

莲雾果实 *C4H* 基因的克隆及在 NO 处理下的表达分析

黄利娜, 吴光斌, 匡凤元, 张 坤, 陈发河

(集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 以莲雾(*Syzygium samarangense*)果实 RNA 为模板, 采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术对莲雾果实肉桂酸-4-羟基化酶(cinnamic acid-4-hydroxylase, C4H)基因进行克隆及生物信息学分析, 并采用实时荧光定量 PCR 技术对采后莲雾果实 *C4H* 基因在一氧化氮(nitric oxide, NO)处理下的表达水平进行分析。结果表明: 莲雾果实 *C4H* 基因长 1 849 bp, 包含长为 1 518 bp 的开放阅读框, 编码 505 个氨基酸; 预测的 C4H 蛋白质等电点为 9.34, 包括一个细胞色素 P450 和一个反式肉桂酸 4-单加氧酶保守结构域, 没有信号肽和跨膜结构域。莲雾果实贮藏期间, *C4H* 基因的表达水平和木质素含量逐渐上升, 且两者的相关系数达 0.972, 呈极显著的正相关。外源 NO 处理抑制了莲雾果实 *C4H* 表达水平和木质素的积累。

[关键词] 莲雾果实; 一氧化氮; 木质素; 肉桂酸-4-羟基化酶; 基因表达

[中图分类号] S 667.9

Cloning and Expression Analysis of Cinnamic Acid-4-hydroxylase from Wax Apple Fruit Under NO Treatment

HUANG Lina, WU Guangbin, KUANG Fengyuan, ZHANG Shen, CHEN Fahe

(College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In the present study, cinnamic acid-4-hydroxylase gene (*C4H*) was cloned by polymerase chain reaction(PCR) technology from wax apple fruit(*Syzygium samarangense*), and bioinformatics analysis were performed. In addition, the *C4H* expression level under NO treatment was analyzed by real-time fluorescent quantitative PCR technology. The results showed that the cloned *C4H* gene(1849 bp) contained a 1518-bp open reading frame encoding a protein of 505-amino acid with a calculated isoelectric point of 9.34. There was no signal peptide and transmembrane domain, and shared conserved domains with other C4H family members, including cytochrome P450 and trans-cinnamate 4-monooxygenase domains. The expression level of *C4H* and lignin content increased gradually during storage and their correlation coefficient was 0.972. Besides, *C4H* expression level and lignin content of harvested wax apple fruit was inhibited significantly by NO.

Keywords: wax apple fruit; nitric oxide; lignin; C4H; gene expression

0 引言

肉桂酸 4-羟基化酶(cinnamic acid-4-hydroxylase, C4H)是苯丙氨酸代谢途径的第一个单加氧

[收稿日期] 2019-04-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31171777); 福建省自然科学基金项目(2018J01448)

[作者简介] 黄利娜(1992—), 女, 硕士生, 从事农产品加工与贮藏方向研究。通信作者: 陈发河(1960—), 男, 教授, 从事农产品加工与贮藏方向研究。E-mail: fhchen@jmu.edu.cn

酶^[1]，催化反式肉桂酸羟基化成对香豆酸^[2]。单加氧酶反应对植物脂肪酸、苯丙氨酸、生物碱和萜类化合物等多种代谢产物的生物合成起着重要作用。这些代谢产物受 CYP73 家族和苯丙烷途径调控，进而可以介导木质素的合成^[3]。C4H 是 CYP73 家族的一员，在调控木质素生物合成中起着关键作用^[4]。C4H 序列及表达模式已经在独行菜^[5]、茶花^[6]、芒果^[7]、砀山酥梨^[8]、桂花^[9]中被报道。

莲雾 (*Syzygium samarangense*) 又称金山蒲桃、洋蒲桃，在中国和东南亚地区均有种植^[10]。莲雾果实以优良的品质、独特的风味和较高的营养价值受到人们的喜爱，但采后呼吸代谢旺盛、组织疏松、衰老速率快，采收后如不及时进行保鲜处理，短时间内就会伴随失水而发生絮状绵软的劣变现象，影响其经济价值。前期研究^[12]发现，10 $\mu\text{L/L}$ 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 处理可以抑制莲雾果实糖代谢、细胞壁降解酶的活性和苯丙烷代谢途径，从而延缓莲雾果实絮状绵软化的进程^[11]。果实的软化通常与细胞壁代谢、以木质素合成为特征的次生代谢有关。山竹^[13]和猕猴桃^[14]果实中木质素含量在贮藏期间随果实软化程度增加而升高。莲雾果实采后果肉絮状绵软类型既不同于鳄梨、香蕉、番茄等果实，又不同于桃等一些冷敏感果实低温下出现的果肉纤维化絮败，也不同于枇杷果实低温下发生的果肉木质化。因此，探究莲雾果实中木质素合成机制对改善果实絮状绵软具有重要意义。有研究^[15]表明，当抑制转基因烟草 C4H 酶的活性后，其木质素含量明显减少；同时，调控 C4H 转录水平还会影响木质素构成，造成 S/G 比值降低，而生长现象无异常。此外，研究还发现，C4H 在大麻叶中的高度表达导致了木质素含量的增加^[16]，银杏中 C4H 的表达水平与木质素的合成呈正相关^[17]。然而对莲雾果实中 C4H 的研究还未见报道。

