

· 研究报告 ·

## 蒙古冰草肉桂醇脱氢酶基因序列鉴定及功能分析

王贺萍<sup>1,2</sup>, 孙震<sup>2</sup>, 刘雨辰<sup>2</sup>, 苏彦龙<sup>2</sup>, 杜锦瑜<sup>2,5</sup>, 赵彦<sup>5</sup>, 赵竑博<sup>1</sup>  
王召明<sup>6</sup>, 苑峰<sup>6</sup>, 刘亚玲<sup>6</sup>, 吴振映<sup>2,3,4</sup>, 何峰<sup>2,3,4\*</sup>, 付春祥<sup>2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>华南农业大学园艺学院, 广州 510642; <sup>2</sup>中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 青岛 266101

<sup>3</sup>山东能源研究院, 青岛 266101; <sup>4</sup>青岛新能源山东省实验室, 青岛 266101; <sup>5</sup>内蒙古农业大学草原与  
资源环境学院/农业农村部饲草栽培、加工与高效利用重点实验室/草地资源教育部重点实验室,  
呼和浩特 010018; <sup>6</sup>内蒙古自治区牧草育种与良种繁育重点实验室, 呼和浩特 010018

**摘要** 肉桂醇脱氢酶(CAD)作为植物次生代谢尤其是木质素生物合成过程的关键酶,在调控植物生长发育和抵御生物/非生物胁迫等过程中发挥关键作用。蒙古冰草(即沙芦草(*Agropyron mongolicum*))耐旱耐寒,在我国北方荒漠草原区域广泛分布。为探讨CAD基因在蒙古冰草木质素合成和非生物胁迫抗性中的作用,从蒙古冰草全长转录组数据中筛选并克隆到1个CAD基因,序列长度1 083 bp,命名为AmCAD。该基因编码361个氨基酸残基,同源序列比对发现蛋白质序列保守区域含有2个Zn<sup>2+</sup>结合基序和NADP(H)辅因子结合基序,属于典型的CAD蛋白,且三维结构与AtCAD5相似。AmCAD在茎秆中高表达,对AmCAD重组蛋白的酶学性质分析表明,该蛋白对不同肉桂醛类底物均具有很强的催化能力,其中对松柏醛和芥子醛的底物亲和力更强。用不同浓度甘露醇模拟干旱胁迫,蒙古冰草AmCAD基因表达受到显著诱导。研究结果表明,AmCAD在蒙古冰草木质素合成和干旱胁迫抗性中发挥重要作用,可为提高蒙古冰草品质和抗逆性分子育种提供有价值的基因资源。

**关键词** 蒙古冰草, 肉桂醇脱氢酶, 木质素, 抗旱性

王贺萍, 孙震, 刘雨辰, 苏彦龙, 杜锦瑜, 赵彦, 赵竑博, 王召明, 苑峰, 刘亚玲, 吴振映, 何峰, 付春祥 (2024). 蒙古冰草肉桂醇脱氢酶基因序列鉴定及功能分析. 植物学报 59, 204–216.

蒙古冰草(即沙芦草*Agropyron mongolicum*)是禾本科多年生二倍体草本植物,茎叶柔软,根系高度发达,返青早,分蘖能力强,适应性强,是干旱草原上优良的多年生牧草,在我国天然牧场和人工草地播种中发挥重要作用。目前,蒙古冰草等优质牧草广泛种植于我国中西部荒漠草原,也作为生态修复草用于寒冷和干旱地区的生态恢复,是牧草生产和生态建设中的重要植物资源(林克剑等, 2023)。此外,蒙古冰草作为小麦(*Triticum aestivum*)的野生近缘种,为小麦等禾本科作物育种提供了重要的抗性基因资源,对研究物种起源与演化及遗传多样性具有重要意义(Che and Li, 2007)。

木质素是一种复杂的多酚聚合物,由单木酚通过

苯丙烷途径合成。木质素聚合物主要包括对羟基苯基木质素、愈创木基木质素和紫丁香基木质素3种类型(邱锐等, 2023)。目前已知有12种酶参与木质素合成,其中肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)可在NADPH作为辅助因子存在时还原松柏醛、芥子醛和对香豆醛,产生松柏醇、芥子醇和对香豆醇等木质素单体,是参与木质素单体合成的关键酶(李桢等, 2009)。CAD广泛存在于高等植物基因组中,参与干旱和盐胁迫等过程,与植物抗逆性密切相关(Ibrahim et al., 2019)。Janiak等(2016)研究表明, LuCAD6参与植物的干旱胁迫反应,导致亚麻(*Linum usitatissimum*)在长期干旱条件下根部积累木质素。在盐胁迫下,棉花(*Gossypium hirsutum*) CAD活性

