



### 毛竹*C4H*基因的鉴定及其表达模式分析

李广柱, 朱成磊, 杨克彬, 王新悦, 高志民

引用本文:

李广柱, 朱成磊, 杨克彬, 王新悦, 高志民. 毛竹*C4H*基因的鉴定及其表达模式分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2022, 30(2): 151–160.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4455>

---

### 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

#### 毛竹APX家族基因鉴定和表达分析

Identification and Expression Analysis of the APX Gene Family in *Phyllostachys edulis*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 255–264 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4155>

#### 铁皮石斛WOX转录因子的鉴定和分析

Identification and Analysis of WOX Transcription Factor in *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(3): 301–310 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4294>

#### 马尾松*PmPGK1*和*PmGPIC*基因的克隆和表达分析

Cloning and Expression Analysis on *PmPGK1* and *PmGPIC* Genes in *Pinus massoniana*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(4): 339–348 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4315>

#### 铁皮石斛*DoSMT2*基因的克隆与表达分析

Cloning and Expression Analysis of *DoSMT2* Gene in *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(6): 591–598 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4234>

#### 毛竹油菜素内酯受体激酶基因的分子特征及表达模式分析

Molecular Characteristics and Expression Analysis of Brassinolide Receptor Kinase Genes in *Phyllostachys edulis*

热带亚热带植物学报. 2018, 26(3): 215–223 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3818>

向下翻页, 浏览PDF全文

# 毛竹 *C4H* 基因的鉴定及其表达模式分析

李广柱, 朱成磊, 杨克彬, 王新悦, 高志民\*

(国际竹藤中心竹藤资源基因科学与基因产业化研究所, 国家林业和草原局/北京市共建竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102)

**摘要:** 为了解毛竹(*Phyllostachys edulis*)中肉桂酸-4-羟化酶基因(*C4H*)的分子特征及其表达模式, 采用生物信息学方法在毛竹基因组数据库中鉴定出 6 个 *C4H* 成员(*PeC4H1~PeC4H6*), 基因编码区长度为 1 506~1 695 bp, 推测编码 501~564 aa, 均具有保守的血红素结合域、苏氨酸结合槽基序和 5 个特征性底物识别位点, 属于细胞色素 P450 超家族。系统进化分析表明, 6 个 *PeC4Hs* 可分为 2 类, 分别含有 2 和 4 个成员。转录组数据分析表明, *PeC4Hs* 在毛竹 26 个组织中的表达量存在明显差异, 不同高度笋中 *PeC4Hs* 的表达差异显著。*PeC4Hs* 启动子序列中含有多种响应逆境胁迫和激素信号的顺式调控元件, *PeC4Hs* 表达受干旱和 GA<sub>3</sub> 的影响, 干旱时, 仅 *PeC4H3/4* 在根中显著上调表达, 其余成员均呈下调表达; GA<sub>3</sub> 处理下叶中 *PeC4H3/6* 迅速响应, 呈先显著上调后逐渐降低的趋势, 根中 *PeC4H2/5* 在处理前 1 h 短暂下调后又显著上调, 至 8 h 时恢复到处理前的表达水平。因此, *PeC4Hs* 可能在毛竹笋的木质化过程和应对非生物胁迫中发挥着重要作用。

**关键词:** 毛竹; 肉桂酸-4-羟化酶; 生物信息; 基因表达

doi: 10.11926/jtsb.4455

## Identification and Expression Pattern Analysis of *C4H* Genes in *Phyllostachys edulis*

LI Guangzhu, ZHU Chenglei, YANG Kebin, WANG Xinyue, GAO Zhimin\*

(Institute of Gene Science and Industrialization for Bamboo and Rattan Resources, International Center for Bamboo and Rattan, Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration/Beijing for Bamboo & Rattan Science and Technology, Beijing 100102, China)

**Abstract:** To reveal the molecular characteristics and expression pattern of *C4H* genes in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*), six *C4H* gene members (*PeC4H1~PeC4H6*) from moso bamboo genomic database were identified by bioinformatics method. The length of gene coding region ranged from 1 506 to 1 695 bp, encoding 501-564 aa, and all of them have conserved heme binding domain, threonine binding channel motif and five characteristic substrate recognition sites, which belong to the cytochrome P450 superfamily. Phylogenetic analysis showed that the six *PeC4Hs* could be divided into two classes, containing 2 and 4 members, respectively. Transcriptome analysis showed that there were significant differences in the expression of *PeC4Hs* in 26 tissues of moso bamboo, and the expression of *PeC4Hs* in bamboo shoots at different heights were different by qPCR. There were a variety of *cis*-regulatory elements in response to stress and hormone signals in the promoter sequences of *PeC4Hs*. The expression of *PeC4Hs* was affected by drought and GA<sub>3</sub>. Under drought, only *PeC4H3/4* expression was significantly up-regulated in roots, while others were down-regulated. Treated by GA<sub>3</sub>, the expression of *PeC4H3/6* in leaves was responded rapidly and significantly up-regulated at first and then gradually decreased. The expression of *PeC4H2/5* in roots was briefly down-regulated in the first hour and then

收稿日期: 2021-06-02

接受日期: 2021-07-28

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD2200502); 国家自然科学基金项目(31971736)资助

This work was supported by the National Key Research & Development Program of China (Grant No. 2021YFD2200502), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31971736).

作者简介: 李广柱, 男, 硕士研究生, 研究方向为竹藤分子育种。E-mail: liguangzhu@icbr.ac.cn

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: gaozhimin@icbr.ac.cn

significantly increased, finally recovered to the untreated level at 8 h. Therefore, *PeC4Hs* might play an important role in the lignification process of bamboo shoot and the response to abiotic stress.

**Key words:** *Phyllostachys edulis*; Cinnamate 4-hydroxylase; Bioinformatics; Gene expression

肉桂酸-4-羟化酶(C4H, EC 1.14.13.11)属于细胞色素 P450 单氧化酶(CYP73)亚家族,被认为是木质素合成通路中最为保守的蛋白家族<sup>[1]</sup>,由约 500 个氨基酸组成球蛋白,中心位置含有 1 个由  $\alpha$ -螺旋包裹的血红素环,其上分布着活性中心氨基酸残基以及底物结合区域,是酶高效催化功能的基础<sup>[2]</sup>。*C4H* 基因的数量在不同物种间存在较大差异,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、欧芹(*Petroselinum crispum*)和黄芩(*Scutellaria pекinensis*)中仅有 1 个 *C4H*<sup>[3-5]</sup>,在喜树(*Camptotheca acuminata*)和甘蓝型油菜(*Brassica napus*)中至少存在 2 个 *C4H* 基因<sup>[6]</sup>,而在水稻(*Oryza sativa*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)中分别包含 3 和 4 个 *C4H*<sup>[7]</sup>。有研究表明,*C4H* 在植物中的转录丰度和蛋白质活性直接影响植物中木质素的生物合成量<sup>[8]</sup>。欧芹中 *C4H* 基因在木质化程度高的花梗中表达丰富,而在叶片中不表达<sup>[3]</sup>。拟南芥 *C4H* 基因也在木质化程度较高的组织中表达最为丰富<sup>[9]</sup>,*C4H* 基因下调表达时,其木质素含量显著降低,并且会抑制 *PAL* 的表达活性<sup>[10]</sup>。抑制烟草(*Nicotiana tabacum*)中的 *C4H* 基因表达,其茎秆中的木质素含量显著降低<sup>[11]</sup>。另外,*C4H* 基因的表达可受到干旱和温度胁迫、植物激素信号刺激等多种因素的诱导<sup>[12]</sup>。

