酶基因及相关转录因子基因的转录表达水平都明显上升，和拟南芥中现有的转录调控表达模式相似。证明 *PtoVNS11* 是毛白杨中鉴定得到的与拟南芥 SND1 和 NST1 功能相似的“开关基因”。

因为木质素从苯丙烷代谢途径衍生而来，有可能 MYB 转录因子通过直接或间接的方式，在完成苯丙烷代谢向各个分支代谢路径分流的过程中，改变了以酚类化合物为底物的物质的合成（如木聚糖，黄酮醇等），从而影响了木质素的合成或沉积。这一点在超表达 *PtoVNS11* 杨树中检测一系列与次生壁代谢相关的

MYB 及 NAC 转录因子基因的表达结果中得到了间接线索。我们发现：与拟南芥中 MYB4 同源的、结构相似的 *PtoMYB156* 表达水平显著降低。作为拟南芥中首个被鉴定的同时影响木质素代谢和黄烷酮生物合成的转录因子，MYB4 通过与苯丙烷代谢途径上游的 *C4H* 基因启动子元件结合，抑制下游生物合成过程。受这一过程的启发，我们将 *PtoMYB156* 转录因子从毛白杨中克隆出来，完成测序后对其氨基酸序列与其他不同物种的同源基因进行了细致的对比分析。预测 *PtoMYB156* 有可能作为转录抑制子参与到复杂的苯丙烷代谢调控途径中。

5.1.2 *PtoMYB156* 的生物学功能分析

我们将关注点放在：①、*PtoMYB156* 是否影响木质素代谢；②、它是否参与植物防御性黄酮化合物的合成途径的问题上来。利用拟南芥和杨树作为实验对象，进行了系统的功能验证工作。

(1) 对 *PtoMYB156* 的氨基酸结构分析发现其氨基酸二级序列上具有 EAR 结构元件，推测 *PtoMYB156* 具有抑制功能；亚细胞定位及酵母转录激活实验证实该转录因子定位于细胞核中表达，并且具有转录抑制特性。

(2) 分别构建 *35S:PtoMYB156* 超表达及 CRISPR/Cas9-*PtoMYB156* 敲除表达系统，转化毛白杨并进行了植物形态生长发育、维管组织解剖方面的表型观察：超表达 *PtoMYB156* 引起植株生长倒伏、叶片上卷、植物导管组织空腔中木质素沉积减少，并且总体木质素含量显著降低，然而对木质素单体组分 G/S 比例没有明显影响；而敲除突变体杨树中发现，植株茎组织中导管和纤维细胞次生壁中木质素含量降低，且次生壁代谢途径中关键酶基因表达水平显著上升。而对该基因的多组织表达谱分析结果显示，与 *PtoVNS11* 不同的是，*PtoMYB156* 不仅在木质部韧皮部等维管组织发达的地方表达强烈，在叶片叶柄等部位的表达水平更高。说明 *PtoMYB156* 转录因子可能不仅参与维管组织的发育，对于适应环境胁迫，响应防御传导信号也有一定的功能。

(3) *PtoMYB156* 转录因子基因与拟南芥中 MYB4 转录因子结构上具有较高相似度。将 *PtoMYB156* 转化拟南芥进一步分析该基因对拟南芥类黄酮化合物产生的影响，发现转基因拟南芥抵抗 UV-B 辐射的能力减弱，转基因拟南芥死亡率明显高于对照组；并且超表达 *PtoMYB156* 基因的拟南芥在从营养生长至结实的生殖发育阶段展现出一系列表型差异。

(4) 观察 *PtoMYB156* 对拟南芥生长周期的影响研究中发现，种子萌发初期其真叶叶片向上蜷曲，茎组织中木质部发育滞后且生长体型较小，生长 9 周后统计的总叶片及茎组织的生物量显著低于同期生长的对照组；此外，还发现转基因拟南芥的种皮颜色变浅，呈浅黄而非野生型拟南芥种皮的深褐色。前者显示的表

型特征与在杨树中 *PtoMYB156* 负向调节维管组织或次生壁形成相关，该结果与杨树中得到的结论一致。

(5) 在拟南芥植株检测到槲皮素和山奈酚的含量降低。对种子进行 DMACA 染色，转基因种子着色浅于野生型种子；定量检测拟南芥种子中可溶性单宁表儿茶素含量显著下降的又一实验结果则再次证明了，*PtoMYB156* 参与苯丙烷代谢途径的另一分支——类黄酮化合物的合成。

(6) 烟草叶肉细胞中的转录因子与结构基因启动子的瞬时共表达实验证明，*PtoMYB156* 能抑制黄酮合成途径中 *LAR*、*FLS*，以及次生壁合成途径中关键酶基因 *C4H*、*CesA17*、*GT43B* 报告基因的表达，引起 GUS 活性下降。

5.2 创新点

(1) 通过同源克隆方法，在毛白杨中找到了对木质素代谢起关键调控作用的 *PtoVNS11* 转录因子，并对其进行了完整的生物学功能分析，证明了 *PtoVNS11* 和拟南芥中 *SND1* 和 *NST1* 相似的“开关基因”特性；

(2) 在木本植物中同时利用超表达和 CRISPR/Cas9 基因敲除系统基因功能研究方法，在杨树中较完整的阐明了 *PtoMYB156* 转录因子对其木质部次生壁形成的调控作用；

(3) 在杨树中发现了一个既能影响植物细胞次生壁合成，同时也能影响 UV 辐射逆境胁迫适应能力的转录因子，并探讨了其调控机制。

5.3 工作展望

在最近的十几年，人们对于 NAC、MYB 转录因子家族的认识已取得了巨大的进步。进一步深入解析多基因家族的转录因子之间的调控网络，阐明许多尚未知晓的，影响植物正常生理和代谢多的机理，对于从分子水平上解释植物如何适应多样化环境具有重大意义。因此，在未来将围绕以下这几个方面开展延续性的研究工作：

(1) 转录因子的调控模式取决于植物的组织类型、发育时期，以及外部环境条件的刺激。关于研究次生壁合成相关的 NAC 家族的转录因子如何响应生物或非生物刺激，影响细胞次生壁重构的机理还知之甚少。阐明“开关基因” *PtoVNSs* 与代谢通路中多个转录因子之间如何相互作用，环境刺激如何引发这些不同家族的级联蛋白在苯丙烷代谢途径上发挥各自功能，了解 MYB/NAC 转录因子家族中存在大量冗余重复序列的基因进化特征；

(2) 根据已有的对 MYB 转录因子功能的研究中，对苯丙烷代谢途径中原花青素等次生代谢产物的结构基因的调控会形成 MYB-bHLH-WD 转录因子复合体。MBW 激活复合体中的 MYB 蛋白和 bHLH 蛋白组分之间的反馈调节机制对于调控花青素和原花青素的生化过程可能对于 *PtoMYB156* 来说也是很重要的。未来对于研究 *PtoMYB156* 是否通过抑制和 bHLH, WD 蛋白之间形成复合物的形成或者修饰过程，以达到发挥转录抑制效应的调控机理还需要更详细的研究；

