

木质素的生物合成及其分子调控*

蔺占兵 马庆虎** 徐洋

中国科学院植物所光合作用和环境分子生理学开放实验室, 北京 100093

摘要 木质素在植物的生长发育和系统进化过程中的重要意义及其在人类日常生活中的重要作用正受到越来越多的关注. 根据近年来木质素研究领域的最新进展, 总结了木质素生物合成的可能途径, 并就基因工程在木质素研究中的策略进行了讨论, 提出一些可行的建议和设想.

关键词 木质素 生物合成 分子基础 遗传操作

木质素是维管植物细胞壁的重要组成部分, 是细胞壁在次生加厚过程中形成的主要结构物质. 纤维素和蛋白质等是通过规律的化学键连接而形成的功能与结构相统一的生物大分子, 木质素则是由香豆醇、松柏醇、和芥子醇等3种主要的木质醇(monolignol)以多种不同化学键连接而成, 它没有光学活性. 这些木质醇是羟基化和甲基化程度不同的苯丙烷衍生物, 在木质素分子中分别形成了羟基苯(H)、松柏醇残基(G)和丁香醇残基(S)等结构单元. 过氧化物酶和漆酶在木质醇的氧化聚合过程中可能具有重要作用. 目前, 已知松柏醛、5-羟基松柏醛与羟基肉桂醛等不常见的苯丙烷结构单元也参与了木质素的形成^[1].

木质素主要分布在木质部的管状分子和纤维、厚壁细胞、厚角细胞、特定类型表皮细胞的次生细胞壁中. 木质素沉积在植物细胞壁后赋予了细胞壁坚硬的结构特征. 木质素能够与纤维素、半纤维素等其他细胞壁成分相互交联成结构复杂的细胞外基质, 增强了植物细胞与组织的机械强度和负重能力; 它疏水的化学本质, 使植物细胞不易透水, 为水分、矿物质和有机物在植物体内的长距离运输提供了可靠保障; 木质素的这种结构客观上也形成了一个物理屏障, 有效地阻止了各种植物病原物的侵入. 木质素在自然界中的含量相当丰富, 仅次于纤维素, 陆生植物每年大约固定 1.4×10^{12} kg 碳素,

其中30%贮存在木质素分子中^[2]. 不同植物木质素含量不尽相同, 木材中的木质素约占干重的27%~32%; 禾本科植物中木质素含量为14%~25%. 木质素是植物从水生到陆生的物质基础, 它的出现加强了植物特别是小麦、玉米等重要的粮食作物茎秆的耐受能力, 也增强了植物对生物与非生物逆境的防御和抵抗能力. 它在工农业生产中具有重要作用, 木质素含量高低与组成的不同直接影响造纸用材的品质, 高含量的木质素成为造纸工业的限制因素, 增加了制浆造纸过程的成本与消耗, 带来了日益严重的环境污染. 另外, 木质素不容易被食草动物消化, 降低了饲料作物如苜蓿的营养价值.

基于木质素在植物生长发育及工农业生产中的重要作用, 对木质素生物合成的研究工作正受到人们的重视. 随着分子生物学在该领域的渗透, 对木质素生物合成的了解正在不断深入与完善.

1 木质素的生物合成途径

木质素合成途径是植物体中十分复杂的生理生化过程, 它的合成经过脱氨基、羟基化、甲基化和氧化还原等过程. 其组成单体—木质醇是在细胞质中合成的, 然后转运到细胞壁再聚合合成木质素. 有关木质素生物合成途径已有很多文献, 本文根据一些新的进展对木质素代谢进行了修改与补充. 其中比较突出的是香豆酸-3-羟基化酶(C3H), 芥子醇

2002-12-11 收稿, 2003-03-27 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 30070067), 北京市自然科学基金(批准号: 503211), 科技部转基因专项(J99-A-031)以及中国科学院创新工程联合资助项目