本研究克隆了莲雾果实 C4H 基因并对其进行生物信息学分析，预测其结构和功能。采用 NO 对莲雾果实进行熏蒸处理，分析采后莲雾果实 C4H 在贮藏期的表达水平以及木质素含量变化，以探究在 NO 处理下，C4H 的转录水平对木质素合成的影响，为解析莲雾果实 C4H 基因对木质素合成的作用，进一步探究莲雾果实木质素合成的调控机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采用台湾‘黑珍珠’莲雾 (*Syzygium samarangense* [Blume] Merrill & L. M. Perry) 为材料。挑选大小、表皮颜色、成熟度一致，无机械损伤和病虫害新鲜的莲雾果实，随机分为 2 组，每组 140 个。将所有莲雾果实密封在干燥器 (16 L) 中，通 20 min N_2 以排出干燥器内的 O_2 。一组水果注入一定体积的 NO 气体使干燥器内的 NO 浓度达到 10 $\mu\text{L/L}$ ，熏蒸 2 h；另一组不做处理 (对照)。将果实置于通风处 1 h 后保鲜膜 (打孔) 包装，置于温度 (4 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 (85 ± 2) % 条件下贮藏，贮藏期为 12 d。贮藏期间每隔 48 h 取样进行相关指标测定分析。

1.2 莲雾果实 C4H 基因的分离

使用天根公司的植物 RNA 提取试剂盒提取莲雾果实总 RNA，分别用琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白质分析仪 (Eppendorf) 检测 RNA 的完整性和浓度。采用逆转录试剂盒 (Invitrogen, MD, USA) 的操作步骤，以 1 μg RNA 为模板生成 cDNA 的第一条链。根据实验室已测得的莲雾果实转录组数据，使用 PrimerPremier 5.0 软件设计 C4H 扩增的特异性引物 (见表 1)，PCR 扩增程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性

表 1 研究中使用的引物

Tab. 1 The primers used in this study

基因名称 Gene names	正向引物 Positive primers	反向引物 Negative primers	用途 Methods
C4H	ATGGATCTCCTCCTCTGGAG	TCAGAAGGACCTTGGCTTCAAG	PCR
β -actin	CCATTTCAGGCTGTCTTTCC	AGCCGTGGTGGTAAACGAGTA	qRT-PCR
C4H	GACTACAACACTACGGCGACTTCATC	ATCCGCTTCACGCTGTCC	qRT-PCR

5 min; 95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 复性 40 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 重复 40 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。利用凝胶提取试剂盒 (Omega Bio-Tek, GA, USA) 纯化 PCR 产物, 连接克隆载体 pMD-19T, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5a, 挑选阳性克隆基因送至厦门博瑞生物公司进行测序。

1.3 莲雾果实 *C4H* 的生物信息学分析

利用 NCBI Served Domains 数据库在线进行保守域的识别。分别使用在线软件 ProtParam、Signal P 4.1 Server、TMHMM、Net Phos 3.1 Server 对 *C4H* 氨基酸序列进行序列、信号肽、跨膜结构、磷酸化位点的分析。通过 DNAMAN 对不同植物 *C4H* 蛋白的氨基酸序列进行多序列比对分析。

1.4 莲雾果实 *C4H* 表达水平分析

根据已获得莲雾果实 *C4H* 序列, 使用 Primer Premier 5.0 设计定量即时聚合酶链锁反应 (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 特异性引物 (见表 1), 使用 ABI7300 荧光 PCR 仪进行 *C4H* 表达水平分析, 按照 Super Real Pre Mix Plus (SYBR Green) 配制 qRT-PCR 反应体系, 2 × Super Real Pre Mix Plus, 10 μL; 正向引物, 0.6 μL; 反向引物, 0.6 μL; cDNA 模板, 1 μL; 50 × ROX Reference Dye, 2 μL; RNase-free ddH₂O, 补至总体积 20 μL。反应程序为: 95 ℃ 预变性 15 min; 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火和延伸 31 s, 40 个循环。每种处理设置 3 个生物学重复以及 3 次技术重复。根据 2^{-ΔΔCt} 法分析贮藏期间果实 *C4H* 的表达水平。