(3) 从目前来看，理解木质素合成缺陷和矮化表型之间的关系还存在争议。探索是否由于转录因子阻碍木质素合成途径，导致植株生长滞后、矮化？这一点还需要进一步研究。

附录

1、引物

引物名称	序列 (5' -3')	说明
PtoMYB156-F	CCTCCGTCTCTAGTCCTACC	Primers for plant overexpression vector construction
PtoMYB156-R	TCCCTTTCTCCTTTCTCTCC	
PtoMYB156-F	CCTCCGTCTCTAGTCCTACC	Primers for detecting mutation
PtoMYB156-Cas9-R	GGAGGCTATGGAGTTTGATA	
Hyg-F	CTTCTACACAGCCATCGGTCCAGA	Primers for detecting transgenic plants
Hyg-R	GATGTAGGAGGGCGTGGATATGTC	
PtoMYB156-T1-F	ATTGCCCATACAAACAAGGGTGCG	Multiple assembled Cas9/sgRNA construct
PtoMYB156-T1-R	AAACCGCACCCCTGTTTGTATGGG	
PtoMYB156-T2-F	GTCAACTCTTGCCACATCTAAGA	
PtoMYB156-T2-R	AAACTCTTAGATGTGGCAAGAGT	
PtoMYB156-T3-F	ATTGTTGCTTACATTAGAGCTCA	
PtoMYB156-T3-R	AAACTGAGCTCTAATGTAAGCAA	
QPtO18S-F	CGAAGACGATCAGATACCGTCTTA	quantitative PCR
QPtO18S-R	TTTCTCATAAGGTGCTGGCGGAGT	
QPtOPAL1-F	CCATCCAGGTCAAATTGAGGCTGCT	quantitative PCR
QPtOPAL1-R	ACTTCTTAGCTGCCTTCATGTAAGCT	
QPtOC4H2-F	GAAATGTGCAATTGATCATATTTTG	quantitative PCR
QPtOC4H2-R	ATTGCAGCAACATTGATGTTCTCC	
QPtO4CL5-F	ATTCTGTGCGTGCTGCCTATGTTC	quantitative PCR
QPtO4CL5-R	AATTGCAGCACCAACTCTCAACCC	
QPtOHCT1-F	ATCAGCATGTAAGGCACGCGG	quantitative PCR
QPtOHCT1-R	TGCCAAAGTAACCAGGTGGAAGCGT	
QPtOC3H3-F	TCTACGCTTCAAGCTCCACCA	quantitative PCR
QPtOC3H3-R	GGAACCTCACAGGCTTGACG	
QPtOCCoAOMT1-F	CAGTAATTCAGAAAGCTGGTGTTC	quantitative PCR
QPtOCCoAOMT1-R	GCATCCACAAAGATGAAATCAAAC	
QPtOCCR2-F	CGGTGATTCAGAAAGCTGGTCTGGA	quantitative PCR
QPtOCCR2-R	GCATCCACAAAGATGAAGTCATAAG	
QPtOF5H2-F	TCTGCGTCATGAAGCTATTTAGCC	quantitative PCR
QPtOF5H2-R	TGTCTTAAGCATTGAGTCCACCTCA	
QPtOCOMT2-F	TCTTGAAGAATTGCTATGACGCCT	quantitative PCR
QPtOCOMT2-R	GAATGCACTCAACAAGTATCACCTTG	
QPtOCAD1-F	AAGTTTGTGGTGAGAATTCCTGATG	quantitative PCR
QPtOCAD1-R	AAACTGTCAATCCAGCGACAATAG	
PtoLAC40-F	AAGGCGGTTTCACTTTGCCAGTCC	quantitative PCR
PtoLAC40-R	TAGGTGGCATCAACTCCACGACA	
PtoPO6-F	CTACTGTTATTGCTGGAGGTCC	quantitative PCR

附 录

PtoPO6-R	TGTGGCTCCCAGATAGTGCTAC	
PtoGT43B-F	TTGAGGTGTTTGAACATGGC	quantitative PCR
PtoGT43B-R	AGTTCTGTGAGGTTTGCTGGAC	
PtoCesA17-F	CCCCTCTAGTCACGGGCAACACAC	quantitative PCR
PtoCesA17-R	AAGGTGCACATTGAAGCACCATCG	
PtoCesA18-F	GTTGGCCTCTGTCTTCTCTTTGTT	quantitative PCR
PtoCesA18-R	CAATCAATGGAAATGCAGGTCTCCG	
PtrCesA2B-F	AGGTTAAGATGGAGCGG	quantitative PCR
PtrCesA2B-R	ACGAGGTTGATGATCAAGCC	
SubPtoMYB156-F	ACACCGCACACCCTTCTAAG	Primers for Subcellular Localization
SubPtoMYB156-R	TCCCTTTCTCCTTTCTCTCC	
ProPtrGT43B-F	ATATTCTCAACACTATAGTCATTG	Primers for GUS activity assay (Promoters)
ProPtrGT43B-R	GCTAAACCCCTCAAAAACGTG	
pro-ptrC4H2-F2	GGGGTACCAGATGGGCATGCAGGAGTTG	Primers for GUS activity assay (Promoters)
pro-ptrC4H2-R2	ACTGCAGCAAAGGAGTACTGAAAGAG	
pro-ptrC3H3-F2	GGGGTACCACTTGGTGGATTTGAGACCAC	Primers for GUS activity assay (Promoters)
pro-ptrC3H3-R2	ACTGCAGTCTGAAGGGCCTTGGCAGAAT	
ProPtrCesA-F	GGAGAGGCTACACTGTCCAGATGGAG	Primers for GUS activity assay (Promoters)
ProPtrCesA-R	CTGGCTTCCATGTTGAGCAATGG	
PtoVNS11-F	ATGCCTGAGGATATGATGAA	Primers for plant overexpression vector construction
PtoVNS11-R	TGTTATACCGATAAGTGG	

2、缩写词		
缩写	中文译义	英文全称
PAL	苯丙氨酸裂解酶	Phenylalanine ammonia-lyase
C4H	肉桂酸-4-羟化酶	Cinnamate 4-hydroxylase
4Cl	桂皮酰辅酶 A 连接酶	4-coumaroyl:CoA ligase
C3H	香豆酸-3-羟化酶	p-coumarate 3-hydroxylase
CCR	肉桂酰辅酶 A 还原酶	Cinnamoyl CoA reductase
CAD	肉桂酰乙醇脱氢酶	Cinnamyl alcohol dehydrogenase
CCoAOMT	咖啡酰辅酶 A-3-O-甲基转移酶	Caffeoyl CoA o-methyl transferase
COMT	5-羟基松柏醛 O-甲基转移酶	5-hydroxyferulic acid o-methyltransferase
CHS	查尔酮合酶	Chalcone synthase
CHI	查尔酮异构酶	Chalcone isomerase
F3H	黄烷酮 3-羟化酶	Flavanone 3-hydroxylase
FLS	黄酮醇合成酶	Flavonol synthase
F3'H	黄烷酮 3'-羟化酶	Flavanone 3'-hydroxylase
F3'5'H	黄烷酮 3'5'-羟化酶	Flavanone 3'5'-hydroxylase
DFR	二氢黄酮醇 4-还原酶	Dihydroflavonol 4-reductase
ANS	花色素合成酶	Anthocyanidin synthase
bp	碱基对	Base pair
Cef	头孢霉素	Cefotaxime sodium
CTAB	十六烷基三甲基溴化胺	Cetyltrimethylammonium bromide
cDNA	互补脱氧核糖核酸	Complementary deoxyribonucleic acid
Hyg	潮霉素	Hygromycin
Kan	卡那霉素	Kanamycin
kDa	千道尔顿	Kilodalton
PVP	聚乙烯吡咯烷酮	Polyvinylpyrrolidone
Rif	利福平	Rifampin
RT-PCR	反转录聚合酶链式反应	Reverse transcription polymerase