** 联系人, E-mail: mqh@ns.ibcas.ac.cn

最近, 利用功能基因组的方法首次证明从拟南芥中分离得到的 CYP98A3 是 C3H 基因, 证实 C3H 属于 P450 蛋白, 它催化的底物为香豆酰莽草酸和香豆酰奎尼酸^[3], 生成相应咖啡酸的共轭物. Franke 等从拟南芥 *ref8* 突变体中分离的 REF8 基因就是 CYP98A3, 进一步确证了 CYP98A3 是 C3H. *ref8* 的木质素减少, 几乎都由香豆醇组成, 缺少了野生型中松柏醇基和丁香醇基的木质素组成^[4], 直接证明了香豆酰莽草酸或香豆酰奎尼酸可能是木质素合成中重要的中间代谢物. F5H 也是一种 P450 依赖的单加氧酶, 曾经认为它催化阿魏酸到 5-羟基阿魏酸的转化. 最近, 在拟南芥、烟草和杨树体内过量表达 F5H 导致了木质素几乎全部由丁香基(S)单位组成^[5]. 体外喂饲实验表明芥子醇的生物合成与松柏醇有关, 酶促动力学分析发现 F5H 对松柏醛和松柏醇的亲合力是阿魏酸的上千倍^[6], 最适底物应该是松柏醛或松柏醇. COMT 的酶促动力学特征表明, 它的最适底物应该是 5-羟基松柏醛和 5-羟基松柏醇. 因此, 越来越多的证据表明: 木质醇苯环 C5 的羟基化作用和木质醇的甲基化作用可能是在相应的醛或醇的水平完成的.

肉桂酰辅酶 A 还原酶(CCR)催化木质素生物合成的氧化还原反应的第一步, 可能是木质素合成的限速反应, 控制着碳素进入木质素合成途径. 抑制 CCR 的植株木质素含量下降 50%, 影响植株的生长发育. 肉桂醇脱氢酶(CAD)催化木质素合成的另一步的氧化还原反应, 负责松柏醛的还原, 但最近发现杨树中芥子醇脱氢酶(SAD)主要催化芥子醛的还原. SAD, F5H 和 COMT 免疫定位于 S 型木质素存在的细胞和组织^[7], CAD 却存在于 G 型木质素沉积的组织^[7]. 推断不同类型的木质醇/木质素氧化还原的最后一步可能存在不同的合成途径, 由不同的酶催化完成.

木质化是一个非常复杂的生理过程, 涉及自由基聚合的氧化还原作用, 但一直没有得到关于过氧化物酶和漆酶催化各种木质醇聚合的直接证据. Hans 等发现过氧化物酶与锰离子能够在离体条件下合成木质素, 合成木质素的结构与天然木质素非常类似. 在这

一过程中, $Mn^{3+} - Mn^{2+}$ 的氧化还原穿梭在木质素合成中具有重要作用, 过氧化物酶并没有直接与木质醇接触而参与到木质素的合成中, 它将 Mn^{2+} 氧化为 Mn^{3+} , Mn^{3+} 通过扩散作用于各种木质醇或木质素前体接触, 可以催化木质醇或木质素末端基团自由基的形成, 后者形成木质素分子中各种共价键^[8].

目前有几种不同假说用来解释木质化过程, 一种为随机假说(random coupling model): 认为木质醇分子通过氧化偶合作用逐步连接到木质素多聚体上, 木质素分子末端木质醇种类与分子的多少及化学偶合特征控制着木质素的形成^[9]; 随机假说合理之处在于它解释了突变体和转基因研究中木质素生物合成过程的可塑性. 另一种假说为操纵蛋白模型(dirigent protein model), 认为木质化过程是在操纵蛋白(dirigent protein)的严格调控下进行的, 操纵蛋白控制着木质素分子中特定化学键的形成^[10]. 该假说说明了木质素代谢应该是一个有序的生命过程, 解释了木质素分子中大量 β -O-4 连接出现的原因. Dixon 等认为芥子醇与松柏醇的形成是一个相对独立的过程, 参与芥子醇合成的酶彼此关联形成多酶复合体, 该复合体通过肉桂酸-4-羟基化酶(C4H), C3H, C5H 等 P450 蛋白结合在细胞内膜系统, 使得芥子醇合成途径的脱氨基, 羟基化, 甲基化和氧化还原等一系列反应有序进行. 松柏醇的合成是通过另一条途径进行的, 在胞质中完成. 苯丙氨酸氨基裂解酶(PAL), 咖啡酰 CoA 甲基转移酶(CCOMT), CCR 与 CAD 分布在细胞质中, 催化着松柏醇形成的各步反应^[11].