竹材具有韧性好、强度高特点,在木材供给不足的情况下,作为重要的替代品发挥着重要作用,其相关研究一直备受关注<sup>[13]</sup>。毛竹(*Phyllostachys edulis*)是我国最重要的竹种之一,现有林地面积  $4.68 \times 10^6$   $\text{hm}^2$ ,占全国竹林面积的 72.96%<sup>[14]</sup>。毛竹基因组的发布,为从分子水平研究竹材的形成与调控奠定了坚实基础。木质素是竹材的重要组成成分,其含量对竹材机械强度具有重要影响,其生物合成与调控已成为竹材形成的研究热点之一。目前,已有对包括苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)、肉桂酰辅酶 A 还原酶(*CCR*)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(*4CL*)与漆酶(*LAC*)等毛竹木质素生物合成酶基因的研究报道<sup>[15-18]</sup>。*C4H* 催化肉桂酸形成对-香豆酸,是木质素合成途径第二步反应的调控酶,虽然已从毛竹中克隆了 1 个 *C4H* 基因<sup>[9]</sup>,但尚缺乏从基因组水平对毛竹 *C4H* 的系统了解。本研究以毛竹为对象,进行 *C4H* 基因的全基因组鉴定,在综合生物信息学分

析的基础上,基于转录组和 qPCR 分析了 *C4H* 基因在不同组织以及不同高度笋中的表达模式,并初步探究干旱胁迫和外源  $\text{GA}_3$  处理下 *PeC4Hs* 的表达特征,以期为深入研究毛竹 *C4H* 基因的功能提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

在江西南昌选择生长良好的毛竹林地(28°45'50" N, 115°45'36" E, 海拔 394.0 m),采集不同木质化程度的毛竹笋(高度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 和 8.0 m),选择代表性样品(第 15 节上部),迅速放入液氮中,后存储于-80 °C 冰箱中,用于 RNA 提取。

将毛竹种子播种于泥炭:蛭石=7:3 的基质中,置于人工气候室(温度 25 °C,相对湿度 80%,光照 16 h/黑暗 8 h)中培养,实生苗生长 2 个月,选择长势一致的幼苗分成 2 组,每组不少于 20 株,一组用 20% PEG-6000 溶液浇灌模拟干旱处理,另一组用 100  $\mu\text{mol/L}$  赤霉素( $\text{GA}_3$ )溶液喷洒叶片,每组不少于 3 个生物学重复。分别在处理 0、1、2、4 和 8 h 时收集叶片和根系,液氮处理后保存于-80 °C 冰箱,用于 RNA 提取。

### 1.2 方法

**毛竹 *C4H* 基因的鉴定** 以模式物种水稻和拟南芥的 *C4H* 基因为参考序列,利用 TBtools 软件<sup>[20]</sup>中的 Blast 工具在毛竹基因组数据<sup>[21]</sup>中进行同源序列查找。运用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)提供的 BLASTN 和 BLASTP 功能分别对所获得的序列进行比对分析,并对基因编码的氨基酸序列用 SMART 在线软件(<http://smart.embl.de/>)进行保守结构域分析。最终获得毛竹 *C4H* 基因成员,并进行重新命名。

***PeC4Hs* 的生物信息学分析** 利用 ExPASy 提供的在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)对毛竹 *C4H* 编码蛋白的理化性质进行分析。使用在线软件 PlantCARE (

psb.ugent.be/), 对毛竹 *C4H* 基因上游启动子序列 (2 000 bp) 中的顺式调控元件进行分析预测<sup>[22]</sup>。从 Phytozome V. 12 数据库(<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) 获得拟南芥、水稻、玉米 (*Zea mays*)、高粱 (*Sorghum bicolor*) 和二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*) 等植物的 *C4H* 氨基酸序列, 基于 MEGA X 内置的 Clustal W 对这些氨基酸序列进行多重序列比对分析, 并采用邻接法生成系统进化树<sup>[23]</sup>, 其中校验参数选用 bootstrap method 设置为 1 000 次重复, 氨基酸替换模型选择 *p*-distance, 其他各参数为默认值。

***PeC4Hs* 的表达分析** 依据本实验室前期获得的毛竹鞭、根、笋、叶片、鞘和芽等 26 个组织的

转录组数据<sup>[21]</sup>, 筛选其中 *PeC4Hs* 在不同组织中的表达量数据 (fragments per kilobase per million, FPKM), 对每个 FPKM 取以 2 为底数的对数 ( $\text{Log}_2$ ), 用 TBtools 软件绘制表达谱热图。采用试剂盒 (天漠生物) 法提取样品的总 RNA, 用反转录试剂盒 (TaKaRa RNA) 合成 cDNA 第一条链。利用 Primer Premier 5.0 软件设计 6 个 *PeC4Hs* 编码区的特异性定量引物, 由北京博迈德生物技术有限公司合成 (表 1)。以上述 cDNA 为模板, 用 *PeNTB* 作为内参基因<sup>[24]</sup>, 反应体系和程序参照 Roche Light Cycler® 480 SYBR Green 试剂盒, qPCR 实验在 qTOWER2.2 系统上进行, 用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法<sup>[25]</sup> 分析基因的相对表达量。

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Primers used in qPCR

基因 Gene	引物 Primer	正向序列 Forward sequence (5'~3')	反向序列 Reverse sequence (5'~3')
<i>PeC4H1</i>	qC4H1	CGAGTACAACACTACGGCGACTTCA	GCCAGCTTCTTCTCTCTCTCCA
<i>PeC4H2</i>	qC4H2	ACAACCAACCACCGTTACAGAGC	GAGCTTCTCCAGGAAGAGTAGG
<i>PeC4H3</i>	qC4H3	GGCTCGCATTCTTCAACAACAACACT	CGCCGTTCTTCTCTGCCTCAA
<i>PeC4H4</i>	qC4H4	GGCTCCAAGGTGGTCGTCAA	GCTGCTCTCTCGTCCAAGA
<i>PeC4H5</i>	qC4H5	TTCCTCCGCCGCTACCTCAA	CGCACCTGATCTCACCTGTCTG
<i>PeC4H6</i>	qC4H6	TTCAGCAACCAGATCCTCAAGCA	ACAACAGCATGTCTCACAGGCA