1.5 莲雾果实木质素含量的测定

采用 Klason 法测定莲雾果实中木质素含量^[18]。将取自 10 个莲雾的果肉 10 g (记为 *m*) 研磨成匀浆, 加入 12 mL 体积分数 70% 浓硫酸, 在 40 ℃ 下振荡水浴 1 h, 用 200 mL 蒸馏水反复冲洗匀浆至 500 mL 锥形瓶中, 沸水浴 1 h, 备好已烘干至恒重的滤纸, 称取质量记为 *m*₀, 匀浆液经布氏漏斗过滤之后, 用热水冲洗滤渣, 将带有滤渣的滤纸置于 65 ℃ 下烘至恒重, 称重记为 *m*₁。木质素的计算方法: 木质素/% = (*m*₁ - *m*₀)/*m* × 100。

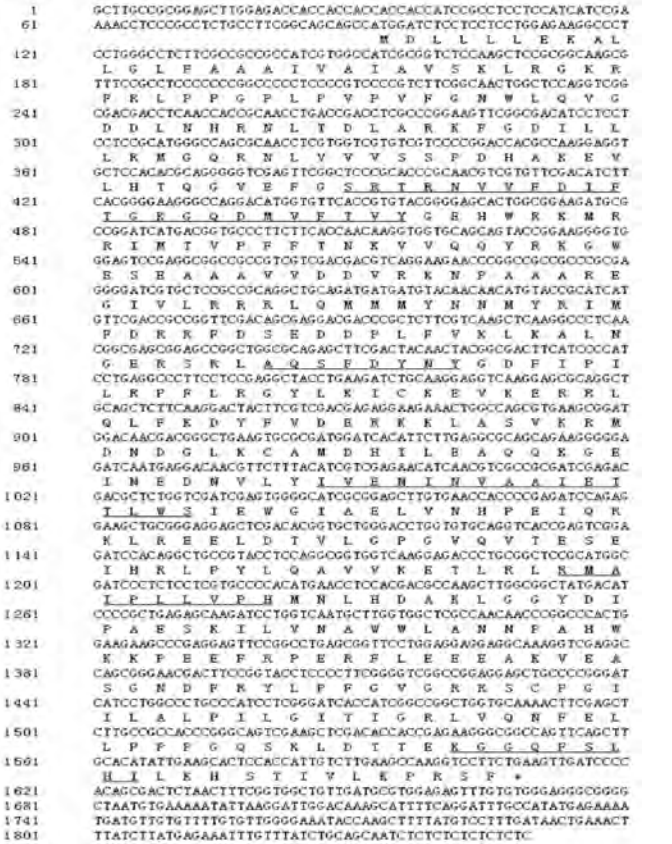
2 结果

2.1 莲雾果实 *C4H* 序列的获得

基于前期测序得到的莲雾果实转录组数据库, 经过分析筛选到一条长度为 1 849 bp 的 Unigene (编号为 comp44506_c0), 被注释为肉桂酸 - 4 - 羟基化酶基因。根据其基因序列设计特异性引物, 以莲雾果实提取的 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 进行 *C4H* 序列扩增。扩增产物经电泳检测、特异性条带纯化回收与测序, 最终获得莲雾果实 *C4H* 序列长 1 849 bp, 含有完整的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 1 518 bp, 编码 505 个氨基酸 (见图 1)。扩增得到的莲雾果实 *C4H* 序列与转录组数据库中的序列一致。

2.2 莲雾果实 *C4H* 的生物信息学分析

利用 ExPASy 对莲雾果实 *C4H* 的 ORF



说明: 氨基酸下的下划线依次表示特殊的底物结合域(从 N 端到 C 端), 包括 SRSL、SRS2、SR4、SR5 和 SR56。

Notes: The underlines under the amino acids indicated the special substrate-binding domains sequentially (from the N-terminus to the C-terminus), including SRSL, SRS2, SR4, SRS5 and SRS6.