		chain reaction
UTR	非翻译区	Untranslated region
SND1	含有 NAM-ATAF-CUC 结构域的蛋白 1	NAM-ATAF-CUC [NAC] domain protein 1
NST1	NAC 家族中引起次生壁增厚的蛋白 1	NAC secondary wall thickening promoting factor 1
DMACA	对二甲氨基肉桂醛	Dimethylaminocinnamaldehyde
DHK	二氢山奈酚	Dihydrokaempferol
DHQ	二氢槲皮素	Dihydroquercetin
MYB	--	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (MYB)
NAC	NAM (No Apical Meristem) 基因、类 NAM 结构的 ATAF1/2 转录因子, 及 CUC2 (Cup-shaped cotyledon) 转录因子基因的简称	no apical meristem (NAM), Arabidopsis transcription activation factor (ATAF1/2), and cup-shaped cotyledon (CUC)
GT	糖基转移酶	Glycosyl transferase

参考文献

- [1] 张保才, 周奕华. 植物细胞壁形成机制的新进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2015, 45(006): 544-556.
- [2] Xu Q. The role of stem cells in vein graft remodelling[J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(Pt 5): 895-899.
- [3] Georgelis N., Yennawar N.H., Cosgrove D.J. Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(37): 14830-14835.
- [4] Timell T.E. Compression wood in gymnosperms[M]. Springer-Verlag: Berlin, etc, 1986.
- [5] Ding S.Y., Liu Y.S., Zeng Y., et al. How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility?[J]. *Science*, 2012, 338(6110): 1055-1060.
- [6] Davin L.B., Lewis N.G. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis[J]. *Plant Physiol*, 2000, 123(2): 453-462.
- [7] Bonawitz N.D., Chapple C. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype[J]. *Annu Rev Genet*, 2010, 44: 337-363.
- [8] Vance C., Kirk T., Sherwood R. Lignification as a mechanism of disease resistance[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1980, 18(1): 259-288.
- [9] Timell T. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses[J]. *WOOD SCI TECHNOL*, 1967, 1(1): 45-70.
- [10] Gritsch C.S., Murphy R.J. Ultrastructure of fibre and parenchyma cell walls during early stages of culm development in *Dendrocalamus asper*[J]. *Ann Bot*, 2005, 95(4): 619-629.
- [11] Gritsch S., Guccione S., Hoffmann R., et al. A 3D QSAR study of monoamino oxidase-B inhibitors using the chemical function based pharmacophore generation approach[J]. *J Enzyme Inhib*, 2001, 16(3): 199-215.
- [12] He L., Terashima N. Formation and Structure of Lignin in Monocotyledons IV. Deposition Process and Structural Diversity of the Lignin in the CellWall of Sugarcane and Rice Plant Studied by Ultraviolet Microscopic Spectroscopy[J]. *Holzforschung*, 1991, 45(3): 191-198.
- [13] Bonawitz N.D., Chapple C. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype[J]. *ANNU REV GENET*, 2010, 44: 337-363.
- [14] Weng J.K., Akiyama T., Bonawitz N.D., et al. Convergent evolution of syringyl lignin biosynthesis via distinct pathways in the lycophyte *Selaginella* and flowering plants[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(4): 1033-1045.
- [15] Lewis N.G., Yamamoto E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1990, 41: 455-496.
- [16] Koutaniemi S., Warinowski T., Karkonen A., et al. Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR[J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 65(3): 311-328.
- [17] Vanholme R., Cesarino I., Rataj K., et al. Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 2013, 341(6150): 1103-1106.

- [18] Shi R., Sun Y.H., Li Q., et al. Towards a systems approach for lignin biosynthesis in *Populus trichocarpa*: transcript abundance and specificity of the monolignol biosynthetic genes[J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(1): 144-163.
- [19] Koukol J., Conn E.E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*[J]. *J Biol Chem*, 1961, 236: 2692-2698.
- [20] Potts J.R., Weklych R., Conn E.E., et al. The 4-hydroxylation of cinnamic acid by sorghum microsomes and the requirement for cytochrome P-450[J]. *J Biol Chem*, 1974, 249(16): 5019-5026.
- [21] Urban P., Mignotte C., Kazmaier M., et al. Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(31): 19176-19186.
- [22] Li L., Zhou Y., Cheng X., et al. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(8): 4939-4944.
- [23] Kajita S., Hishiyama S., Tomimura Y., et al. Structural Characterization of Modified Lignin in Transgenic Tobacco Plants in Which the Activity of 4-Coumarate:Coenzyme A Ligase Is Depressed[J]. *Plant Physiol*, 1997, 114(3): 871-879.
- [24] Lee D., Meyer K., Chapple C., et al. Antisense suppression of 4-coumarate:coenzyme A ligase activity in *Arabidopsis* leads to altered lignin subunit composition[J]. *Plant Cell*, 1997, 9(11): 1985-1998.
- [25] Hamberger B., Hahlbrock K. The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(7): 2209-2214.
- [26] Hu W.J., Harding S.A., Lung J., et al. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees[J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(8): 808-812.
- [27] Franke R., Humphreys J.M., Hemm M.R., et al. The *Arabidopsis REF8* gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism[J]. *Plant J*, 2002, 30(1): 33-45.
- [28] Nair R.B., Xia Q., Kartha C.J., et al. *Arabidopsis* CYP98A3 mediating aromatic 3-hydroxylation. Developmental regulation of the gene, and expression in yeast[J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(1): 210-220.
- [29] Abdulrazzak N., Pollet B., Ehltng J., et al. A coumaroyl-ester-3-hydroxylase insertion mutant reveals the existence of nonredundant meta-hydroxylation pathways and essential roles for phenolic precursors in cell expansion and plant growth[J]. *Plant Physiol*, 2006, 140(1): 30-48.
- [30] Hoffmann L., Maury S., Martz F., et al. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(1): 95-103.
- [31] Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., et al. Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(6): 1446-1465.
- [32] Pakusch A.E., Kneusel R.E., Matern U. S-adenosyl-L-methionine:trans-caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension cultures[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1989, 271(2): 488-494.