## 2 结果和分析

### 2.1 *C4H* 基因鉴定和 *C4H* 的理化性质分析

从毛竹基因组数据库中共鉴定出 6 个 *C4H* 基因, 编码蛋白均具有完整的 *C4H* 保守结构域, 分别命名为 *PeC4H1*~*PeC4H6*。对 *PeC4Hs* 蛋白进行分析表明 (表 2), 长度为 501~564 aa, 分子量为 57.04~63.43 kDa, 理论等电点为 8.53~9.36, 蛋白不稳定

系数为 43.61~51.94, 均属于不稳定蛋白。氨基酸组成和跨膜结构预测分析表明, *PeC4Hs* 都含有 20 种氨基酸和 2 个跨膜结构, 非极性氨基酸含量均在 50% 以上, 其中缬氨酸和亮氨酸含量最高, 均属于易形成跨膜结构的氨基酸, 其余各种氨基酸含量差异不大。亚细胞定位预测表明, 6 个 *PeC4Hs* 均定位在内质网上, 经修饰加工后, 作为分泌蛋白发挥其作用。

表 2 *PeC4Hs* 的理化性质

Table 2 Physical and chemical characteristics of *PeC4Hs*

蛋白 Protein	基因编号 Gene No.	长度 (aa) Length	分子量 (kDa) Molecular weight	等电点 Isoelectric point	不稳定系数 Instability index	非极性氨基酸含量 /% Content of nonpolar amino acids
<i>PeC4H1</i>	PH02Gene03697	505	57.96	9.25	43.61	50.00
<i>PeC4H2</i>	PH02Gene04447	505	57.90	9.36	45.30	50.50
<i>PeC4H3</i>	PH02Gene38832	564	63.43	9.21	50.64	50.18
<i>PeC4H4</i>	PH02Gene41975	507	57.29	8.53	51.01	51.28
<i>PeC4H5</i>	PH02Gene44264	501	57.24	9.31	51.94	50.10
<i>PeC4H6</i>	PH02Gene46974	501	57.04	8.99	49.22	50.30

### 2.2 *PeC4Hs* 结构及其编码氨基酸序列特征

*PeC4Hs* 的编码区长度为 1 506~1 695 bp, 对应的基因序列全长为 2 425~4 581 bp。多重序列

比对分析表明 (图 1), *PeC4Hs* 与拟南芥的 *AtC4H1* (AM887619.1) 和水稻的 *OsC4H1* (AB207105.1) 相似, 都含有细胞色素 P450 (CYP450) 家族蛋白特有的保



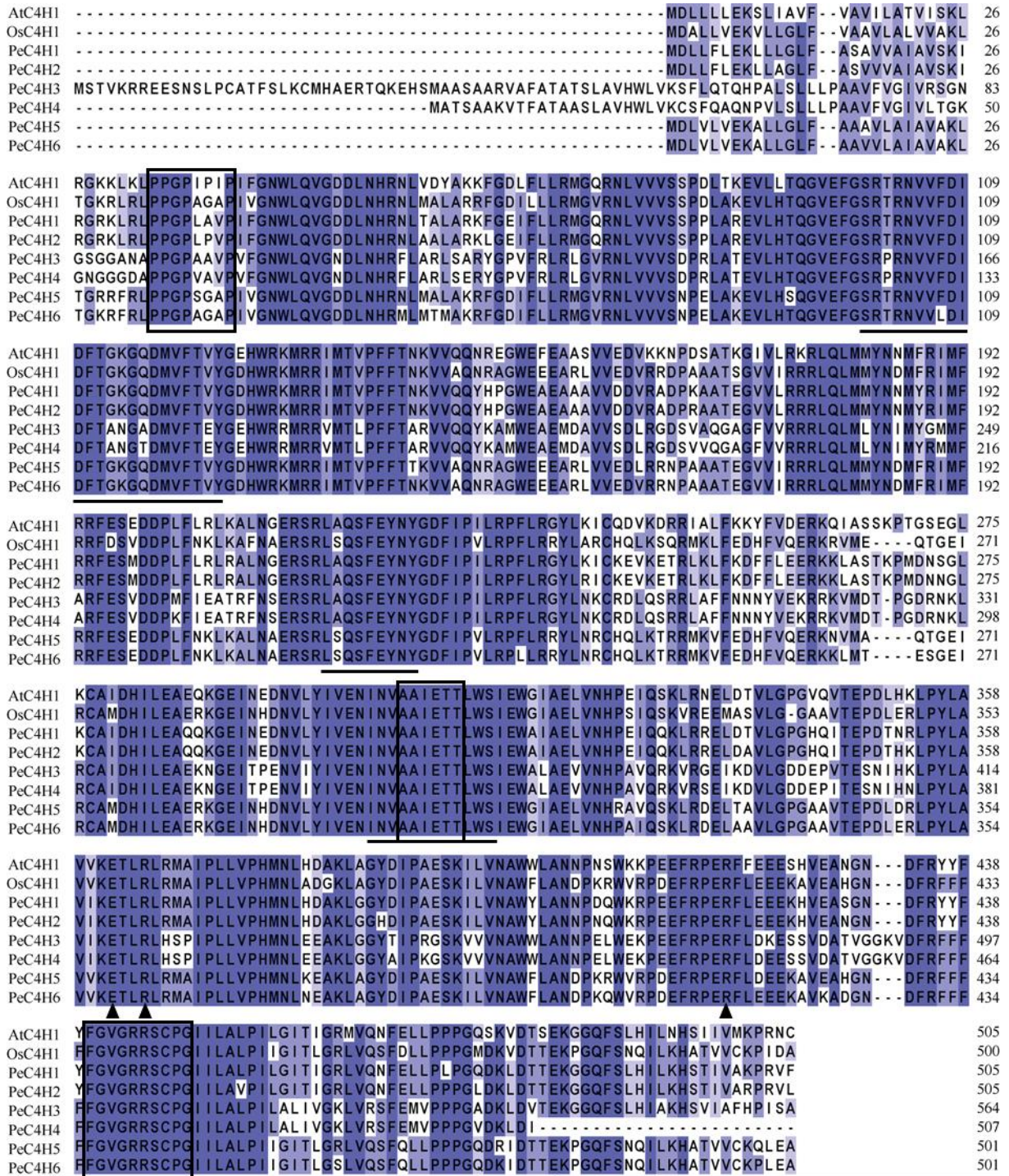


图 1 毛竹与拟南芥、水稻的 C4H 氨基酸序列比对。黑色方框：细胞色素 P450 蛋白保守域；▲：ERR 三联体；下划线：底物识别位点。

Fig. 1 Alignment of C4H amino acid sequences among *Phyllostachys edulis*, *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. Black rectangle: Conserved domains of cytochrome P450 proteins; ▲: ERR triad; Underline: Substrate recognition sites (SRS).