2 木质素合成的分子调控

由于木质素重要的商用价值, 人们开始用分子生物学的手段对苜蓿, 桉树与杨树等一些重要植物的木质素进行改造, 希望能够从源头改变木质素的组成与含量. 目前, 木质素生物合成途径中几乎所有酶的基因都已经被克隆, 并在一些重要的资源植物中进行了遗传操作(表 1). 结果表明 COMT, CCOMT, F5H, CCR 和 CAD 等在木质素合成中发挥着重要的调控作用.

表 1 木质素生物合成的基因工程

基因	植物	方法	酶活性降低/%	木质素组成	木质素含量/%	文献
PAL	烟草	共抑制	80	G 下降	下降 70	[12]
	烟草	共抑制	83	甲基含量增加	下降 43	[13]

续表

基因	植物	方法	酶活性降低/%	木质素组成	木质素含量/%	文献
C3H	拟南芥	突变体(<i>ref8</i>)	-	H增加, G、S减少	下降40	[14], [4]
C4H	烟草	反义	80	S下降	下降80	[13]
F5H	拟南芥	过表达	-	仅含S	-	[15]
	烟草, 杨树	过表达	-	S上升	下降25	[5]
4CL	拟南芥	反义	92	G下降	下降30	[16]
	杨树	反义	90	纤维素增加	下降45	[17]
	烟草	正义和反义	99	S下降	下降34	[18]
	烟草	反义	-	S下降	不变	[19]
COMT	杨树	反义	90	G增加	不变	[20]
	烟草	反义	60	G, S下降	下降35	[13]
	杨树	共抑制	75	S下降	不变	[21]
	杨树	反义	95	S下降, 5-OHG	不变	[22]
	烟草	反义	70	不变	下降15~58	[23]
	苜蓿	反义, 共抑制	96	G下降, S消失	下降13~29	[24]
CCOMT	烟草	反义	70~80	G, S均下降 G/S降低	下降47	[25]
	苜蓿	反义	96	G下降, S不变	下降17	[24]
CCR	烟草	反义	70	G, S下降, S/G增加	减少47	[26]
	拟南芥	突变体(<i>irx4</i>)	-	G, S下降	下降50	[27]
CAD	杨树	反义	70	S增加	变化不大	[20]
	苜蓿	反义	70	S降低	不变	[28]
	玉米	突变体(<i>bm1</i>)	60~70	G, S下降	下降20	[29]
	松树	突变体	-	松柏醛增加	下降9	[30]
	高粱	突变体	-	-	下降15~25	[31]

PAL或香豆酸-4-羟基化酶(C4H)受到抑制后, 转基因烟草的 Klason 木质素含量都不同程度地降低, S/G 值发生改变. 但 C4H 导致了木质素分子中 S 单元的减少, 类似于 COMT 和 F5H 被抑制后结果. 因此, G 型木质素可能存在另外的通路, 或者 C4H 可能与其他酶形成多酶复合体来控制 S 型木质素的形成. F5H 的过量表达导致拟南芥的木质素几乎都是由 S 型单元组成, 抑制它的表达木质素的 S 单元明显降低, 进一步确证了 F5H 是 S 型木质素合成的控制点. C3H 的作用是将木质醇合成过程中苯环的 C₃ 的羟基化, 但它的催化底物一直被认为是 对-香豆酸. 得到的拟南芥 *ref8* 突变体的表型表明, 缺失了 C3H 基因, 植株的木质素下降了 20%~40%, 木质素的组成发生了明显变化, 在野生型拟南芥含量很少的 H 型单元是突变体木质素的主要成分, 而野生型中的主要组成成份 G 和 S 单元在 *ref8* 中含量非常少^[14].