- [33] Zhong R., Iii W.H., Negrel J., et al. Dual methylation pathways in lignin biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 1998, 10(12): 2033-2046.
- [34] Ye Z.H., Kneusel R.E., Matern U., et al. An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*[J]. *Plant Cell*, 1994, 6(10): 1427-1439.
- [35] Guo D., Chen F., Wheeler J., et al. Improvement of in-rumen digestibility of alfalfa forage by genetic manipulation of lignin O-methyltransferases[J]. *Transgenic Res*, 2001, 10(5): 457-464.
- [36] 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]. *Plant J*, 2001, 28(3): 257-270.
- [37] Halpin D.P., Riggins S., Carmichael J.D., et al. Management of coexistent carotid and coronary artery disease[J]. *South Med J*, 1994, 87(2): 187-189.
- [38] Goujon T., Ferret V., Mila I., et al. Down-regulation of the *AtCCR1* gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability[J]. *Planta*, 2003, 217(2): 218-228.
- [39] Ralph J., MacKay J.J., Hatfield R.D., et al. Abnormal lignin in a loblolly pine mutant[J]. *Science*, 1997, 277(5323): 235-239.
- [40] Franke R., McMichael C.M., Meyer K., et al. Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase[J]. *Plant J*, 2000, 22(3): 223-234.
- [41] Humphreys J.M., Chapple C. Rewriting the lignin roadmap[J]. *Current opinion in plant biology*, 2002, 5(3): 224-229.
- [42] Osakabe K., Tsao C.C., Li L., et al. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(16): 8955-8960.
- [43] Hao Z., Mohnen D. A review of xylan and lignin biosynthesis: foundation for studying *Arabidopsis* irregular xylem mutants with pleiotropic phenotypes[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2014, 49(3): 212-241.
- [44] Mitsuda N., Seki M., Shinozaki K., et al. The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(11): 2993-3006.
- [45] Mitsuda N., Iwase A., Yamamoto H., et al. NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(1): 270-280.
- [46] Mitsuda N., Ohme-Takagi M. NAC transcription factors NST1 and NST3 regulate pod shattering in a partially redundant manner by promoting secondary wall formation after the establishment of tissue identity[J]. *Plant J*, 2008, 56(5): 768-778.
- [47] Zhong R., Richardson E.A., Ye Z.H. The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(9): 2776-2792.
- [48] McCarthy R.L., Zhong R., Ye Z.H. MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(11): 1950-1964.

- [49] Ohashi-Ito K., Oda Y., Fukuda H. Arabidopsis VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 directly regulates the genes that govern programmed cell death and secondary wall formation during xylem differentiation[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(10): 3461-3473.
- [50] Yamaguchi M., Mitsuda N., Ohtani M., et al. VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 directly regulates the expression of a broad range of genes for xylem vessel formation[J]. *Plant J*, 2011, 66(4): 579-590.
- [51] Zhong R., Lee C., Zhou J., et al. A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis[J]. *Plant Cell*, 2008, 20(10): 2763-2782.
- [52] Ohman D., Demedts B., Kumar M., et al. MYB103 is required for *FERULATE-5-HYDROXYLASE* expression and syringyl lignin biosynthesis in Arabidopsis stems[J]. *Plant J*, 2013, 73(1): 63-76.
- [53] Li E., Wang S., Liu Y., et al. OVATE FAMILY PROTEIN4 (OFP4) interaction with KNAT7 regulates secondary cell wall formation in Arabidopsis thaliana[J]. *Plant J*, 2011, 67(2): 328-341.
- [54] Zhong R., Demura T., Ye Z.H. SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(11): 3158-3170.
- [55] Zhao Q., Wang H., Yin Y., et al. Syringyl lignin biosynthesis is directly regulated by a secondary cell wall master switch[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(32): 14496-14501.
- [56] Zhou J., Lee C., Zhong R., et al. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2009, 21(1): 248-266.
- [57] Nakano Y., Yamaguchi M., Endo H., et al. NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants[J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 288.
- [58] Cassan-Wang H., Goue N., Saidi M.N., et al. Identification of novel transcription factors regulating secondary cell wall formation in *Arabidopsis*[J]. *Front Plant Sci*, 2013, 4: 189.
- [59] Hussey S.G., Mizrachi E., Creux N.M., et al. Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition[J]. *Front Plant Sci*, 2013, 4: 325.
- [60] Preston J., Wheeler J., Heazlewood J., et al. AtMYB32 is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant J*, 2004, 40(6): 979-995.
- [61] Ko J.H., Kim W.C., Han K.H. Ectopic expression of MYB46 identifies transcriptional regulatory genes involved in secondary wall biosynthesis in Arabidopsis[J]. *Plant J*, 2009, 60(4): 649-665.
- [62] Zhong R., Ye Z.H. MYB46 and MYB83 bind to the SMRE sites and directly activate a suite of transcription factors and secondary wall biosynthetic genes[J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(2): 368-380.
- [63] Bhargava A., Mansfield S.D., Hall H.C., et al. MYB75 functions in regulation of secondary cell wall formation in the Arabidopsis inflorescence stem[J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(3): 1428-1438.
- [64] Bhargava A., Ahad A., Wang S., et al. The interacting MYB75 and KNAT7 transcription factors modulate secondary cell wall deposition both in stems and seed coat in *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2013, 237(5): 1199-1211.
- [65] Ballesteros M.a.L., Bolle C., Lois L.M., et al. LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signaling[J]. *Genes & development*, 2001, 15(19): 2613-2625.

- [66] Etchells J.P., Provost C.M., Turner S.R. Plant vascular cell division is maintained by an interaction between PXY and ethylene signalling[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(11): e1002997.
- [67] Legay S., Sivadon P., Blervacq A.S., et al. EgMYB1, an R2R3 MYB transcription factor from eucalyptus negatively regulates secondary cell wall formation in Arabidopsis and poplar[J]. *New Phytol*, 2010, 188(3): 774-786.
- [68] Bedon F., Grima-Pettenati J., Mackay J. Conifer R2R3-MYB transcription factors: sequence analyses and gene expression in wood-forming tissues of white spruce (*Picea glauca*)[J]. *BMC Plant Biology*, 2007, 7(1): 1.
- [69] Patzlaff A., McInnis S., Courtenay A., et al. Characterisation of a pine MYB that regulates lignification[J]. *Plant J*, 2003, 36(6): 743-754.
- [70] Patzlaff A., Newman L.J., Dubos C., et al. Characterisation of PtMYB1, an R2R3-MYB from pine xylem[J]. *PLANT MOL BIOL*, 2003, 53(4): 597-608.
- [71] Penfield S., Meissner R.C., Shoue D.A., et al. MYB61 is required for mucilage deposition and extrusion in the Arabidopsis seed coat[J]. *Plant Cell*, 2001, 13(12): 2777-2791.
- [72] Tamagnone L., Merida A., Parr A., et al. The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from antirrhinum regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco[J]. *Plant Cell*, 1998, 10(2): 135-154.
- [73] Yang C., Xu Z., Song J., et al. Arabidopsis MYB26/MALE STERILE35 regulates secondary thickening in the endothecium and is essential for anther dehiscence[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(2): 534-548.
- [74] Zhao Q., Wang H., Yin Y., et al. Syringyl lignin biosynthesis is directly regulated by a secondary cell wall master switch[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(32): 14496-14501.
- [75] Ko J.H., Kim W.C., Han K.H. Ectopic expression of MYB46 identifies transcriptional regulatory genes involved in secondary wall biosynthesis in Arabidopsis[J]. *Plant J*, 2009, 60(4): 649-665.
- [76] McCarthy R.L., Zhong R., Ye Z.-H. MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis[J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(11): 1950-1964.
- [77] Zhong R., Ye Z.-H. Transcriptional regulation of lignin biosynthesis[J]. *Plant Signal Behav*, 2009, 4(11): 1028-1034.
- [78] McCarthy R.L., Zhong R., Fowler S., et al. The poplar MYB transcription factors, PtrMYB3 and PtrMYB20, are involved in the regulation of secondary wall biosynthesis[J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(6): 1084-1090.
- [79] Zhong R., Ye Z.H. Regulation of cell wall biosynthesis[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10(6): 564-572.
- [80] Goicoechea M., Lacombe E., Legay S., et al. EgMYB2, a new transcriptional activator from Eucalyptus xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis[J]. *Plant J*, 2005, 43(4): 553-567.
- [81] Zhao K., Bartley L.E. Comparative genomic analysis of the R2R3 MYB secondary cell wall regulators of Arabidopsis, poplar, rice, maize, and switchgrass[J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1): 1.
- [82] Fornale S., Shi X., Chai C., et al. ZmMYB31 directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux[J]. *Plant J*, 2010, 64(4): 633-644.
- [83] Sonbol F.M., Fornale S., Capellades M., et al. The maize ZmMYB42 represses the