守结构域和特征基序<sup>[26]</sup>，如富含脯氨酸的酶正确定向铰链基序“PPGPXXXP”、C-端血红素结合域“PFGVGRRCSPG”和苏氨酸结合槽基序“AAIETT”、“E-R-R”三联体以及特征性底物识别位点(substrate recognition sites, SRSs)<sup>[27]</sup>，表明 PeC4Hs 在进化上

是相对保守的。另外，这些 C4H 的 SRSs 中少数氨基酸略有差异，但在 N-端和 C-端存在明显的差异，尤其是 N 端的膜锚定片段上，PeC4H3 和 PeC4H4 有 1 个延长的 N 端，会导致膜拓扑结构改变，进而会影响蛋白质之间的相互作用，最终将代谢通量转

移到苯丙烷途径的不同分支上<sup>[28]</sup>。

### 2.3 *PeC4Hs* 的系统进化分析

为明确 *PeC4Hs* 间的进化关系, 预测其潜在功能, 利用毛竹(*PeC4Hs*)、水稻(*OsC4Hs*)、玉米(*ZmC4Hs*)、高粱(*SbC4Hs*)、二穗短柄草(*BdC4Hs*)和拟南芥(*AtC4H1*)的氨基酸序列构建了系统进化树(图2)。结果表明, 6物种的17个*C4H*成员可分

成2个大的分支(Class I和Class II), 分别包含4和2个*PeC4Hs*, 并且出现两两聚在一起的现象, 这可能与毛竹进化史上发生过基因组复制和基因家族扩张事件有关<sup>[29]</sup>。除拟南芥只有1个*C4H*成员外, 其他5物种的*C4H*成员在2个分支中均有分布, 且多数分布在分支I中, 毛竹中与拟南芥*C4H*亲缘关系最近的是 *PeC4H1/2*, 其可能与 *AtC4H1* 有相似的功能, 在木质素的生物合成过程中起重要作用<sup>[9]</sup>。

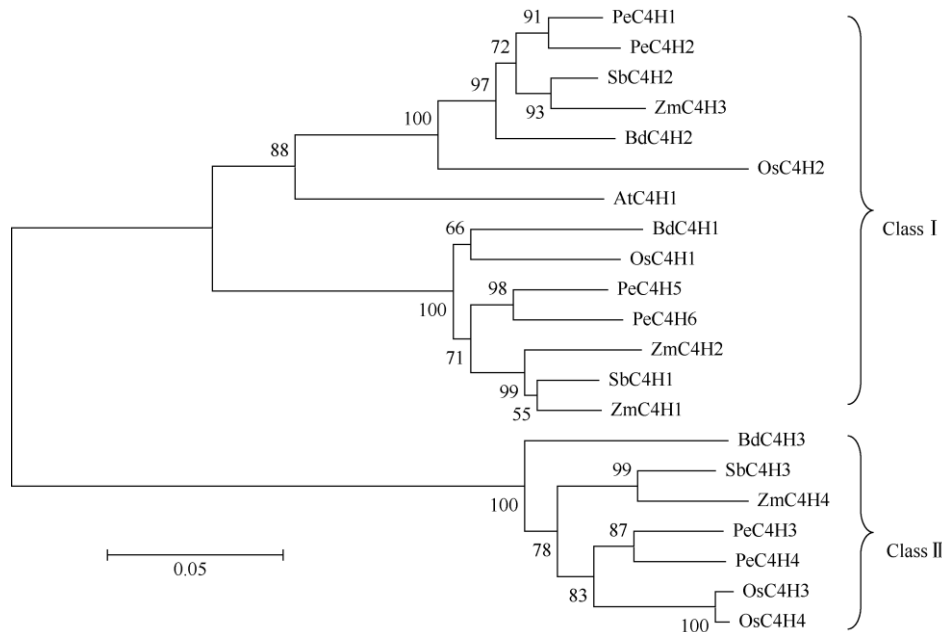


图2 不同植物基于*C4H*氨基酸序列的系统进化树。Pe: 毛竹; Sb: 高粱; Zm: 玉米; Bd: 二穗短柄草; Os: 水稻; At: 拟南芥。

Fig. 2 Phylogenetic tree of different plants based on amino acid sequences of *C4H*. Pe: *Phyllostachys edulis*; Sb: *Sorghum bicolor*; Zm: *Zea mays*; Bd: *Brachypodium distachyon*; Os: *Oryza sativa*; At: *Arabidopsis thaliana*.

### 2.4 *PeC4Hs* 的表达分析

基因的组织特异性表达一定程度上能反映其发挥作用的位置, 利用转录组数据对 *PeC4Hs* 在毛竹不同组织中的表达模式进行分析(图3)。结果表明, 各 *PeC4Hs* 的表达模式存在一定的差异, 总体来讲 *PeC4Hs* 在根部的表达水平较高, 但在芽中的表达水平较低, 在不同发育阶段的笋中, 基部的表达高于中部和尖部。进一步分析表明, 毛竹 I 类 *C4H* 成员整体表达水平高于 II 类成员, 特别是分支 I 中的 *PeC4H1* 和 *PeC4H2* 在各组织的相对表达量均较高, 且表达量变化不大, 可能作为组成型基因在毛竹整个生长发育中都发挥着重要作用。 *PeC4Hs* 在不同组织的表达差异, 反映了不同 *PeC4Hs* 在毛竹生长发育过程中的生物学功能存在一定的差异, 对毛竹木质化过程可能发挥着重要作用。

### 2.5 笋中 *PeC4Hs* 的表达模式

*C4H* 是木质素合成通路的关键酶, 参与次生细胞壁形成和木质化的过程<sup>[9]</sup>。采用 qPCR 技术检测 *PeC4Hs* 在不同木质化程度笋中的表达模式(图4)。结果表明, 6个 *PeC4Hs* 在不同高度笋中均呈现差异表达, 随着笋高度的增加, 整体表现出先下调后上调的变化, 其中 *PeC4H1* 和 *PeC4H2* 的表达量在 6.0 m 笋中达到最高, 其余4个 *PeC4Hs* 均在 4.0 m 的笋中表达量最高。进一步分析表明, *PeC4Hs* 在发育前期(0~2.0 m)和发育后期(8.0 m)的笋中均呈现相对较低的表达水平, 这与毛竹笋在 4.0~6.0 m 时的快速木质化变化一致<sup>[17]</sup>。