收稿日期: 2023-08-09; 接受日期: 2023-12-19

基金项目: 内蒙古自治区种业科技创新重大示范工程“揭榜挂帅”项目(No.2022JBGS0014)、中央引导地方科技发展资金(No.2022ZY006)、呼和浩特市科技创新领域人才项目(“政产学研推用银”创新联合体项目)(No.2022RC-联合体-2)和山东能源研究院科研创新基金(No. SEII202142)

\* 通讯作者。E-mail: hefeng@qibebt.ac.cn; fucx@qibebt.ac.cn

发生改变, 在干旱和盐组合胁迫下, *CAD* 转录水平显著升高(Ibrahim et al., 2019)。全基因组分析表明, 植物中 *CAD* 基因以家族形式存在, 研究人员分别在甜瓜(*Cucumis melo*)、苜蓿(*Medicago sativa*)、水稻(*Oryza sativa*)和高粱(*Sorghum bicolor*)等物种中鉴定到5、7、12和14个不同的 *CAD* 序列(Tobias and Chow, 2005; Zhang et al., 2006; Saballos et al., 2009; Jin et al., 2014)。系统发育分析表明, 这些 *CAD* 基因可分为3–7个亚家族(Ma, 2010; Bukh et al., 2012)。亚家族I中的 *CAD* 成员被认为与植物木质素生物合成相关。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, *AtCAD4* 和 *AtCAD5* 是参与木质素单体生物合成过程的主要 *CAD* (Sibout et al., 2003)。在水稻 *CAD* 家族中, *OsCAD2* 是唯一属于亚家族I的 *CAD*, 参与木质素生物合成(Barakat et al., 2009)。然而, 蒙古冰草的 *CAD* 基因家族及其功能鉴定至今尚未见报道。

随着全球气温升高, 干旱正在成为植物生长发育的主要威胁之一(Rollins et al., 2013)。干旱胁迫通过扰乱水分平衡和降低水分利用效率在植物细胞中引起复杂的生理生化反应。蒙古冰草具有耐旱、耐低温、耐盐碱、抗小麦锈病及其它病原菌等优良特性, 因此挖掘蒙古冰草抗逆基因对于牧草分子育种具有重要意义。赵彦等(2015)在蒙古冰草中鉴定到 *MwDREB3* 基因, 发现其对低温、干旱、高盐和 ABA 诱导具有一定的响应。轻度盐胁迫对蒙古冰草幼苗生长有一定的促进作用, 可通过提高酶活性维持活性氧产生与清除之间的平衡, 使膜通透性降低。而中度和重度盐胁迫对幼苗生长具有明显的抑制作用(王荣华等, 2003, 2004)。对蒙古冰草 *NAC* 家族基因的深入分析也表明, *AmNAC100* 和 *AmNAC102-2* 可能参与干旱胁迫响应, 具有调控植物生长发育及响应非生物逆境等多种功能(范菠菠等, 2021)。近年来, 多种植物中的研究表明, *CAD* 基因对植物抗逆性具有重要作用。干旱胁迫诱导甜瓜3个 *CAD* 基因(即 *CmCAD1*、*CmCAD2* 和 *CmCAD3*)的表达, 以促进木质素的生物合成(Xu et al., 2011)。对毛竹(*Phyllostachys edulis*) *PheCAD* 的研究发现, 经非生物胁迫处理后, *PheCAD2* 被显著诱导表达(Vasupalli et al., 2021)。上述结果表明, *CAD* 基因既参与木质化, 也响应非生物胁迫(Liu et al., 2020)。因此, 深入挖掘蒙古冰草 *CAD* 基因可为禾本科作物育种提供新的且有应用前景的基因资源。

本研究通过对蒙古冰草全长转录组序列进行深入挖掘, 筛选到12个 *CAD* 候选基因。系统进化分析和结构预测表明, *AmCAD* 基因可分为4个亚家族, 具有典型的2个  $Zn^{2+}$  和 NADPH 结构域, 并鉴定到 *AmCAD* 为参与木质素合成的候选基因。该基因在茎秆等木质化程度较高的组织部位高表达; 体外酶活分析也表明, *AmCAD* 重组蛋白对松柏醛、芥子醛及对香豆醛均具有很强的催化能力。此外, qRT-PCR 分析表明, *AmCAD* 的表达在干旱胁迫下受到显著诱导。综上所述, 本研究在对蒙古冰草 *CAD* 基因家族进行生物信息学分析的基础上, 鉴定到参与木质素合成并响应干旱胁迫的关键基因 *AmCAD*。以该基因为靶点在蒙古冰草中进行深入研究, 对于提高牧草品质及增强牧草逆境胁迫耐受性具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 蒙古冰草 *CAD* 基因的筛选和分析

从拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.) 信息资源中心(<http://www.arabidopsis.org/>)下载9个拟南芥 *CAD* 基因序列(*AT1G72680*、*AT2G21730*、*AT2G21890*、*AT3G19450*、*AT4G34230*、*AT4G37970*、*AT4G37980*、*AT4G37990* 和 *AT4G39330*), 在蒙古冰草(*Agropyron mongolicum* Keng) 全长转录组测序组装的267 560条 unigene 基因数据库中进行 BLAST 搜索。利用 Pfam (<http://pfam-legacy.xfam.org/>) 和 TBtools (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools/releases>) 对获得的 *CAD* 基因候选序列进行结构预测, 剔除不含 *CAD* 蛋白 ADH\_N 和 ADH\_zinc\_N 结构域的候选序列(Qi et al., 2021), 最终获得具有完整 *CAD* 保守结构域的序列。

### 1.2 蒙古冰草 *CAD* 蛋白的理化性质及保守基序分析

利用 TBtools 分析 *AmCAD* 氨基酸分子量、等电点、不稳定系数、亲水指数以及脂溶指数。利用 WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 预测 *AmCAD* 蛋白的亚细胞定位。蛋白保守结构域由 MEME (<https://meme-suite.org/meme/index.html>) 预测, 最大基序数为9。

### 1.3 蒙古冰草 *CAD* 基因家族的系统发育分析

利用 MEGA7 (<http://www.megasoftware.net>) 软件通

过邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树,将鉴定到的AmCAD氨基酸序列与拟南芥、水稻(BAF-26197.2、NP\_001396297.1、NP\_001390948.1、Q2-R114.2、Q0J6T3.2、NP\_001406081.1、NP\_001406091.1、NP\_001406096.1、NP\_001406092.1、NP\_001406093.1、Q6ERW7.2和NP\_001406094.1)和二穗短柄草(*Brachypodium distachyon* L.) (XP\_003581549.1、XP\_003580533.1、AFK80371.1、XP\_003578087.1、XP\_003570974.1、XP\_003573548.1和XP\_024317695.1) 3个物种中已报道的CAD序列进行比对分析,具体参数设置采用系统默认值。

#### 1.4 蒙古冰草CAD蛋白三维结构模型预测

使用SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)对蒙古冰草转录组序列中预测到的CAD蛋白分别进行三级结构预测。蛋白结构以及口袋氨基酸在pymol (<https://pymol.org/2/>)中进行展示。

#### 1.5 AmCAD序列扩增和载体构建

根据AmCAD的cDNA序列设计引物AmCAD-pET-32a-F: 5'-ATGGGCAGCGTCGACGCCTCC-3'; AmCAD-pET32a-R: 5'-TCAGGCGGCGTTCTCGATGTTG-3'。以蒙古冰草cDNA为模板扩增获得PCR产物。用EcoRI (NEB)酶切pET-32a质粒,将PCR扩增片段的胶回收产物在infusion连接酶(诺唯赞生物科技股份有限公司,南京)作用下连接到酶切后的pET-32a载体上,冰浴后热激转入DH5 $\alpha$ 感受态细胞,通过菌液PCR筛选阳性克隆(检测引物序列为F: 5'-CGAACGCCAGCACATGGACAGC-3'; R: 5'-GACCCGTTT-AGAGGCCCAAGG-3')并对阳性克隆进行测序验证,测序引物同PCR检测引物。

#### 1.6 AmCAD重组蛋白的高效表达和纯化

用热激法将包含pET-32a\_AmCAD的质粒转入BL21感受态细胞,通过菌液PCR筛选阳性克隆。将阳性菌株接种到添加羧苄的LB液体培养基中,37°C预培养过夜,按1:100的比例转接到50 mL LB液体培养基中,培养至OD<sub>600</sub>=0.6时开始诱导蛋白表达,经IPTG过夜诱导后收集菌体,超声破碎后,采用层析法在Ni<sup>2+</sup>柱中纯化上清液中的AmCAD重组蛋白,收集上清液粗蛋白、滤出液和纯化蛋白等。参照Ma和Tian (2005)的方法进行SDS-PAGE检测。