木质素合成中研究较多的是 COMT. 在转基因烟草、杨树和苜蓿中, COMT 的下调对 S 型木质素的影响比较大, G 型木质素受它的影响较小, 木质素分子中有 5-羟基松柏醇残基的积累, 这与 COMT 在木质素合成途径中重新定位是一致的. 用插入突

变获得的玉米 *brown midrib3* 突变体, COMT 活性仅有野生型的 20%, 木质素的 S/G 比明显下降, 但 Klason 木质素含量不变. 用维管组织特异表达启动子来调节 COMT 的转录^[24], COMT 下调导致了苜蓿 Klason 木质素下降了 30%, 乙酰溴法测定的木质素变化不大, 但 G 和 S 残基含量明显降低. 我们对小麦 COMT 基因的分选及其表达特征都已经作了初步研究, 有关功能分析正在进行^[32].

CCOMT 是木质醇合成中另外一个催化甲基化作用的酶. 烟草、苜蓿的 CCOMT 被抑制后, 其 Klason 木质素含量有相应的降低, 当 CCOMT 的活性几乎完全被抑制时, 苜蓿 G 木质素下降 50%, 但对 S 木质素没有影响^[13], 推测 CCOMT 可能也参与了苜蓿 G 型木质素的甲基化作用. 因此不同木质素的甲基化作用存在着一定差异, CCOMT 和 COMT 共同作用合成 G 型木质素, CCOMT 可能不参与 S 型木质素的甲基化过程.

不同植物的 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4-CL)活性受到抑制后对木质素含量与组成的影响不尽相同. 烟草 4-CL 活性变化导致木质素含量、木质素分子中肉桂醛和 S 残基含量的变化, S/G 也在 0.45~

2.0 之间波动. 拟南芥 4-CL 活性抑制后 G 型木质素降低, 不影响 S 型木质素的变化. 杨树的 4-CL 活性的变化仅影响木质素含量的变化, 对木质素组成没有明显的作用^[17].

利用反义核酸技术能够抑制 70% 的 CCR 活性, 木质素及其分子中 G 残基含量都下降, 导致了木质素 S/G 比率增加, 有些株系木质素 S 残基含量也有明显下降. 缺失了 CCR 基因的拟南芥突变体 *irx4* 的木质素下降 50%, G 和 S 残基也明显下降. 植株呈现出生长缓慢, 株型明显矮化, 其育性受到明显影响^[27]. 我们已经分离了小麦 CCR 基因, 分析了 CCR 基因在小麦根、茎和叶的表达特征^[33], 并得到了一些转基因烟草株系, 转基因烟草木质素下降了 11.7%, 成熟植株的株高约为野生型的 2/3. 抑制 CAD 活性, 木质素中出现了一种新的组分-肉桂醛. 因为木质素分子中 S 残基含量降低, 苜蓿木质素的 S/G 比率下降^[28]. 利用有性杂交同时抑制 CCR 和 CAD 活性导致烟草木质素下降 50%, S 型和 G 型木质素均有不同程度的降低, G 型木质素下降明显, 转基因烟草的发育正常^[34], 使 CCR 单基因的转基因烟草株形变矮的性状得以恢复. CCR 或 CAD 对木质素分子中 S/G 比率的影响要小于 F5H 或 COMT 的作用. 合理的解释是 CCR 和 CAD 是 G 型和 S 型木质素合成都必需的, 而 F5H 和 COMT 主要负责 S 型木质素的生物合成.

3 木质素生物合成的遗传操作

不论是为了阐明木质素代谢途径, 还是为开发新的植物资源, 遗传工程技术都发挥着重要的作用. 木质素在工农业方面的重要作用, 使得该领域的研究受到重视. 基于有关木质素代谢途径中的基因大多被分离, 因此利用转基因手段来调控资源植物木质素结构、组成与含量. 在改造目的植物的同时, 也促进了木质素生物合成途径的研究. 如 CCOMT 的发现证明木质素合成的甲基化作用是多途径进行, C3H 的克隆对羟基化过程进行了补充, F5H 和 COMT 生化特征的研究阐明了 G 型向 S 型木质素前体转化可能发生的位置. 下面概述木质素遗传操作的各种调控手段.