### 2.6 *PeC4Hs* 启动子序列分析和顺式调控元件预测

对 *PeC4Hs* 的起始密码子上游 2 000 bp 的序列



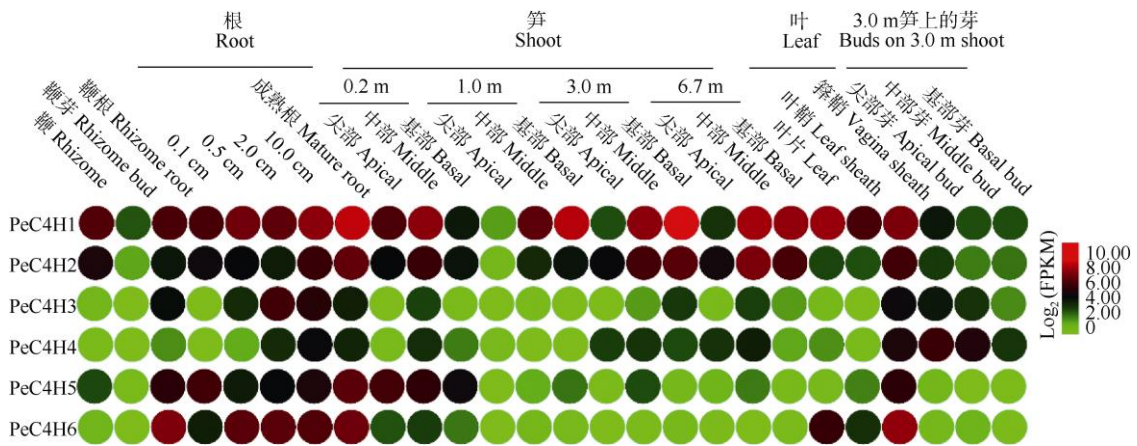


图 3 *PeC4Hs* 在 26 个组织中的表达分析

Fig. 3 Expression analysis of *PeC4Hs* in twenty-six tissues

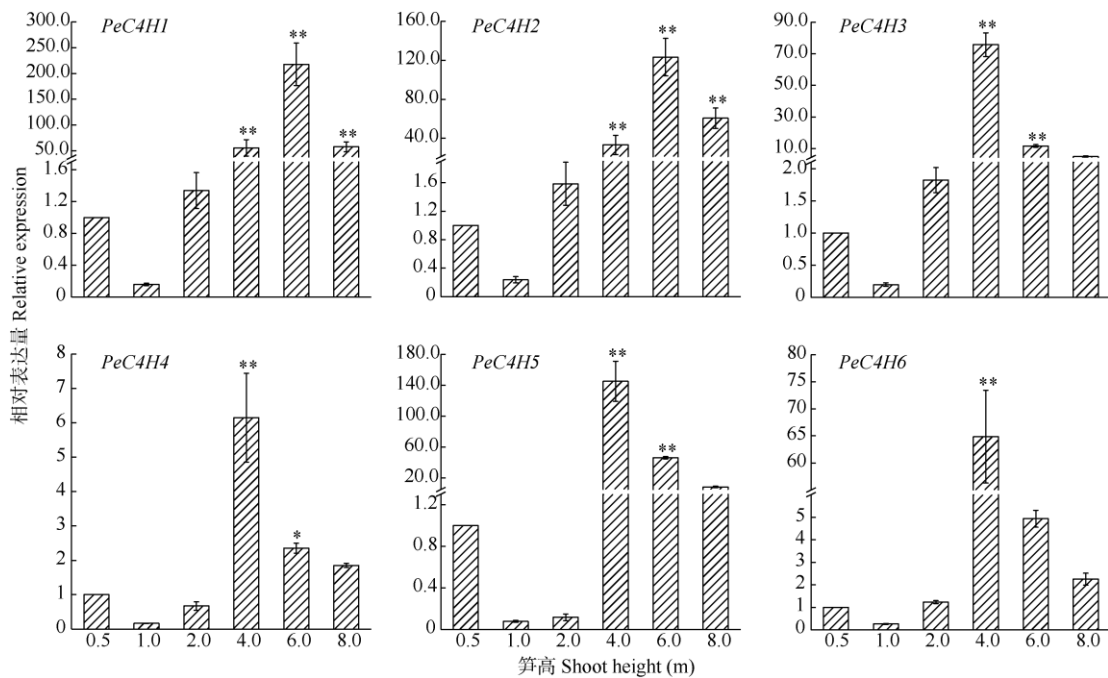


图 4 *PeC4Hs* 在不同高度笋中的表达分析。\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Expression analysis of *PeC4Hs* in different height shoots. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

进行分析, 结果表明, 每条启动子序列中除包含大量真核生物启动子的基本转录调控元件 TATA-box 和 CAAT-box 外, 还存在多个顺式作用元件序列位点, 包括 35S 启动子元件 ASF, MYB、MYC 转录因子结合的顺式作用元件, 低温胁迫响应元件 LTR, 干旱胁迫响应元件 MBS, 光响应元件 G-box 和 Box4, 赤霉素响应元件 TATC-box、P-box 和 GARE-motif, 生长素响应元件 TGA-element, 茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA-motif 和 TGACG-motif, 脱落酸和水杨酸响应元件 ABRE、TCA-element 等(图 5)。由此推

测, *PeC4Hs* 的启动子可能在空间表达过程中受到非生物胁迫的调控并参与多种植物激素的响应, 进而对毛竹 *C4H* 基因的转录表达起着不同程度的调控作用。

### 2.7 干旱和 GA<sub>3</sub> 处理下 *PeC4Hs* 的表达分析

qPCR 结果表明, 随干旱时间的延长, *PeC4Hs* 在叶中总体呈现下调的表达趋势(图 6: A), 但不同基因成员间又存在差异, 如 *PeC4H1/2* 在处理 1 h 内表达量无显著变化, 分别在处理后 8 和 4 h 达到最低;

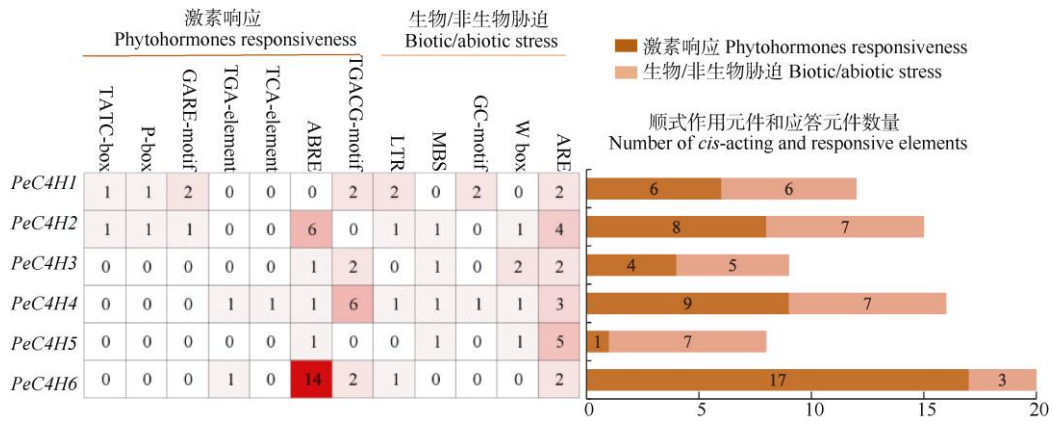


图 5 *PeC4Hs* 基因启动子顺式作用元件分析

Fig. 5 Analysis of *cis*-acting elements in the promoter sequences of *PeC4Hs*

*PeC4H3/4* 在干旱处理 1 h 时的表达量已显著降低, 而后维持在相对较低的水平; *PeC4H5/6* 则是在下调表达过程中出现波动变化。而根中 *PeC4H1/2/5/6* 的表达显著下调, 基本是逐渐降低, 而 *PeC4H3/4* 的表达量则是在 1 h 内显著上调, 之后迅速下降并维持在相对稳定的水平, 但均显著高于对照。*PeC4Hs* 通过表达变化响应了干旱胁迫, 表明可能在抵御非生物胁迫中发挥重要的作用。