- phenylpropanoid pathway and affects the cell wall structure, composition and degradability in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 70(3): 283-296.
- [84] Ma Q.-H., Wang C., Zhu H.-H. TaMYB4 cloned from wheat regulates lignin biosynthesis through negatively controlling the transcripts of both cinnamyl alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase genes[J]. *Biochimie*, 2011, 93(7): 1179-1186.
- [85] Shen H., He X., Poovaiah C.R., et al. Functional characterization of the switchgrass (*Panicum virgatum*) R2R3-MYB transcription factor PvMYB4 for improvement of lignocellulosic feedstocks[J]. *New Phytol*, 2012, 193(1): 121-136.
- [86] Mahjoub A., Hernould M., Joubès J., et al. Overexpression of a grapevine R2R3-MYB factor in tomato affects vegetative development, flower morphology and flavonoid and terpenoid metabolism[J]. *PLANT PHYSIOL BIOCH*, 2009, 47(7): 551-561.
- [87] Hussey S.G., Mizrachi E., Spokevicius A.V., et al. SND2, a NAC transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell wall development in *Arabidopsis* fibres and increases fibre cell area in *Eucalyptus*[J]. *BMC Plant Biol*, 2011, 11: 173.
- [88] Zhong R., Richardson E.A., Ye Z.H. Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2007, 225(6): 1603-1611.
- [89] Zhong R., Ye Z.H. The *Arabidopsis* NAC transcription factor NST2 functions together with SND1 and NST1 to regulate secondary wall biosynthesis in fibers of inflorescence stems[J]. *Plant Signal Behav*, 2015, 10(2): e989746.
- [90] Zhao C., Avci U., Grant E.H., et al. XND1, a member of the NAC domain family in *Arabidopsis thaliana*, negatively regulates lignocellulose synthesis and programmed cell death in xylem[J]. *Plant J*, 2008, 53(3): 425-436.
- [91] Zhou J., Zhong R., Ye Z.-H. *Arabidopsis* NAC domain proteins, VND1 to VND5, are transcriptional regulators of secondary wall biosynthesis in vessels[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105726.
- [92] Yamaguchi M., Goue N., Igarashi H., et al. VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 and VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 effectively induce transdifferentiation into xylem vessel elements under control of an induction system[J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(3): 906-914.
- [93] Yamaguchi M., Kubo M., Fukuda H., et al. VASCULAR - RELATED NAC - DOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in *Arabidopsis* roots and shoots[J]. *Plant J*, 2008, 55(4): 652-664.
- [94] Zhong R., McCarthy R.L., Lee C., et al. Dissection of the transcriptional program regulating secondary wall biosynthesis during wood formation in poplar[J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(3): 1452-1468.
- [95] Zhao Y., Sun J., Xu P., et al. Intron-mediated alternative splicing of WOOD-ASSOCIATED NAC TRANSCRIPTION FACTOR1B regulates cell wall thickening during fiber development in *Populus* species[J]. *Plant Physiol*, 2014, 164(2): 765-776.
- [96] Zhong R., Lee C., Ye Z.H. Functional characterization of poplar wood-associated NAC domain transcription factors[J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(2): 1044-1055.
- [97] Ohtani M., Nishikubo N., Xu B., et al. A NAC domain protein family contributing to the regulation of wood formation in poplar[J]. *Plant J*, 2011, 67(3): 499-512.
- [98] Zhong R., McCarthy R.L., Lee C., et al. Dissection of the transcriptional program

- regulating secondary wall biosynthesis during wood formation in poplar[J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(3): 1452-1468.
- [99] Wang H., Tang R., Liu H., et al. Chimeric repressor of PtSND2 severely affects wood formation in transgenic *Populus*[J]. *Tree Physiol*, 2013, 33(8): 878-886.
- [100] Grant E.H., Fujino T., Beers E.P., et al. Characterization of NAC domain transcription factors implicated in control of vascular cell differentiation in *Arabidopsis* and *Populus*[J]. *Planta*, 2010, 232(2): 337-352.
- [101] Zhao Q., Gallego-Giraldo L., Wang H., et al. An NAC transcription factor orchestrates multiple features of cell wall development in *Medicago truncatula*[J]. *Plant J*, 2010, 63(1): 100-114.
- [102] Valdivia E.R., Herrera M.T., Gianzo C., et al. Regulation of secondary wall synthesis and cell death by NAC transcription factors in the monocot *Brachypodium distachyon*[J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(5): 1333-1343.
- [103] Wang S., Li E., Porth I., et al. Regulation of secondary cell wall biosynthesis by poplar R2R3 MYB transcription factor PtrMYB152 in *Arabidopsis*[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5054.
- [104] Xu Q., Wang W., Zeng J., et al. A NAC transcription factor, EjNAC1, affects lignification of loquat fruit by regulating lignin[J]. *POSTHARVEST BIOL TEC*, 2015, 102: 25-31.
- [105] Xu Q., Yin X.R., Zeng J.K., et al. Activator- and repressor-type MYB transcription factors are involved in chilling injury induced flesh lignification in loquat via their interactions with the phenylpropanoid pathway[J]. *J Exp Bot*, 2014, 65(15): 4349-4359.
- [106] Zhu L., Shan H., Chen S., et al. The heterologous expression of the chrysanthemum R2R3-MYB transcription factor CmMYB1 alters lignin composition and represses flavonoid synthesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65680.
- [107] Yoshida K., Sakamoto S., Kawai T., et al. Engineering the *Oryza sativa* cell wall with rice NAC transcription factors regulating secondary wall formation[J]. *Front Plant Sci*, 2013, 4: 383.
- [108] Sun X., Gong S.Y., Nie X.Y., et al. A R2R3-MYB transcription factor that is specifically expressed in cotton (*Gossypium hirsutum*) fibers affects secondary cell wall biosynthesis and deposition in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Physiol Plant*, 2015, 154(3): 420-432.
- [109] Omer S., Kumar S., Khan B.M. Over-expression of a subgroup 4 R2R3 type MYB transcription factor gene from *Leucaena leucocephala* reduces lignin content in transgenic tobacco[J]. *Plant Cell Rep*, 2013, 32(1): 161-171.
- [110] Zhang S., Ma P., Yang D., et al. Cloning and characterization of a putative R2R3 MYB transcriptional repressor of the rosmarinic acid biosynthetic pathway from *Salvia miltiorrhiza*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73259.
- [111] Zhang Z., Zhao J., Hu Y., et al. Isolation of GhMYB9 gene promoter and characterization of its activity in transgenic cotton[J]. *Biol Plantarum*, 2015, 59(4): 629-636.
- [112] Zhang L., Liu G., Jia J., et al. The wheat MYB - related transcription factor TaMYB72 promotes flowering in rice[J]. *J INTEGR PLANT BIOL*, 2015:
- [113] Chai G., Wang Z., Tang X., et al. R2R3-MYB gene pairs in *Populus*: evolution and contribution to secondary wall formation and flowering time[J]. *J EXP BOT*, 2014: eru196.
- [114] Zhao J., Liu J.S., Meng F.N., et al. ANAC005 is a membrane - associated transcription factor and regulates vascular development in *Arabidopsis*[J]. *J INTEGR PLANT BIOL*, 2015:
- [115] Endo H., Yamaguchi M., Tamura T., et al. Multiple classes of transcription factors