图 1 莲雾果实中 *C4H* 的核苷酸和编码氨基酸序列
Fig.1 Nucleotide and encoded amino acid sequences of *C4H* in wax apple fruit

编码氨基酸序列进行理化性质分析，C4H 蛋白质分子式是 $C_{2625}N_{732}O_{716}S_{17}$ ，原子总数 8 260，分子质量 57.985 ku，等电点为 9.34。属于亲水性蛋白质（总的亲水性平均系数为 -0.233）、不稳定蛋白质（不稳定性指数 48.36）。在氨基酸的构成中，亮氨酸（Leu）占比最多（12.1%），其次为缬氨酸（Val），占比为 7.9%，半胱氨酸（Cys）占比最少，仅为 0.6%。该基因编码的氨基酸中，正电荷氨基酸残基数（Arg + Lys）为 73，负电荷氨基酸残基数（Asp + Glu）为 62。

保守结构域分析结果如图 2 所示，C4H 蛋白质含有 P450（cytochrome P450）和 PLN02394（trans-cinnamate 4-monooxygenase）两个保守结构域。C4H 催化位点残基包括 I₁₀₉、K₁₁₃、V₁₁₈、F₂₂₀、E₃₀₁、N₃₀₂、I₃₀₃、V₃₀₅、A₃₀₆、T₃₁₀、R₃₆₆、R₃₆₈、A₃₇₀、I₃₇₁、P₃₇₂、L₃₇₄、V₃₇₅、P₃₇₆、H₃₇₇、K₄₈₄、F₄₈₈、L₄₉₀。这些催化位点分布在 5 个特殊的底物结合区域，包括 SRS1、SRS2、SRS4、SRS5 和 SRS6（见图 1）。利用 NetPhos 2.0 预测莲雾果实 C4H 蛋白质发现含有 28 个磷酸化位点，包括 14 个丝氨酸（Ser）、8 个苏氨酸（Thr）和 6 个酪氨酸（Tyr）（见图 3）。



图 2 莲雾果实 C4H 蛋白质保守结构域分析

Fig.2 The conserved domain in C4H protein of wax apple fruit

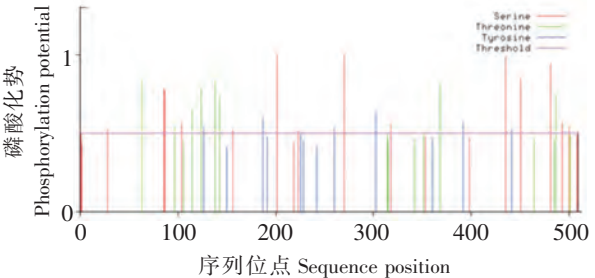


图 3 莲雾果实 C4H 蛋白质磷酸化位点分析

Fig.3 Phosphorylation site analysis of wax apple fruit C4H protein

进一步对莲雾果实 C4H 结构功能研究，采用 Signal P 4.1 Server 对氨基酸序列信号肽进行预测，结果如图 4 显示，其多肽链第 29 号赖氨酸（Lys）残基具有最高的原始剪切位点分值 0.246，第 11 号亮氨酸（Leu）残基具有最高的综合剪切位点分值 0.213，第 5 号亮氨酸（Leu）残基具有最高的信号肽分值 0.492，表明莲雾果实 C4H 不存在信号肽酶切位点，不具有信号肽。利用 TMHMM 对莲雾 C4H 编码的氨基酸序列跨膜结构域进行预测，结果显示，整条多肽链不存在跨膜结构域，不是膜上的受体或者定位于膜上（见图 5）。