100 μmol/L 的 GA<sub>3</sub> 处理后, 叶片中 *PeC4H3/6* 在处理 1 h 内表达量显著上调(图 6: B), 之后又逐渐降低; *PeC4H5* 则随处理时间的延长表达量逐渐上升, 在 8 h 时达到最高; *PeC4H4* 在叶中的表达量无显著变化。而在根中 *PeC4Hs* 的表达量变化明显, *PeC4H1/3/4* 的表达量显著下调, 且维持在较低水平; *PeC4H2/5* 的表达量在 2 h 时显著上调, 4 h 时最高, 1 和 8 h 的表达量均低于对照。这表明, *PeC4Hs* 对 GA<sub>3</sub> 信号刺激的响应存在一定的差异, 根中的变化较为显著, 推测 *PeC4Hs* 倾向于在根中表达, 进一步说明 *PeC4Hs* 在根中对 GA<sub>3</sub> 响应更为敏感。

### 3 结论和讨论

C4H 是苯丙烷代谢途径的第二个关键酶, 催化反式肉桂酸的苯环 C4 位羟基化生成 *p*-香豆酸, 能够为木质素、类黄酮以及芳香族化合物的合成等多条次级代谢支路提供前体物质, 在植物各组织中均具有很高的活性<sup>[30]</sup>。本研究从毛竹中鉴定出 6 个 *PeC4Hs*, 均具有完整的保守结构域和相同的基序, 亚细胞定位均在内质网上, 这对 *PeC4Hs* 形成准确的高级结构和与内质网外膜正确结合具有重要意

义<sup>[28]</sup>。氨基酸序列分析表明, *PeC4Hs* 含有丰富的底物识别位点, 其中 SRS1、SRS2 和 SRS3 结合底物的脂肪链, SRS5 和 SRS6 结合底物的芳香环, 这对酶高效识别专一底物具有重要意义<sup>[27]</sup>。*PeC4Hs* 中包含细胞色素 P450 家族蛋白特有的血红素结合域是绝对保守, 而另一个保守结构域(PPGPXXXP)则有氨基酸残基的差异, 特别是与双子叶植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的差异较为明显, 这可能是因为 C4H 在单、双子叶植物间有着不同的进化路径。根据氨基酸序列的相似性以及 N-端和 C-端的保守性, C4H 可以分为 2 类<sup>[31]</sup>, 虽然 I 类很可能包括参与木质素生物合成的真正成员, 但这 2 类酶都被证明是非常有效的肉桂酸 4-羟化酶<sup>[7]</sup>, 并且其基因都能够恢复拟南芥 C4H 突变体的表型<sup>[28]</sup>, *PeC4Hs* 的酶活性和具体功能有待进一步验证。

研究表明, 植物 C4H 基因的表达具有组织特异性, 拟南芥 *AtC4H* 在茎中表达量最高、根中次之、叶和花中最少<sup>[32]</sup>。油菜(*Brassica napus*)的 *BnC4H2* 在茎、叶和花中表达量较高, 而在根和种子中表达量较低<sup>[33]</sup>。转录组数据分析表明, *PeC4H1/2* 在笋中表达量最高, 根和叶中次之, 芽中表达量最低, 这与拟南芥和油菜中的研究结果相符。在拟南芥 *Ref3* 突变体中 *AtC4H* 突变, 会使植物体内木质素含量降低, 造成植株矮小、雄性不育等表型<sup>[34]</sup>。在苜蓿和烟草中下调 C4H 的表达, 也会使木质素含量显著下降<sup>[10-11]</sup>。在毛竹中, *PeC4Hs* 随着笋的木质化程度加深呈上调表达趋势, 说明毛竹笋中 *PeC4Hs* 的表达与木质素积累呈正相关, qPCR 结果也进一步证实了 *PeC4Hs* 参与了毛竹笋的木质化过程。