- regulate the expression of *VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7*, a master switch of xylem vessel differentiation[J]. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56(2): 242-254.
- [116] Scully E.D., Gries T., Sarath G., et al. Overexpression of SbMyb60 Impacts Phenylpropanoid Biosynthesis and Alters Secondary Cell Wall Composition in *Sorghum bicolor*[J]. *Plant J*, 2015:
- [117] Cutanda-Perez M.-C., Ageorges A., Gomez C., et al. Ectopic expression of *VlmybA1* in grapevine activates a narrow set of genes involved in anthocyanin synthesis and transport[J]. *PLANT MOL BIOL REP*, 2009, 69(6): 633-648.
- [118] Bogs J., Jaffé F.W., Takos A.M., et al. The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development[J]. *Plant physiol*, 2007, 143(3): 1347-1361.
- [119] Terrier N., Torregrosa L., Ageorges A., et al. Ectopic expression of VvMybPA2 promotes proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway[J]. *Plant physiol*, 2009, 149(2): 1028-1041.
- [120] Sainz M.B., Grotewold E., Chandler V.L. Evidence for direct activation of an anthocyanin promoter by the maize C1 protein and comparison of DNA binding by related Myb domain proteins[J]. *Plant Cell*, 1997, 9(4): 611-625.
- [121] Schaart J.G., Dubos C., Romero De La Fuente I., et al. Identification and characterization of MYB - bHLH - WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits[J]. *NEW PHYTOL*, 2013, 197(2): 454-467.
- [122] Taylor G. *Populus: Arabidopsis for forestry. Do we need a model tree?*[J]. *Annals of Botany*, 2002, 90(6): 681-689.
- [123] Jansson S., Douglas C.J. *Populus: a model system for plant biology*[J]. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2007, 58: 435-458.
- [124] Taylor-Teeples M., Lin L., de Lucas M., et al. An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis[J]. *Nature*, 2015, 517(7536): 571-575.
- [125] Chen S., Songkumarn P., Liu J., et al. A versatile zero background T-vector system for gene cloning and functional genomics[J]. *Plant Physiol*, 2009, 150(3): 1111-1121.
- [126] 黄培堂. J. 萨姆布鲁克[J]. DW 拉赛尔. 分子克隆实验指南 (第三版), 2002, 26: 27-96.
- [127] Jaakola L., Pirttilä A.M., Halonen M., et al. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit[J]. *Molecular biotechnology*, 2001, 19(2): 201-203.
- [128] Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *The EMBO journal*, 1987, 6(13): 3901.
- [129] 李敏, 杨双, 阮燕晔, et al. 拟南芥 T-DNA 插入突变体 *atsuc3* 的 PCR 鉴定[J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42(1): 91-94.
- [130] Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method[J]. *methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [131] Liew C.-F., Loh C.-S., Goh C.-J., et al. The isolation, molecular characterization and expression of dihydroflavonol 4-reductase cDNA in the orchid, *Bromheadia finlaysoniana*[J]. *Plant sci*, 1998, 135(2): 161-169.
- [132] Luo K., Zheng X., Chen Y., et al. The maize *Knotted1* gene is an effective positive selectable marker gene for *Agrobacterium*-mediated tobacco transformation[J]. *PLANT CELL*

- REP, 2006, 25(5): 403-409.
- [133] Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. ANAL BIOCHEM, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [134] Dean J.F. Lignin analysis[J]. Methods in plant biochemistry and molecular biology, 1997: 199-215.
- [135] Wang Z., Zhang H., Yang J., et al. Phylogenetic, expression, and bioinformatic analysis of the ABC1 gene family in *Populus trichocarpa*[J]. Sci World J, 2013, 2013:
- [136] Maimon T., Elad N., Dahan I., et al. The human nuclear pore complex as revealed by cryo-electron tomography[J]. Structure, 2012, 20(6): 998-1006.
- [137] Wang M.M., Reed R.R. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast[J]. Nature, 1993, 364(6433): 121-126.
- [138] Alexander M.K., Bourms B.D., Zakian V.A. One-Hybrid Systems for Detecting Protein-DNA Interactions[J]. Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols, 2001: 241-259.
- [139] Ooka H., Satoh K., Doi K., et al. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*[J]. DNA Res, 2003, 10(6): 239-247.
- [140] Chaffey N., Cholewa E., Regan S., et al. Secondary xylem development in *Arabidopsis*: a model for wood formation[J]. Physiol Plant, 2002, 114(4): 594-600.
- [141] Olsen A.N., Ernst H.A., Lo Leggio L., et al. Preliminary crystallographic analysis of the NAC domain of ANAC, a member of the plant-specific NAC transcription factor family[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2004, 60(1): 112-115.
- [142] Vroemen C.W., Mordhorst A.P., Albrecht C., et al. The CUP-SHAPED COTYLEDON3 gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2003, 15(7): 1563-1577.
- [143] Kim Y.-S., Kim S.-G., Park J.-E., et al. A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2006, 18(11): 3132-3144.
- [144] Kubo M., Udagawa M., Nishikubo N., et al. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation[J]. GENE DEV, 2005, 19(16): 1855-1860.
- [145] Zhao Y., Sun J., Xu P., et al. Intron-mediated alternative splicing of WOOD-ASSOCIATED NAC TRANSCRIPTION FACTOR1B regulates cell wall thickening during fiber development in *Populus* species[J]. Plant Physiol, 2014, 164(2): 765-776.
- [146] Hardtke C.S., Berleth T. The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development[J]. EMBO j, 1998, 17(5): 1405-1411.
- [147] Sun X., Gong S.Y., Nie X.Y., et al. A R2R3 - MYB transcription factor that is specifically expressed in cotton (*Gossypium hirsutum*) fibers affects secondary cell wall biosynthesis and deposition in transgenic *Arabidopsis*[J]. PHYSIOL PLANTARUM, 2015, 154(3): 420-432.
- [148] Yang L., Zhao X., Yang F., et al. PtrWRKY19, a novel WRKY transcription factor, contributes to the regulation of pith secondary wall formation in *Populus trichocarpa*[J]. Sci Rep, 2016, 6: 18643.
- [149] Li P., Ponnala L., Gandotra N., et al. The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome[J]. Nat Genet, 2010, 42(12): 1060-1067.
- [150] Xu B., Ohtani M., Yamaguchi M., et al. Contribution of NAC transcription factors to