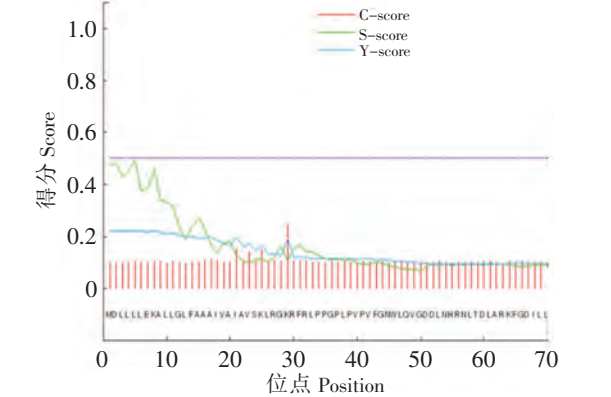


图 4 莲雾果实 C4H 蛋白信号肽预测

Fig.4 Signal peptide prediction of wax apple

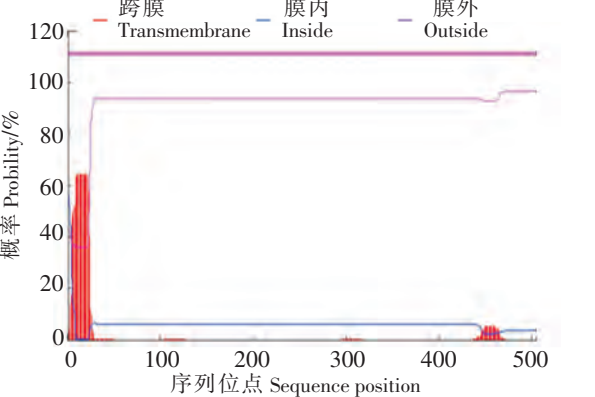


图 5 莲雾果实 C4H 蛋白跨膜结构域预测

Fig.5 Transmembrane domain prediction of fruit C4H protein wax apple fruit C4H

利用 DNAMAN 软件对不同种类植物 C4H 蛋白质进行多重比对, 分析 C4H 蛋白质的相似性, 结果如图 6 显示。可见, 莲雾果实 C4H 蛋白质与已研究报道的橄榄、梨、芒果、银杏 C4H 蛋白质具有较高的相似性, 进一步证明了从莲雾果实中获得的基因是 *C4H* 基因。之前的研究还证明, 芒果、梨、银杏的 *C4H* 表达水平与木质素的合成具有正相关关系, 是木质素调控的关键基因, 进而推断莲雾果实 *C4H* 可能也具有此功能。