#### 1.7 AmCAD重组蛋白的酶学性质

以对香豆醛、松柏醛和芥子醛为底物,用高效液相色谱法(HPLC)检测AmCAD重组蛋白的催化活性。酶活反应体系为: 20  $\mu$ L Tris-HCL, 238  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ L NADPH (2 mmol·L<sup>-1</sup>), 20  $\mu$ L纯化的重组AmCAD蛋白, 12  $\mu$ L底物(2 mmol·L<sup>-1</sup>)。30°C水浴反应30分钟,加入甲醇溶液终止反应,过滤后进行液相检测。同时,以高温灭活的重组蛋白替代活性蛋白,为每种底物增加1个空白对照。

为比较AmCAD重组蛋白对不同底物的最适催化条件,在反应温度为25°C、30°C、37°C、45°C和55°C下进行酶活检测以确定最适反应温度,继而在最适反应温度下调节缓冲液pH至3、4.5、6.5、7.5和9,分别进行酶活检测以确定最适反应pH。

通过双倒数作图法(Lineweaver-Burk plot)对AmCAD重组蛋白的动力学常数进行测定。以初始速率( $V_0$ )和底物浓度( $S$ )为坐标,根据米氏方程 $V_0 = V_{\max} S / (K_m + S)$ 进行非线性拟合得出米氏常数( $K_m$ )和最大反应速率( $V_{\max}$ ),并计算AmCAD重组蛋白的催化常数 $K_{\text{cat}}$ 。以上所有实验均设3次重复。

#### 1.8 AmCAD基因在不同组织中的表达量

样品取自内蒙古农业大学2018年种植的蒙古冰草蒙农一号,分别取根、茎、叶、叶鞘和幼穗磨样,用TransZol法(全式金生物公司, Cat No.ET101-01)提取嫩叶总RNA,然后反转录为cDNA (全式金生物公司试剂盒, Cat No.AE311)。通过qRT-PCR法检测AmCAD的表达量(引物序列为AmCAD\_qF: 5'-CTCG-TGCTGATGGGCGTGAT-3'; AmCAD\_qR: 5'-CCGA-TGAAGCTGCCCCGTGAT-3')。参照黄文华(2014)的报道,以蒙古冰草18SrRNA作为内参基因(18SrRNA-F: 5'-CAATGGGAAGCAAGGCTGTAA-3'; 18SrRNA-R: 5'-AACAATCCGAAGTGAAGCAATC-3')。反应程序为: 95°C30秒, 95°C5秒, 60°C30秒, 共35个循环。采用2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法计算各基因的相对表达量(Livak and Schmittgen, 2001)。

#### 1.9 AmCAD基因在干旱胁迫下的表达量

在滤纸上萌发蒙古冰草种子,2周后取长势一致的蒙古冰草置于1/4Hoglands营养液中预培养3天。然后在溶液中添加甘露醇,使终浓度分别达75、150和250 mmol·L<sup>-1</sup>,以1/4Hoglands营养液水培作为对照,

模拟干旱处理。分别在处理后第0、2、6和12小时进行根茎叶混合取样,样品用液氮速冻后研磨,使用Trizol法提取RNA,然后反转录为cDNA,采用qRT-PCR分析*AmCAD*基因在不同处理时间及不同甘露醇浓度下的表达量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *AmCAD*基因家族成员的鉴定

利用拟南芥*CAD*基因序列在蒙古冰草全长转录组本地数据库中进行比对,共筛选到69条序列,其中12条序列具有完整的保守结构域,可作为候选*AmCAD*序列用于进一步分析。*AmCAD*基因编码蛋白质的氨基酸数目介于269–421之间,其中,PB.47633.2相对分子质量最大(44.35 kDa),PB.62308.1相对分子质量最小(28.62 kDa)。蒙古冰草*CAD*蛋白具有相似的等电点( $pI=5.40\text{--}6.66$ )、不稳定系数(23.05–31.84)和脂溶指数(83.80–93.88)(表1)。同时,除PB.82665.1外,*AmCAD*蛋白亲水指数均大于0,为疏水性蛋白。亚细胞定位预测结果表明,不同*AmCAD*蛋白的定位不同,PB.80567.1定位于过氧化物酶体,PB.47633.2、PB.55683.1和PB.84043.1定位于叶绿体,其余8个*AmCAD*蛋白定位于细胞质。