- plant adaptation to land[J]. *Science*, 2014, 343(6178): 1505-1508.
- [151] Pyo H., Demura T., Fukuda H. TERE; a novel cis-element responsible for a coordinated expression of genes related to programmed cell death and secondary wall formation during differentiation of tracheary elements[J]. *Plant J*, 2007, 51(6): 955-965.
- [152] Zhong R., Lee C., Ye Z.H. Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in *Arabidopsis*[J]. *Mol Plant*, 2010, 3(6): 1087-1103.
- [153] Feller A., Machemer K., Braun E.L., et al. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors[J]. *Plant J*, 2011, 66(1): 94-116.
- [154] Haga N., Kato K., Murase M., et al. R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Development*, 2007, 134(6): 1101-1110.
- [155] Jia L., Clegg M.T., Jiang T. Evolutionary dynamics of the DNA-binding domains in putative R2R3-MYB genes identified from rice subspecies indica and japonica genomes[J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(2): 575-585.
- [156] Ko J.-H., Han K.-H., Park S., et al. Plant body weight-induced secondary growth in *Arabidopsis* and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling[J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(2): 1069-1083.
- [157] Paux E., Carocha V., Marques C., et al. Transcript profiling of Eucalyptus xylem genes during tension wood formation[J]. *New Phytol*, 2005, 167(1): 89-100.
- [158] Schrader J., Nilsson J., Mellerowicz E., et al. A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(9): 2278-2292.
- [159] Jin H., Cominelli E., Bailey P., et al. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV - protecting sunscreens in *Arabidopsis*[J]. *EMBO j*, 2000, 19(22): 6150-6161.
- [160] Prestridge D.S. SIGNAL SCAN: a computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements[J]. *Comput Appl Biosci*, 1991, 7(2): 203-206.
- [161] Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M., et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999[J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 297-300.
- [162] Lescot M., Dehais P., Thijs G., et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1): 325-327.
- [163] Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method[J]. *methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [164] Fan D., Liu T., Li C., et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in *Populus* in the First Generation[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12217.
- [165] Sander J.D., Maeder M.L., Reyon D., et al. ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Web Server issue): W462-468.
- [166] Engler C., Gruetzner R., Kandzia R., et al. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes[J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5553.
- [167] Hofgen R., Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation[J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(20): 9877.
- [168] Xu N., Zhang W., Ren S., et al. Hemicelluloses negatively affect lignocellulose crystallinity for high biomass digestibility under NaOH and H₂SO₄ pretreatments in

- Miscanthus[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2012, 5(1): 58.
- [169] Li F., Zhang M., Guo K., et al. High-level hemicellulosic arabinose predominately affects lignocellulose crystallinity for genetically enhancing both plant lodging resistance and biomass enzymatic digestibility in rice mutants[J]. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(4): 514-525.
- [170] Stracke R., Werber M., Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(5): 447-456.
- [171] Fornale S., Sonbol F.M., Maes T., et al. Down-regulation of the *maize* and *Arabidopsis thaliana* caffeic acid O-methyl-transferase genes by two new maize R2R3-MYB transcription factors[J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 62(6): 809-823.
- [172] Yoshida K., Ma D., Constabel C.P. The MYB182 protein down-regulates proanthocyanidin and anthocyanin biosynthesis in poplar by repressing both structural and regulatory flavonoid genes[J]. *Plant Physiol*, 2015, 167(3): 693-710.
- [173] Kagale S., Rozwadowski K. EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: an underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression[J]. *Epigenetics*, 2011, 6(2): 141-146.
- [174] Matsui K., Umemura Y., Ohme-Takagi M. AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, 2008, 55(6): 954-967.
- [175] Sadowski I., Ma J., Triezenberg S., et al. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator[J]. *Nature*, 1988, 335(6190): 563-564.
- [176] Larson P.R., Isebrands J. The plastochron index as applied to developmental studies of cottonwood[J]. *CAN J FOREST RES*, 1971, 1(1): 1-11.
- [177] Chaffey N., Barlow P. Myosin, microtubules, and microfilaments: co-operation between cytoskeletal components during cambial cell division and secondary vascular differentiation in trees[J]. *Planta*, 2002, 214(4): 526-536.
- [178] Hisano H., Nandakumar R., Wang Z.-Y. Genetic modification of lignin biosynthesis for improved biofuel production[J]. *IN VITRO CELL DEV-PL*, 2009, 45(3): 306-313.
- [179] Chen F., Dixon R.A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production[J]. *Nature biotechnol*, 2007, 25(7): 759-761.
- [180] Ratke C., Pawar P.M., Balasubramanian V.K., et al. *Populus* GT43 family members group into distinct sets required for primary and secondary wall xylan biosynthesis and include useful promoters for wood modification[J]. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(1): 26-37.
- [181] Wei C., Liu J., Yu Z., et al. TALEN or Cas9 - rapid, efficient and specific choices for genome modifications[J]. *J Genet Genomics*, 2013, 40(6): 281-289.
- [182] 刘婷婷, 范迪, 冉玲玉, et al. 应用 CRISPR/Cas9 技术在杨树中高效敲除多个靶基因[J]. *遗传*, 2015, 37(10): 1044-1052.
- [183] Karpinska B., Karlsson M., Srivastava M., et al. MYB transcription factors are differentially expressed and regulated during secondary vascular tissue development in hybrid aspen[J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 56(2): 255-270.
- [184] Patzlaff A., McInnis S., Courtenay A., et al. Characterisation of a pine MYB that regulates lignification[J]. *Plant J*, 2003, 36(6): 743-754.
- [185] Jiang L., Wang Y., Bjorn L.O., et al. UV-B-induced DNA damage mediates expression changes of cell cycle regulatory genes in *Arabidopsis* root tips[J]. *Planta*, 2011, 233(4): 831-841.

- [186] Biggs R., Kossuth S. Impact of solar UV-B radiation on crop productivity[J]. Final report of UV-B biological and climate effects research. Terrestrial FY, 1978, 77: 11-77.
- [187] Teramura A.H., Sullivan J.H., Lydon J. Effects of UV - B radiation on soybean yield and seed quality: a 6 - year field study[J]. *Physiol plantarum*, 1990, 80(1): 5-11.
- [188] Riquelme E., Tang M., Baez S., et al. Frequent epigenetic inactivation of chromosome 3p candidate tumor suppressor genes in gallbladder carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2007, 250(1): 100-106.
- [189] Tsoyi K., Park H.B., Kim Y.M., et al. Anthocyanins from black soybean seed coats inhibit UVB-induced inflammatory *cylooxygenase-2* gene expression and PGE2 production through regulation of the nuclear factor- κ B and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway[J]. *J AGR FOOD CHEM*, 2008, 56(19): 8969-8974.
- [190] Tohge T., Kusano M., Fukushima A., et al. Transcriptional and metabolic programs following exposure of plants to UV-B irradiation[J]. *Plant signaling & behavior*, 2011, 6(12): 1987-1992.
- [191] Oravecz A., Baumann A., Mate Z., et al. CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 is required for the UV-B response in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(8): 1975-1990.
- [192] Jenkins G.I. Signal transduction in responses to UV-B radiation[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2009, 60: 407-431.
- [193] Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., et al. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds[J]. *Planta*, 1999, 207(4): 604-611.
- [194] Singleton V., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents[J]. *AMJ ENOL VITICULT*, 1965, 16(3): 144-158.
- [195] 孙鹏.拟南芥黄烷酮-3-羟化酶调控非生物胁迫抗性机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学 2014.
- [196] 袁丽.杨树单宁合成关键酶基因 LARs 和 ANR 的功能分析[D]. 西南大学 2012.
- [197] Ryan K.G., Swinny E.E., Winefield C., et al. Flavonoids and UV photoprotection in *Arabidopsis* mutants[J]. *Z Naturforsch C*, 2001, 56(9-10): 745-754.
- [198] Zhang B., Hu Z., Zhang Y., et al. A putative functional MYB transcription factor induced by low temperature regulates anthocyanin biosynthesis in purple kale (*Brassica Oleracea* var. *acephala* f. *tricolor*)[J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(2): 281-289.
- [199] Chapple C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases[J]. *ANNU REV PLANT BIOL*, 1998, 49(1): 311-343.
- [200] Shirley B.W., Kubasek W.L., Storz G., et al. Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis[J]. *Plant J*, 1995, 8(5): 659-671.
- [201] Huang J., Gu M., Lai Z., et al. Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress[J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(4): 1526-1538.
- [202] Kitamura S., Shikazono N., Tanaka A. TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, 2004, 37(1): 104-114.
- [203] Pourcel L., Routaboul J.M., Kerhoas L., et al. TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(11): 2966-2980.