*PeC4Hs* 上游启动子序列中存在多种与激素和



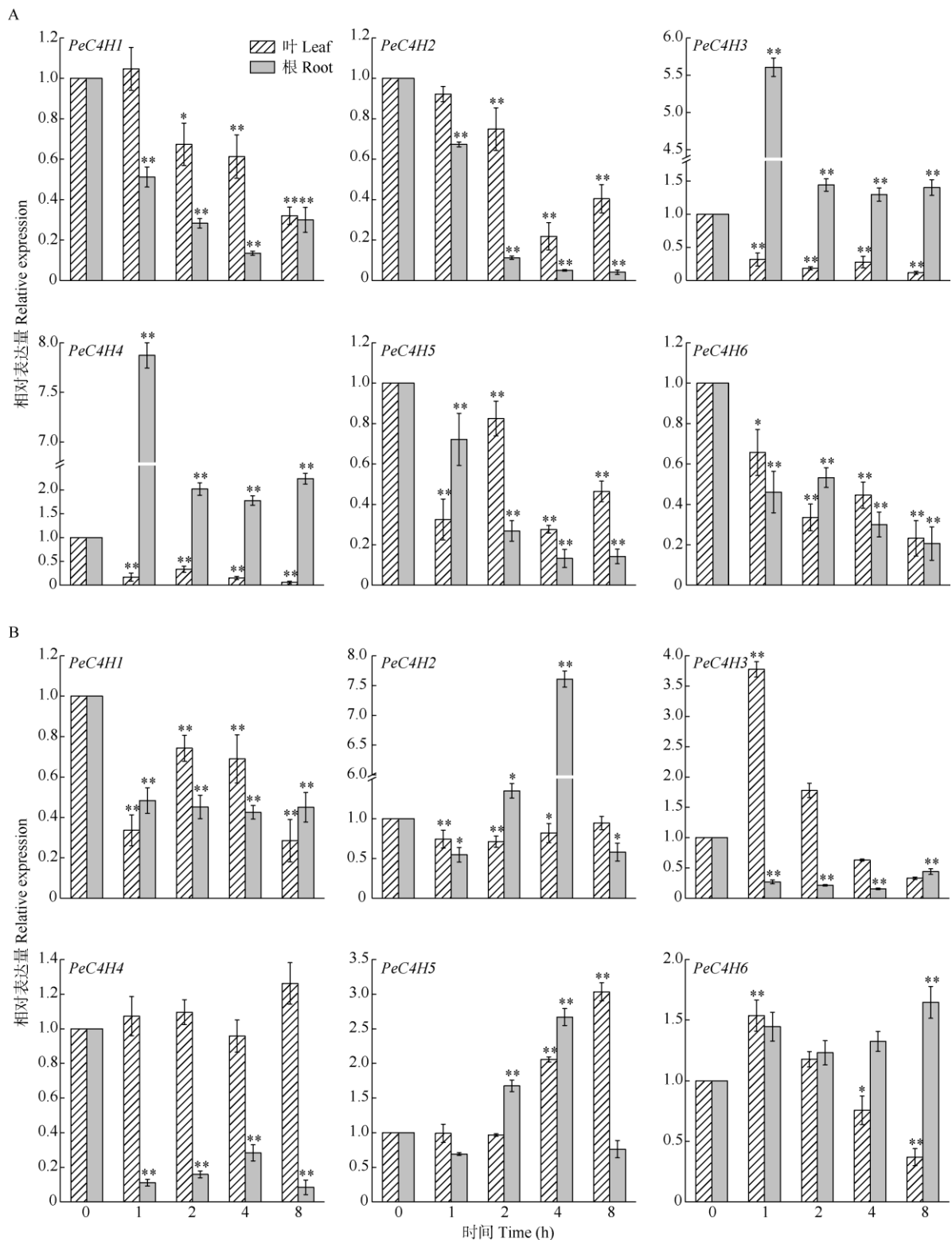


图 6 *PeC4Hs* 在干旱胁迫(A)和  $GA_3$  处理(B)下的相对表达量。\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ 。

Fig. 6 Expression of *PeC4Hs* under drought (A) and  $GA_3$  (B) treatments. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

逆境胁迫相关的顺式作用元件，这些元件赋予了植物快速反应和调节相关基因表达的能力，从而提高对逆境的适应性<sup>[35]</sup>。qPCR 结果表明，第 II 类

基因 *PeC4H3/4* 在干旱处理后 1 h 的根中显著上调表达，其余成员在叶和根中均下调表达，与 2 a 生实生苗干旱处理后的叶片转录组数据 (SRR4450542~

SRR4450551)相一致<sup>[36]</sup>, 这可能是由于在逆境胁迫下, 毛竹幼苗体内代谢减弱所致。GA<sub>3</sub>处理下, *PeC4Hs*在叶中的表达模式与2个月毛竹幼苗经100 μmol/L GA<sub>3</sub>处理4 h的转录组数据(SRR6131113~SRR6131118)基本一致<sup>[37]</sup>, 在根中的表达量也出现显著变化, 由此推测 *PeC4Hs* 的表达受激素信号的影响。在逆境胁迫下, 茶树(*Camellia sinensis*)中 *C4H* 表达的增加使得植物体内木质素积累量增加, 可应对逆境胁迫<sup>[31]</sup>。本研究中, 在木质化程度高的根中 *PeC4Hs* 呈现较高的表达水平, 且非生物胁迫和生长调节剂处理下根中的表达变化较叶中更为显著, 进一步说明, 在逆境下 *PeC4Hs* 可能通过增加木质素含量来抵抗胁迫。干旱和 GA<sub>3</sub> 处理下 *PeC4Hs* 表达模式的差异, 说明 *PeC4Hs* 功能的多样性, 但其在毛竹生长过程以及逆境胁迫中的作用机制仍需进一步研究。

## 参考文献

- [1] KUMAR S, OMER S, PATEL K, et al. Cinnamate 4-hydroxylase (C4H) genes from *Leucaena leucocephala*: A pulp yielding leguminous tree [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(2): 1265–1274. doi: 10.1007/s11033-012-2169-8.
- [2] WINKEL-SHIRLEY B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress [J]. Curr Opin Plant Biol, 2002, 5(3): 218–223. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00256-X.
- [3] KOOPMANN E, LOGEMANN E, HAHLBROCK K. Regulation and functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from parsley [J]. Plant Physiol, 1999, 119(1): 49–56. doi: 10.1104/pp.119.1.49.
- [4] RAES J, ROHDE A, CHRISTENSEN J H, et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2003, 133(3): 1051–1071. doi: 10.1104/PP.103.026484.
- [5] XU H, PARK N I, LI X H, et al. Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase and genes involved in flavone biosynthesis in *Scutellaria baicalensis* [J]. Bioresour Technol, 2010, 101(24): 9715–9722. doi: 10.1016/j.biortech.2010.07.083.
- [6] CHEN A H, CHAI Y R, LI J N, et al. Molecular cloning of two genes encoding cinnamate 4-hydroxylase (C4H) from oilseed rape (*Brassica napus*) [J]. J Biochem Mol Biol, 2007, 40(2): 247–260. doi: 10.5483/BMBREP.2007.40.2.247.
- [7] CAROCHA V, SOLER M, HEFER C, et al. Genome-wide analysis of the lignin toolbox of *Eucalyptus grandis* [J]. New Phytol, 2015, 206(4): 1297–1313. doi: 10.1111/nph.13313.
- [8] MILLAR D J, LONG M, DONOVAN G, et al. Introduction of sense constructs of cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A24) in transgenic tomato plants shows opposite effects on flux into stem lignin and fruit flavonoids [J]. Phytochemistry, 2007, 68(11): 1497–1509. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.03.018.
- [9] BELL-LELONG D A, CUSUMANO J C, MEYER K, et al. Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*: Regulation in response to development and the environment [J]. Plant Physiol, 1997, 113(3): 729–738. doi: 10.1104/pp.113.3.729.
- [10] SEWALT V, NI W, BLOUNT J W, et al. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase [J]. Plant Physiol, 1997, 115(1): 41–50. doi: 10.1104/PP.115.1.41.
- [11] BLOUNT J W, KORTH K L, MASOUD S A, et al. Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway [J]. Plant Physiol, 2000, 122(1): 107–116. doi: 10.1104/PP.122.1.107.
- [12] PHIMCHAN P, CHANTHAI S, BOSLAND P W, et al. Enzymatic changes in phenylalanine ammonia-lyase, cinnamic-4-hydroxylase, capsaicin synthase, and peroxidase activities in *Capsicum* under drought stress [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(29): 7057–7062. doi: 10.1021/jf4051717.
- [13] ZHU C L, YANG K B, XU X R, et al. Molecular characteristics of *NIP* genes in *Phyllostachys edulis* and their expression patterns in response to stresses [J]. Sci Silv Sin, 2021, 57(1): 64–76. doi: 10.11707/j.1001-7488.20210107.  
朱成磊, 杨克彬, 徐秀荣, 等. 毛竹 *NIP* 基因的分子特征及应答胁迫的表达模式 [J]. 林业科学, 2021, 57(1): 64–76. doi: 10.11707/j.1001-7488.20210107.
- [14] LI Y M, FENG P F. Bamboo resources in China based on the Ninth National Forest Inventory data [J]. World Bamboo Rattan, 2019, 17(6): 45–48. doi: 10.12168/sjztx.2019.06.010.  
李玉敏, 冯鹏飞. 基于第九次全国森林资源清查的中国竹资源分析 [J]. 世界竹藤通讯, 2019, 17(6): 45–48. doi: 10.12168/sjztx.2019.06.010.
- [15] GAO Z M, PENG Z H, LI X P, et al. Isolation and tissue specific expression analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Phyllostachys edulis* [J]. For Res, 2009, 22(3): 449–453. doi: 10.3321/j.issn:1001-1498.2009.03.025.  
高志民, 彭镇华, 李雪平, 等. 毛竹苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及组织特异性表达分析 [J]. 林业科学研究, 2009, 22(3): 449–453. doi: 10.3321/j.issn:1001-1498.2009.03.025.
- [16] XU H, YANG K B, ZHU C L, et al. Preliminary study on the function of cinnamoyl-CoA reductase gene *PeCCR* of moso bamboo (*Phyllo-*