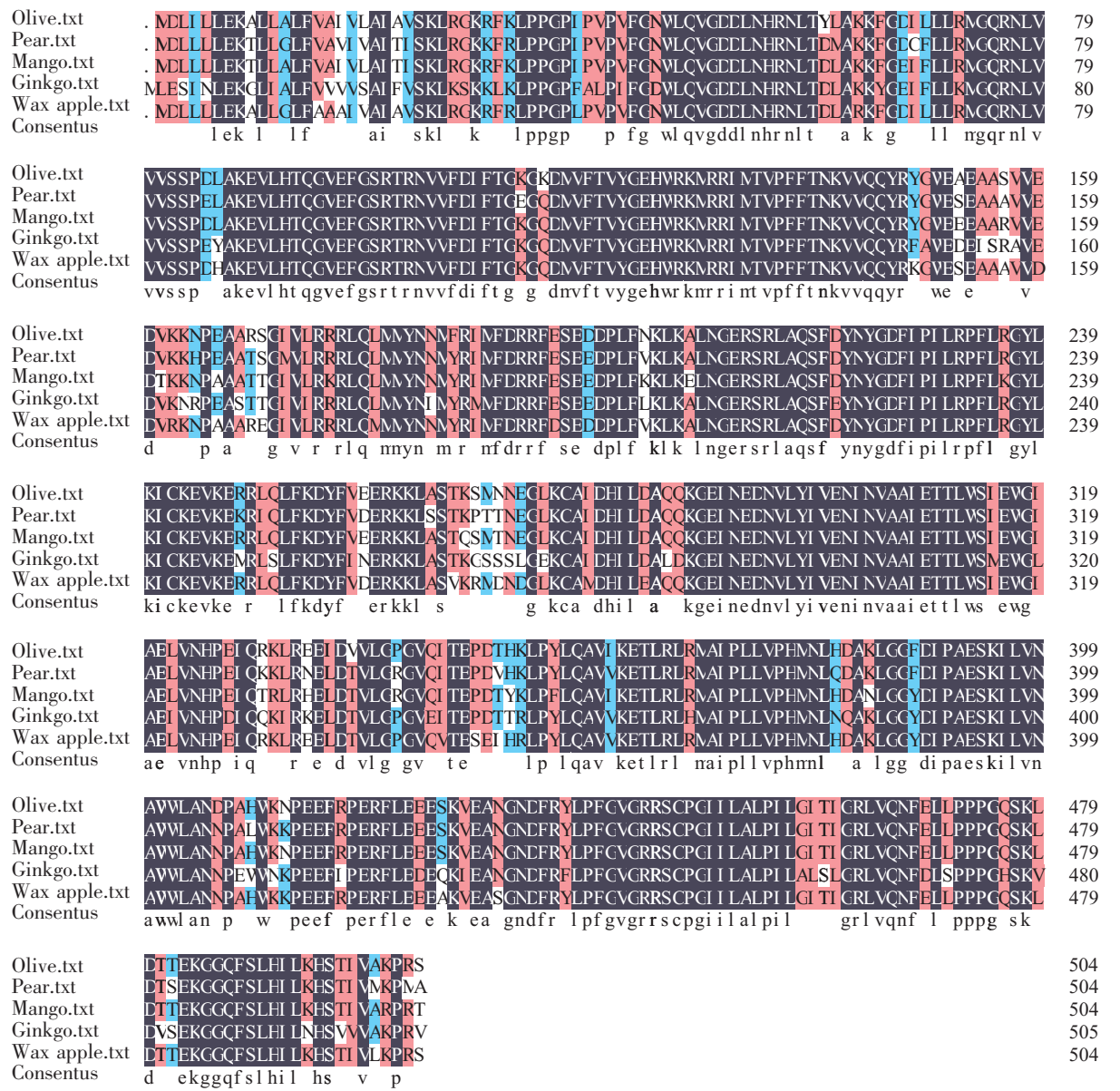


图 6 莲雾 C4H 蛋白质序列的同源比对

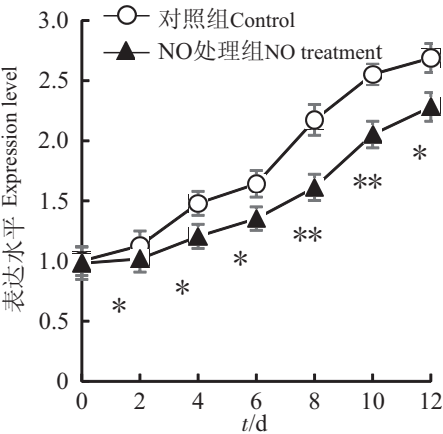
Fig.6 Homologous alignment of wax apple fruit C4H protein sequence

2.3 NO 处理下莲雾果实 C4H 表达分析

采用实时荧光定量 PCR 技术对莲雾果实 *C4H* 表达水平进行分析, 结果如图 7 所示, 在贮藏期间, 采后莲雾果实 *C4H* 的表达水平逐渐增加。对照果实 *C4H* 表达水平在贮藏前两天略有上升, 随后迅速上升; 而 NO 处理组果实 *C4H* 的表达水平变化趋势相同, 但 NO 处理组果实 *C4H* 的表达水平低于对照组。显著性分析表明, NO 处理组莲雾果实 *C4H* 的表达水平在贮藏第 2 ~ 12 d 显著低于对照组 ($P < 0.05$)。由此可见, NO 可以抑制采后莲雾果实 *C4H* 的转录水平。

2.4 NO 处理下木质素含量变化的分析

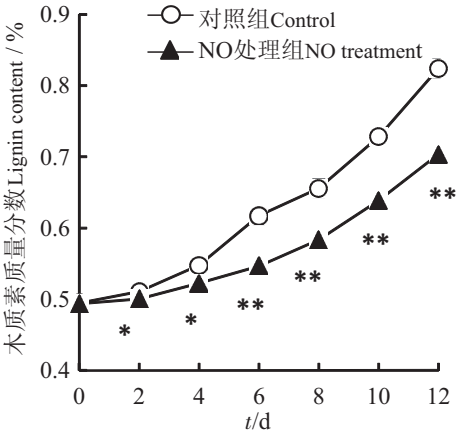
图 8 显示，采后莲雾果实木质素含量随贮藏时间的延长而增加。对照组果实木质素含量从第 0 ~ 4 天逐渐升高，贮藏第 4 ~ 12 天木质素含量迅速上升；而 NO 处理组果实中木质素含量从第 0 ~ 2 天缓慢上升，然后逐渐增加。显著性分析表明，在果实贮藏第 2 ~ 12 天，NO 处理组果实木质素含量显著低于对照果实 ($P < 0.05$)。由此可见，使用 NO 处理采后莲雾果实，可显著抑制采后莲雾果实木质素含量积累。



说明：* 和 ** 分别是对照组与 NO 处理组果实测定指标在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 的显著性差异。

Notes: The mark * and ** represent the significant differences ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) between NO treatment wax apple and the control wax apple on each evaluation day.

图 7 NO 对莲雾 C4H 相对表达量的影响



说明：* 和 ** 分别是对照组与 NO 处理组果实测定指标在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 的显著性差异。

Notes: The mark * and ** represent the significant differences ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) between NO treatment wax apple and the control wax apple on each evaluation day.

图 8 NO 对莲雾木质素含量的影响

Fig.7 Effect of NO on the relative expression of C4H

Fig.8 Effect of NO on lignin content of wax apple

3 讨论

苯丙烷类代谢途径是植物重要的次生代谢途径之一，此途径以苯丙氨酸为底物，在一系列酶的催化作用下，合成黄酮、木质素、香豆素等多种次生代谢产物^[19]。木质素是植物细胞壁的主要成分，与纤维素一起参与植物根茎的生长以及影响一些水果的软化^[13]。其他次生代谢产物如黄酮醇、花青素、异黄酮以及其他类黄酮物质在植物生长、抗病性和抗应激性中发挥重要作用^[19]。C4H 是植物苯丙烷代谢通路中第 1 个单氧化酶，该酶在植物细胞中的含量可以影响木质素等多种次生代谢物质的合成^[1]。因此，在不同植物中鉴定出 C4H 将对促进经济作物生产或调控果蔬品质发挥关键作用。C4H 已在多种植物中被鉴定，但在莲雾果实中还未有报道，本研究采用 qRT-PCR 技术从莲雾果实中获得 C4H 基因。