3.1 单基因的遗传操作

目前, 大多数转基因研究是通过反义或正义核酸技术调控木质素合成过程中某一个基因来实现对目的植物木质素的改造. 涉及苜蓿、杨树、松树、

玉米和小麦等被子植物和裸子植物(见表 1). 获得的转基因植株不同程度地影响到植株的生长发育^[35], 表现出木质素含量和组成上的变化. 就结构而言, S 单元和 G 单元苯环的 3'和 5'的 C 原子甲基化程度的不同, 分子间形成 5'-5'共价键的可能性不同, 因此木质素分子中 S 和 G 含量的高低直接影响到造纸用材的品质. 传统的反义或正义核酸技术目的是调节木质素合成中某个单一基因的表达, 来调控木质素的含量、结构和组成. 这些外源基因在转基因植物中的表达状况受到外源基因的整合位点与拷贝数等多种因素的影响^[36], 尽管已经获得了一些理想转基因株系, 但对于复杂的木质素合成过程而言, 抑制某单一基因的表达经常会造成顾此失彼的结果.

引起干扰的小分子 RNA(SiRNA)是一种 21~26 nt 的双链 RNA, 它通过降解体内同源 RNA 或使同源 DNA 的甲基化作用来诱导基因沉默^[37]. SiRNA 能够抑制真核生物体中几乎所有基因的表达, 通过消除体内多余或缺陷 mRNA 来参与生物体的系统防御^[38]. 它的这种特点从而导致一种快速有效的基因功能分析方法诞生, 通过把目的基因完全相同的部分序列反向或正向连接, 置于特定的表达框架内, 使其在转基因植物体内表达, 形成 21~26 nt 的双链 SiRNA, 抑制目的基因的表达^[39]. 有关的研究已经有了一些进展, 但还没有发现在木质素的研究中有相关的报道.

3.2 多基因遗传操作

木质素代谢是植物体内比较复杂的生化过程, 存在着多基因、多条途径交互作用. 有选择地组合木质素合成不同基因, 可以阐明这些基因的作用机制, 也能够有目的地调控木质素的合成, 开发生产上有用的植物资源. 实现多基因调控的方法主要有: 不同基因纯合转基因株系有性杂交得到多基因转基因植株; 不同基因的二(多)次转化; 构建携带多个不同基因的表达载体来转化目的植物. 不同的方法存在其各自的优缺点, 需要根据不同的实验的条件、材料、目的来选择.

3.2.1 同时抑制木质素合成的多个基因 利用有性杂交技术将已经纯合的 COMT, CCR 或 CAD 转基因株系杂交或同时抑制相关基因表达的后代, 所有后代都不同程度地出现了目的基因沉默现象. 可能的原因是在不同的转基因株系重复使用 35S CaMV 启动子所

致。COMT与CCR或CAD的基因表达受到一些抑制,但抑制效果不稳定,木质素组成的变化并不理想^[40]。连续两次转化同一植株,已获得了同时抑制COMT和CAD的转基因杨树和同时抑制COMT和CCOMT转基因烟草。二次转化优点在于可以克服有性杂交的障碍,缩短研究周期。存在的问题在于因每个基因整合位点的距离,后代可能出现基因分离,而且二次转化也容易诱导基因沉默^[41]。

最近,报道了一种用单基因同时抑制木质素代谢途径中多个基因表达的方法。它将代谢途径中的一些关键酶基因的部分序列体外重组,构建包含有多个正义基因片段的表达载体。这些基因片段连接为一个“基因”,置于同一表达框架内,在转基因植物体内可以同时抑制每一个片段同源基因的表达。Abbott用COMT,CCR和CAD部分序列两两组合和3个基因片段构建的一个嵌合基因,同时成功地抑制了烟草COMT,CCR和CAD的表达。不同株系COMT,CCR和CAD的酶活性都有明显下降,CAD-COMT的转基因株系Klason木质素含量降低了29%,CAD-COMT-CCR的转基因植株木质素下降了17%。木质素组成与结构都有明显变化,分子中S残基显著降低,木质部导管扭曲变形。植株生长发育受到严重影响,转基因株系特别是CAD-COMT-CCR的株系生长缓慢,植株矮化^[42]。