- [204] Marles M., Gruber M.Y. Histochemical characterisation of unextractable seed coat pigments and quantification of extractable lignin in the Brassicaceae[J]. J SCI FOOD AGR, 2004, 84(3): 251-262.
- [205] Agati G., Biricolti S., Guidi L., et al. The biosynthesis of flavonoids is enhanced similarly by UV radiation and root zone salinity in *L. vulgare* leaves[J]. J Plant Physiol, 2011, 168(3): 204-212.
- [206] Cerovic Z., Ounis A., Cartelat A., et al. The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non - destructive in situ assessment of UV - absorbing compounds in leaves[J]. PLANT CELL ENVIRON, 2002, 25(12): 1663-1676.
- [207] Kolb C.A., Käser M.A., Kopecký J., et al. Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves[J]. Plant physiol, 2001, 127(3): 863-875.
- [208] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology[J]. Plant physiol, 2001, 126(2): 485-493.
- [209] Schmitz G., Tillmann E., Carriero F., et al. The tomato *Blind* gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(2): 1064-1069.
- [210] Steiner - Lange S., Unte U.S., Eckstein L., et al. Disruption of *Arabidopsis thaliana* MYB26 results in male sterility due to non - dehiscent anthers[J]. Plant J, 2003, 34(4): 519-528.
- [211] Matsui K., Umemura Y., Ohme - Takagi M. AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. Plant J, 2008, 55(6): 954-967.
- [212] Liu J., Osbourn A., Ma P. MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants[J]. Mol Plant, 2015, 8(5): 689-708.
- [213] Fornalé S., Shi X., Chai C., et al. ZmMYB31 directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux[J]. Plant J, 2010, 64(4): 633-644.
- [214] Sagasser M., Lu G.H., Hahlbrock K., et al. *A. thaliana* TRANSPARENT TESTA 1 is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins[J]. Genes Dev, 2002, 16(1): 138-149.
- [215] Lepiniec L., Debeaujon I., Routaboul J.M., et al. Genetics and biochemistry of seed flavonoids[J]. Annu Rev Plant Biol, 2006, 57: 405-430.
- [216] von Wettstein D. From analysis of mutants to genetic engineering[J]. Annu. Rev. Plant Biol., 2007, 58: 1-19.

致 谢

岁月流转、时光飞逝，不经意间七年的研究生生涯即将结束。回首过往，思绪万千。二十几年的寒窗苦读，在每一个重要的人生关口，有过成功的喜悦，也有过失败的沮丧。而如今，内心只有平淡的坦然。在美丽的西南大学待过的二千三百多个日日夜夜，有太多的人和经历的事情值得珍藏和回味，我将铭记并感恩于心。

首先，衷心感谢恩师罗克明教授的悉心指导，使我得以顺利完成博士阶段的学习。在学术钻研上，罗老师投入了极大的精力和耐心给予我帮助，也见证了我的成长。从论文的选题、实验的设计、结果的分析，乃至大小论文撰写上的字斟句酌，都倾注了您的汗水和心血。您开阔的科研视野、精益求精的学术作风、孜孜不倦的工作态度，给我留下了深刻的印象，是我今后学习的楷模。能够在您的指导下完成我的博士学业是我的幸运，值此论文完成之际，再次向您致以我最诚挚的谢意！

在这里，我还要特别感谢我的另一位恩师汤绍虎教授。汤老师为人谦和、学识渊博，无论是在学术上还是生活上，都给予了我极大的指导和鼓励，是激励我从事科研的启蒙老师，也是一位教我生活积极向上的洒脱学者。

特别感谢孙敏教授给我提供的无私帮助及指导，孙老师平易近人、求实治学以及谦逊敬业的精神使我深受感染。

感谢范迪老师在我的实验和毕业论文上提供的宝贵建议及指导；感谢生命科学学院所有培养和帮助过我的老师们：曾波老师、王邦俊老师、谈锋老师、邓洪平老师、杨蕊老师、陈亚飞老师、唐知然老师等。

感谢资源植物研究所所有一起学习过的老师们，曾经的同门战友们、各位师弟师妹们在学习和生活中给予的热情帮助，感谢你们长期的朝夕共处和相互扶持，感谢有你们营造的欢笑和快乐。

特别感谢我的父母多年来对我学业的理解和支持，因为我的求学之路压弯了父母的腰；感谢我懂事的弟弟，替我弥补不能近亲尽孝的愧疚。感谢男朋友的理解、疼惜与等待。衷心祝愿爱我和我爱的亲人们健康平安，福寿相伴！

最后，向参加本论文评阅、答辩和对本论文提出宝贵意见的所有专家、朋友致以最真诚的谢意和最良好的祝愿！

2016年4月于西大29教



攻读学位期间发表学术成果

- [1] **Li Yang**, Xin Zhao, Fan Yang, Di Fan, Yuanzhong Jiang & Keming Luo*. PtrWRKY19, a novel WRKY transcription factor, contributes to the regulation of pith secondary wall formation in *Populus trichocarpa*. (2016), Scientific Reports, DOI: 10.1038/srep18643 (IF=5.597).
- [2] **Li Yang**, Yisu Hou, Xin Zhao, Wanxiang Lu, Yongli Li, Fan Yang, Shaohu Tang*, Keming Luo*. Identification and characterization of a wood-associated NAC domain transcription factor PtoVNS11 from *Populus tomentosa*, 2015, TREES-STRUCT FUNCT, 2015, DOI 10.1007/s00468-015-1188-1(IF=1.928).
- [3] **Li Yang**, Xin Zhao, Rui Liu, Le Lin, Chaofeng Li, Keming Luo*. PtoMYB156 is involved in negative regulation of secondary wall biosynthesis in poplar (Plant journal, Under review).
- [4] **Li Yang**, et al., PtoMYB156, a flavonol-specific R2R3-MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis, controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*.(In written)
- [5] **Li Yang**, Yisu Hou, Xin Zhao, Yuanzhong Jiang. Molecular characterization of *PtoSND1-A2* in *Populus tomentosa* Carr.2013.(Abstract, The Conference of 14th Plant Genomics in China).
- [6] Huang Y, Gou JQ, Jia ZC, **Yang L**, Sun YM, Xiao XY, Song F, Luo KM.Molecular Cloning and Characterization of Two Genes Encoding Dihydroflavonol-4-Reductase from *Populus trichocarpa*, PLoS ONE 7(2): e30364.2012.