C4H 蛋白质含有细胞色素 P450 和反式肉桂酸 - 4 - 单加氧酶结构域^[2,20]。这两个特征域在莲雾果实 C4H 蛋白质中均被预测到，表明克隆得到的基因为莲雾果实的 C4H 基因。莲雾 C4H 蛋白质中鉴定出 5 个特殊的底物结合区域（见图 1），是此蛋白质的功能区域。C 端的 SRS5、SRS6 和 SRS4 是以芳香环为底物的结合位点，N 端的 SRS4、SRS1 和 SRS2 是以脂肪链为底物的关键结合区域^[22]。莲雾果实 C4H 所含的结构域表明，它是具有催化功能的 C4H/CYP73A5 家族成员。细胞内蛋白质磷酸化与信号转导密切相关，其磷酸化部位主要包括丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸结合位点^[23]。磷酸化后可改变蛋白质的活性，这种改变在植物生理生化应答反应过程中起重要作用^[24]。在莲雾果实 C4H 蛋白质中观察到 15 个磷酸化位点，这些预测的位点在催化活性中起关键作用。莲雾果实 C4H 蛋白质与已研究的橄榄、梨、芒果、银杏 C4H 蛋白质具有较高的相似性，说明 C4H 蛋白在植物间具有较高的保守性以及推测这些蛋白质的功能也具有相似性。

已有研究^[25]表明,木质素的积累量与 C4H 的表达水平有着密切的关系,如刺梨木质素含量的变化趋势和 C4H 的变化趋势相同,两者表现出显著正相关关系;Wang 等^[26]发现 C4H 表达水平的上调抑制苹果中木质素的合成。在采后莲雾果实贮藏期间,C4H 的表达水平和木质素积累量逐渐增加,相关性分析显示,莲雾果实 C4H 表达水平与木质素含量相关性达 0.972,呈极显著正相关,表明莲雾 C4H 与木质素合成密切相关。适宜浓度的 NO 能够抑制细胞壁代谢相关酶活性,延缓了果实软化与衰老,从而维持采后果蔬的贮藏品质^[27]。本研究中 10 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ NO 显著抑制了莲雾果实 C4H 的表达水平和木质素含量 ($P < 0.05$)。由此可见,外源 NO 处理可能是通过抑制 C4H 的转录水平来抑制木质素的合成速度,从而延缓莲雾果实中心絮状绵软的进程,为将 NO 处理用于采后莲雾果实品质保持提供理论依据,也为揭示 C4H 基因调控莲雾果实木质素合成机理奠定了理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] LI W, YANG L X, JIANG L Z, et al. Molecular cloning and functional characterization of a cinnamate 4-hydroxylase-encoding gene from *Camptotheca acuminata* [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38 (11): 256. DOI: 10.1007/S11738-016-2275-7.
- [2] LIU Z H, TAVARES R, FORSYTHE E S, et al. Evolutionary interplay between sister cytochrome P450 genes shapes plasticity in plant metabolism [J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 13026. DOI:10.1038/NCOMMS13026.
- [3] UMEMOTO N, NAKAYASU M, OHYAMA K, et al. Two cytochrome P450 monooxygenases catalyze early hydroxylation steps in the potato steroid glycoalkaloid biosynthetic pathway [J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(4): 2458-2467. DOI: 10.1104/PP.16.00137.
- [4] SADEGHI M, DEGHAN S, FISCHER R, et al. Isolation and characterization of isochorismate synthase and cinnamate 4-hydroxylase during salinity stress, wounding, and salicylic acid treatment in *Carthamus tinctorius* [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2014, 8(11): e27335. DOI:10.4161/PSB.27335.
- [5] 赵乐, 马利刚, 杨泽岸, 等. 独行菜 C4H 基因克隆与表达分析 [J]. *药学报*, 2017, 52(5): 821-831.
- [6] SINGH K, KUMAR S, RANI A, et al. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2009, 9(1): 125-134. DOI:10.1007/S10142-008-0092-9.
- [7] 刘宽亮, 赵志常, 高爱平, 等. 芒果 C4H 基因的克隆及其表达分析 [J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(14): 8-12.
- [8] 程俊, 程曦, 盛玲玲, 等. 杨山酥果肉桂酸 4-羟化酶基因的克隆及表达分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(11): 1698-1708.
- [9] 曾祥玲, 郑日如, 罗靖, 等. 桂花 C4H 基因的克隆与表达特性分析 [J]. *园艺学报*, 2016, 43(3): 525-537.
- [10] SUPAPVANICH S, PIMSAGA J, SRISUJAN P. Physicochemical changes in fresh-cut wax apple (*Syzygium samaran* genese [Blume] Merrill & L. M. Perry) during storage [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(3): 912-917. DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2011.01.058.
- [11] 高维亚, 吴光斌, 陈发河. NO 处理对采后莲雾果实絮状绵软进程的影响 [J]. *食品科学*, 2016, 37(18): 208-215.
- [12] ZHAO S G, WEN J, WANG H X, et al. Changes in lignin content and activity of related enzymes in the endocarp during the walnut shell development period [J]. *Horticultural Plant Journal*, 2016, 2(3): 141-146. DOI:10.1016/J.HPJ.2016.08.003.
- [13] NACZK M, TOWSEND M, ZADERNOWSKI R, et al. Protein-binding and antioxidant potential of phenolics of mango-steen fruit (*Garcinia mangostana*) [J]. *Food Chemistry*, 2011, 128(2): 292-298. DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2011.03.017.
- [14] LI H, SUO J T, HAN Y, et al. The effect of 1-methylcyclopropene, methyl jasmonate and methyl salicylate on lignin accumulation and gene expression in postharvest 'xuxiang' kiwifruit during cold storage [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2017, 124: 107-118. DOI:10.1016/J.POSTHARVBIO.2016.10.003.
- [15] SEWALT V, NI W, BLOUNT J W, et al. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco <http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