- stachys edulis*) [J]. For Res, 2020, 33(2): 77–84. doi: 10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.02.010.
- 徐浩, 杨克彬, 朱成磊, 等. 毛竹肉桂酰辅酶 A 还原酶基因 *PeCCR* 功能初步研究 [J]. 林业科学研究, 2020, 33(2): 77–84. doi: 10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.02.010.
- [17] YANG K B, SHAN X M, SHI J J, et al. Identification and expression analysis of *4CL* gene family in *Phyllostachys edulis* [J]. J Nucl Agric Sci, 2021, 35(1): 72–82. doi: 10.11869/j.issn.100-8551.2021.01.0072.
- 杨克彬, 单雪萌, 史晶晶, 等. 毛竹 4-香豆酸辅酶 A 连接酶基因家族鉴定及表达分析 [J]. 核农学报, 2021, 35(1): 72–82. doi: 10.11869/j.issn.100-8551.2021.01.0072.
- [18] LI L C, YANG K B, WANG S N, et al. Genome-wide analysis of laccase genes in moso bamboo highlights *PeLAC10* involved in lignin biosynthesis and in response to abiotic stresses [J]. Plant Cell Rep, 2020, 39(6): 751–763. doi: 10.1007/s00299-020-02528-w.
- [19] JIN S Y, LU M Z, GAO J. Cloning and expression analysis of the *C4H* gene involved in the lignin biosynthesis in *Phyllostachys edulis* [J]. For Res, 2010, 23(3): 319–325.
- 金顺玉, 卢孟柱, 高健. 毛竹木质素合成相关基因 *C4H* 的克隆及组织表达分析 [J]. 林业科学研究, 2010, 23(3): 319–325.
- [20] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Mol Plant, 2020, 13(8): 1194–1202. doi: 10.1016/j.molp.2020.06.009.
- [21] ZHAO H S, GAO Z M, WANG L, et al. Chromosome-level reference genome and alternative splicing atlas of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. Gigascience, 2018, 7(10): giy115. doi: 10.1093/GIGASCIENCE/GIY115.
- [22] LESCOT M, DEHAIS P, THUIS 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]. Nucl Acids Res, 2002, 30(1): 325–327. doi: 10.1093/nar/30.1.325.
- [23] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Mol Biol Evol, 2016, 33(7): 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- [24] FAN C J, MA J M, GUO Q R, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56573. doi: 10.1371/journal.pone.0056573.
- [25] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [26] CHAPPLE C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome  $P_{450}$ -dependent monooxygenases [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49(1): 311–343. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.311.
- [27] SCHOCH G A, ATTIAS R, LE RET M, et al. Key substrate recognition residues in the active site of a plant cytochrome  $P_{450}$ , CYP73A1. Homology model guided site-directed mutagenesis [J]. Eur J Biochem, 2003, 270(18): 3684–3695. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03739.x.
- [28] RENAULT H, DE MAROTHY M, JONASSON G, et al. Gene duplication leads to altered membrane topology of a cytochrome  $P_{450}$  enzyme in seed plants [J]. Mol Biol Evol, 2017, 34(8): 2041–2056. doi: 10.1093/molbev/msx160.
- [29] PENG Z H, LU Y, LI L B, et al. The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. Nat Genet, 2013, 45(4): 456–461. doi: 10.1038/ng.2569.
- [30] FAHRENDORF T, DIXON R A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.): XVIII. Molecular cloning and expression of the elicitor-inducible cinnamic acid 4-hydroxylase cytochrome  $P_{450}$  [J]. Arch Biochem Biophys, 1993, 305(2): 509–515. doi: 10.1006/abbi.1993.1454.
- [31] XIA J X, LIU Y J, YAO S B, et al. Characterization and expression profiling of *Camellia sinensis* cinnamate 4-hydroxylase genes in phenylpropanoid pathways [J]. Genes (Basel), 2017, 8(8): 193. doi: 10.3390/genes8080193.
- [32] MIZUTANI M, OHTA D, SATO R. Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from *Arabidopsis* and its expression manner in planta [J]. Plant Physiol, 1997, 113(3): 755–763. doi: 10.1104/pp.113.3.755.
- [33] CHEN F, DIXON R A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(7): 759–761. doi: 10.1038/nbt1316.
- [34] SCHILMILLER A L, STOUT J, WENG J K, et al. Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2009, 60(5): 771–782. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2009.03996.x.
- [35] SONG X L, KONG B, GAO Z M, et al. Identification and expression analysis of the *APX* gene family in *Phyllostachys edulis* [J]. J Trop Subtrop Bot, 2020, 28(3): 255–264. doi: 10.11926/jtsb.4155.
- 宋笑龙, 孔波, 高志民, 等. 毛竹 *APX* 家族基因鉴定和表达分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2020, 28(3): 255–264. doi: 10.11926/jtsb.4155.
- [36] HUANG Z, JIN S H, GUO H D, et al. Genome-wide identification and characterization of *TIFY* family genes in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) and expression profiling analysis under dehydration and cold stresses [J]. PeerJ, 2016, 4: e2620. doi: 10.7717/peerj.2620.
- [37] ZHANG H X, WANG H H, ZHU Q, et al. Transcriptome characterization of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) seedlings in response to exogenous gibberellin applications [J]. BMC Plant Biol, 2018, 18(1): 125. doi: 10.1186/s12870-018-1336-z.