### 2.2 *AmCAD*蛋白结构域分析

为明确不同*AmCAD*蛋白基序是否具有相似性,利用

MEME软件预测蛋白结构域,使用TBtools绘图。结果表明,*AmCAD*蛋白结构较为保守,共鉴定到9个保守基序(分别命名为Motif1–9),分别用不同的颜色表示(图1)。PB.47633.2和PB.55683.1的motif数量最多,包含全部预测到的9个motif。而PB.62308.1的motif最少,仅包含Motif1、Motif3、Motif4、Motif6和Motif7这5个保守基序。*AmCAD*蛋白结构域核心基序的保守性和蛋白结构的多样性预示着蒙古冰草*CAD*基因功能的多样性。

### 2.3 *AmCAD*蛋白家族系统进化分析

为确定*AmCAD*与其它高等植物*CAD*的进化关系,利用3个物种的28个*CAD*氨基酸序列(二穗短柄草7个,拟南芥9个,水稻12个)与鉴定到的12个蒙古冰草*CAD*氨基酸序列构建系统进化树。结果表明,12个*AmCAD*可划分为4个亚家族,命名为Group I–IV。其中,*AmCAD*主要聚类在Group IV中(8个),而Group I、Group II和Group III中分别包含1、2和1个*AmCAD*(图2)。

对不同物种的研究表明,聚类于Group I的*CAD*可能主要参与木质素合成。例如,拟南芥*AtCAD4*和*AtCAD5*是参与木质素合成的关键酶(Yusuf et al., 2022)。对水稻和二穗短柄草的研究表明,*AtCAD4*和*AtCAD5*的同源蛋白*OsCAD2*和*BdCAD5*在木质素单体合成中发挥关键作用(Bukh et al., 2012)。因此,聚类于该亚家族的PB.70108.1被命名为*AmCAD*(图2,红色五角星)。

表1 蒙古冰草*AmCAD*蛋白理化性质分析

Table 1 Analysis of physicochemical properties of *AmCAD* proteins from *Agropyron mongolicum*

Sequence ID	Number of amino acid	Molecular weight (Da)	Theoretical pI	Instability index	Aliphatic index	Grand average of hydropathicity
PB.70108.1	360	38591.48	5.87	23.05	90.33	0.025
PB.82665.1	354	38437.86	6.66	24.94	84.75	−0.098
PB.80567.1	358	38685.52	6.60	30.79	89.27	0.012
PB.80906.1	355	38256.89	5.68	31.84	88.42	0.037
PB.62308.1	269	28625.35	6.31	31.41	92.45	0.166
PB.17482.1	344	36802.76	5.86	31.22	86.13	0.103
PB.52032.1	373	38747.35	6.53	24.05	91.58	0.136
PB.47633.2	421	44353.00	6.42	31.04	84.28	0.092
PB.55683.1	421	44338.97	6.42	29.60	83.80	0.088
PB.83678.1	356	37359.82	5.40	25.49	92.25	0.146
PB.84043.1	356	37036.55	5.84	26.83	93.88	0.211
PB.84184.1	356	37019.73	6.08	23.61	92.25	0.195