- down-regulated in expression of l-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase [J]. *Plant Physiology*, 1997, 115(1): 41-50. DOI:10.1104/pp.115.1.41.
- [16] DOCIMO T, CONSONNI R, CORAGGIO I, et al. Early phenylpropanoid biosynthetic steps in *cannabis sativa*: link between genes and metabolites [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(7): 13626-13644. DOI:10.3390/IJMS140713626.
- [17] CHENG S Y, YAN J P, MENG X X, et al. Characterization and expression patterns of a cinnamate-4-hydroxylase gene involved in lignin biosynthesis and in response to various stresses and hormonal treatments in *Ginkgo biloba* [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2018, 40: 1-15. DOI:10.1007/S11738-017-2585-4.
- [18] HAO Y Q, CHEN F H, WU G B, et al. Impact of postharvest nitric oxide treatment on lignin biosynthesis-related genes in wax apple (*Syzygium samarangense*) fruit [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(45): 8483-8490. DOI:10.1021/ACS.JAFC.6B03281.
- [19] XIONG D D, LU S K, WU J Y, et al. Improving key enzyme activity in phenylpropanoid pathway with a designed biosensor [J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 115-123. DOI:10.1016/J.YMBEN.2017.01.006.
- [20] GORDEZIANI M S, VARAZI T G, PRUIDZE M V. Structural-functional organization of cytochrome P450 containing monooxygenase and some aspects of modeling [J]. *Annals of Agrarian Science*, 2016, 14(2): 82-94. DOI:10.1016/J.AASCI.2016.05.007.
- [21] LIU F, CHEN J R, TANG Y H, et al. Isolation and characterization of cinnamate 4-hydroxylase gene from cultivated ramie (*Boehmeria nivea*) [J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2018, 32(2): 324-331. DOI:10.1080/13102818.2017.1418675.
- [22] RUPASINGHE S, BAUDRY J, SCHULER M A. Common active site architecture and binding strategy of four phenylpropanoid P450s from *Arabidopsis thaliana* as revealed by molecular modeling [J]. *Protein Engineering Design and Selection*, 2003, 16(10): 721-731. DOI:10.1093/PROTEIN/GZG094.
- [23] 刘佳, 徐秉良, 薛应钰, 等. 美洲南瓜 (*Cucurbita pepo*) 种皮苯丙氨酸解氨酶基因克隆与表达分析 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47(6): 1216-1226.
- [24] 肖培连, 冯睿杰, 侯丽霞, 等. 葡萄 WRKY18 基因的克隆及表达特性分析 [J]. *植物生理学报*, 2015, 51(3): 391-398.
- [25] 刘玉倩. 刺梨果实中木质素合成及相关基因的表达分析 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2015.
- [26] WANG R, YANG H J, YANG X, et al. Four phenolic acids determined by an improved HPLC method with a programmed ultraviolet wavelength detection and their relationships with lignin content in 13 agricultural residue feeds [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(1): 53-60. DOI:10.1002/JSFA.5727.
- [27] 朱树华, 周杰, 束怀瑞, 等. 一氧化氮延缓草莓成熟衰老的生理效应 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(7): 1418-1424.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)