3.2.2 同时过量表达木质素合成的多个基因 通过基因工程方法过量表达木质素合成中重要基因的研究工作并不多,主要是缺乏合适的表达载体。利用正义核酸技术获得的转基因植株,并没有表现出木质素含量升高的结果。木质素含量、结构和组成上的变化反而与反义核酸的结果基本相同,这可能是基因之间同源抑制所致。2A多蛋白体系为同时过表达复杂代谢途径中的多个基因提供了可能。2A是一段来自口蹄疫病毒(FMDV)的DNA片断,编码由QLLNFDLLKLAGDVESNPG组成的19肽^[43]。2A能够在翻译水平介导通过它相连的两个或多个蛋白之间的分离,产生具有一定生物学功能如催化作用的蛋白质。最初,2A多蛋白体系应用在哺乳动物、人、昆虫与真菌的研究中,最近在植物特别是木质素等复杂的代谢过程开始了一些研究工作。

Franke等^[5]首先用这种方法在烟草中表达了拟南芥的F5H,导致了烟草茎木质素中S单元显著增加。他们还构建表达了GUS-2A-F5H和GUS-2A-COMT-2A-F5H等多蛋白体系,这些多蛋白结构都能够正确

翻译、剪切并分离为GUS-2A、COMT-2A、F5H等单独的蛋白,而且F5H能够正确的定位。这种方法能够简单快速地在植物体内引进多个目的基因,实现同时用多个目的基因来调控木质素的合成。

4 问题与展望

关于木质素生物合成途径,已经提出了多种模型。这些模型从不同侧面阐述了木质素的形成,但木质素代谢途径中仍存在许多未知的领域,如木质素在不同的物种、不同的组织器官、不同的生长发育阶段可能存在着不同代谢途径,不同组成与结构及不同的功能,这些差异的成因,人类还知之不多,还不能精确地控制木质素的合成。无论是抑制木质素合成酶基因的表达来减少造纸用材工艺的消耗、改善牧草品质,还是提高木质素含量来增强农作物、树木的机械强度,仍有很多的工作要做。可喜的是免疫定位、同位素示踪技术、建立离体反应体系、免疫共沉淀、酵母双杂交技术和分子遗传操作等技术特别是一些新的分子调控手段的出现与完善,正在逐渐阐明木质素的生物合成,同时一定能够创造出影响人类生活的植物品种,开发出一些低消耗、安全性好的植物资源。

参 考 文 献

- 1 Ralph J, et al. NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamyl-alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95: 12803
- 2 Battle M, et al. Global carbon sinks and their variability inferred from atmospheric O₂ and δ13C. *Science*, 2000, 287: 2467
- 3 Schoch G, et al. CYP988A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic ester, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J Biol Chem*, 2001, 276: 36566
- 4 Franke R, et al. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of *Arabidopsis*. *Plant J*, 2002, 30(1): 47
- 5 Franke R, et al. Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *Plant J*, 2000, 22: 223
- 6 Osakabe K, et al. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96: 8955
- 7 Li L, et al. The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell*, 2001, 13: 1576
- 8 Önnerud H, et al. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis I.

- Plant Cell, 2002, 14: 1953
- 9 Syrjanen K, et al. Oxidative cross coupling of p-hydroxycinnamic alcohols with dimeric arylglycerol β -aryl ether lignin model compounds: The effect of oxidation potentials. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1998, 1: 3425
 - 10 Davin L B, et al. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiol*, 2001, 123: 453
 - 11 Dixon R A, et al. The biosynthesis of monolignols: a metabolic grid, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units. *Phytochemistry*, 2001, 57: 1068
 - 12 Sewalt V J H, et al. Lignin impact on fiber degradation: Increased enzymatic digestibility of genetically engineered tobacco stems reduced in lignin content. *J of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45: 1977
 - 13 Sewalt V J H, et al. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol*, 1997, 115: 41
 - 14 Franke R, et al. The Arabidopsis REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J*, 2002, 30(1): 33
 - 15 Marita J M, et al. NMR characterization of lignins in Arabidopsis altered in the activity of ferulate 5-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96: 12382
 - 16 Lee D, et al. Antisense suppression of 4-coumarate: coenzyme A ligase activity in Arabidopsis leads to altered lignin subunit composition. *Plant Cell*, 1997, 9: 1985
 - 17 Hu W J, et al. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth of transgenic trees. *Nature Biotechnology*, 1999, 17: 808
 - 18 Kajita S, et al. Alterations in the biosynthesis of lignin in transgenic plants with chimeric genes or 4-coumarate: coenzyme A ligase. *Plant Cell Physiology*, 1996, 37: 957
 - 19 Kajita S, et al. Structural characterization of modified lignin in transgenic tobacco plants in which the activity of 4-coumarate: coenzyme A ligase is depressed. *Plant Physiol*, 1997, 114: 871
 - 20 Lapierre C, et al. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiol*, 1999, 119: 153
 - 21 Tsai C J, et al. Suppression of O-methyltransferase gene by homologous sense transgene in quaking aspen causes red-brown wood phenotypes. *Plant Physiol*, 1998, 17: 101
 - 22 Van Doorselaere J, et al. A novel lignin in polar trees with a reduced caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity. *Plant J*, 1995, 8: 855
 - 23 Ni W, et al. Reduced lignin in transgenic plants containing an engineered caffeic acid O-methyltransferase antisense gene. *Transgenic Research*, 1994, 3: 120
 - 24 Guo D, et al. Down-regulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: Impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *Plant Cell*, 2001, 13: 73
 - 25 Zhong R, et al. Dual-methylation pathways in lignin biosynthesis. *Plant Cell*, 1998, 10: 2033
 - 26 Piquemal J, et al. Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant J*, 1998, 13: 71
 - 27 Louise J A, et al. Cloning and characterization of *irregular xylem4 (irx4)* a severely lignin-deficient mutant of Arabidopsis. *Plant J*, 2001, 26(2): 205
 - 28 Baucher M, et al. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa and the effect on lignin composition and digestibility. *Plant Molecular Biology*, 1999, 39: 437
 - 29 Halpin C, et al. *Brown midrib maize (bm1)-a* mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. *Plant J*, 1998, 14(5): 545
 - 30 Mackay J J, et al. Inheritance, gene expression, and lignin characterization in a mutant deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94: 8255
 - 31 Pilonel C, et al. Involvement of cinnamyl-alcohol dehydrogenase in the control of lignin formation in *Souham bicolor L Moench*. *Planta*, 1991, 185: 538
 - 32 Ma Q H, et al. Cloning of cDNA encoding COMT from wheat which is differentially expressed in lodging-sensitive and -resistant cultivars. *J Exp Bot*, 2002, 53: 2281
 - 33 Lin Z B, et al. Cloning and Expression Analysis of Two Wheat cDNAs Encoding Cinnamoyl-CoA Reductase. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43: 1043
 - 34 Chabanes M, 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. *Plant J*, 2001, 28(3): 257
 - 35 蔺占兵, 等. 木质素的生物合成与植物生长发育. *植物科学进展*, 2001, 4: 123
 - 36 Matzke A J M, et al. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr Opin Plant Biol*, 1998, 1: 142
 - 37 Hamilton A, et al. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J*, 2002, 21(17): 4671
 - 38 Phillip D Z. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*, 2002, 296: 1265
 - 39 Canto T, et al. Generation of siRNAs by T-DNA sequences does not require active transcription or homology to sequences in the plant. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002, 15(11): 1137
 - 40 Halpin C, et al. Enabling technologies for manipulating multiple genes on complex pathways. *Plant Mol Biology*, 2001, 47: 295
 - 41 Fujiwara T, et al. Inactivation of the nopaline synthase gene by double transformation: Reactivation by segregation of the induced DNA. *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 133
 - 42 Abbott J C, et al. Simultaneous suppression of multiple genes by single Transgenes. Down-regulation of three unrelated lignin biosynthetic genes in tobacco. *Plant Physiol*, 2002, 3(128): 844
 - 43 Ryan M D, et al. A model for non-stoichiometric, co-translational protein scission in eukaryotic ribosomes. *Bioorg Chem*, 1999, 27: 55