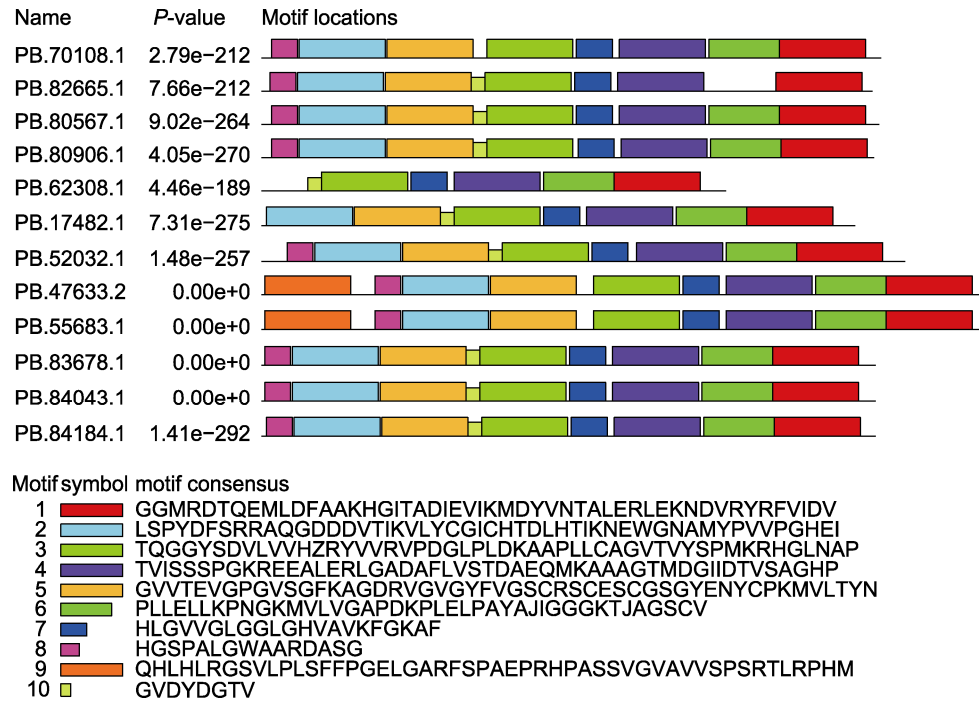


图1 蒙古冰草AmCAD蛋白的基序分析

Figure 1 Motif analysis of AmCAD protein in *Agropyron mongolicum*

2.4 AmCAD序列扩增及蛋白结构分析

我们首先从蒙古冰草cDNA中成功扩增了AmCAD编码序列(图3A)。为进一步确定AmCAD与木质素单体合成的相关性,将AmCAD与其它植物中参与木质素单体合成的CAD进行氨基酸序列比对分析(图3B)。结果表明,所有具催化活性的CAD蛋白均含有2个与Zn<sup>2+</sup>催化相关的结构域: Zn1结合基序GHE(X)<sub>2</sub>G(X)<sub>5</sub>G(X)<sub>2</sub>V和Zn2结合基序GD(X)<sub>10</sub>C(X)<sub>2</sub>C(X)<sub>2</sub>C(X)<sub>7</sub>C(McKie et al., 1993)以及1个与NADPH结合相关的富含甘氨酸的保守结构域GLGGLGGV(L)G (Saballos et al., 2009)。基于拟南芥AtCAD5 (PDB:2cf5)晶体结构,我们对AmCAD进行三维结构建模分析(图3C)。结果表明, AmCAD为同源二聚体结构,包括催化结构域和核酸结构域。构成AmCAD底物结合口袋的包括10个氨基酸残基,分别为TRP120、VAL96、ALA61、GLN54、CYS164、LEU59、THR50、ILE301、PHE300和VAL277。共同的结构基础表明, AmCAD可能是具有肉桂醛类底物催化能力的功能蛋白。

2.5 AmCAD重组蛋白的酶学性质分析

将含有pET-32a\_AmCAD质粒的BL21菌株经IPTG过

夜诱导,采用层析法在Ni<sup>2+</sup>柱中纯化蛋白。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果表明, AmCAD重组蛋白的分子量约为55.6 kDa (图4A)。

AmCAD重组蛋白在不同温度和pH下的酶活比较分析表明,该蛋白催化不同底物的最佳反应体系均为pH7.5和温度30°C (图4B, C)。在25–45°C下, AmCAD对对香豆醛的还原活性最高,在pH3.5–7.5的缓冲液中, AmCAD对对香豆醛和松柏醛的还原活性相当且均大于芥子醛。上述结果表明, AmCAD重组蛋白具有较高的温度稳定性和较强的pH敏感性。

为探明AmCAD重组蛋白对不同底物的偏好性,进而通过分子设计手段获得具有不同木质素结构的蒙古冰草新种质。本研究在最适反应条件下(30°C, pH7.5)测定了AmCAD重组蛋白对对香豆醛、芥子醛和松柏醛等底物的酶动力学参数(表2)。结果表明,以松柏醛为底物时, AmCAD的K<sub>m</sub>为8.94 μmol·L<sup>-1</sup>, V<sub>max</sub>为6.78 μmol·L<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>, K<sub>cat</sub>为441.37·s<sup>-1</sup>, K<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>为49.35 μmol·L<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>。以芥子醛为底物时, AmCAD的K<sub>m</sub>为10.35 μmol·L<sup>-1</sup>, V<sub>max</sub>为7.18 μmol·L<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>, K<sub>cat</sub>为461.51·s<sup>-1</sup>, K<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>为45.26 μmol·L<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>。以对香豆醛为底物时, AmCAD的K<sub>m</sub>为35.35 μmol·L<sup>-1</sup>, V<sub>max</sub>为

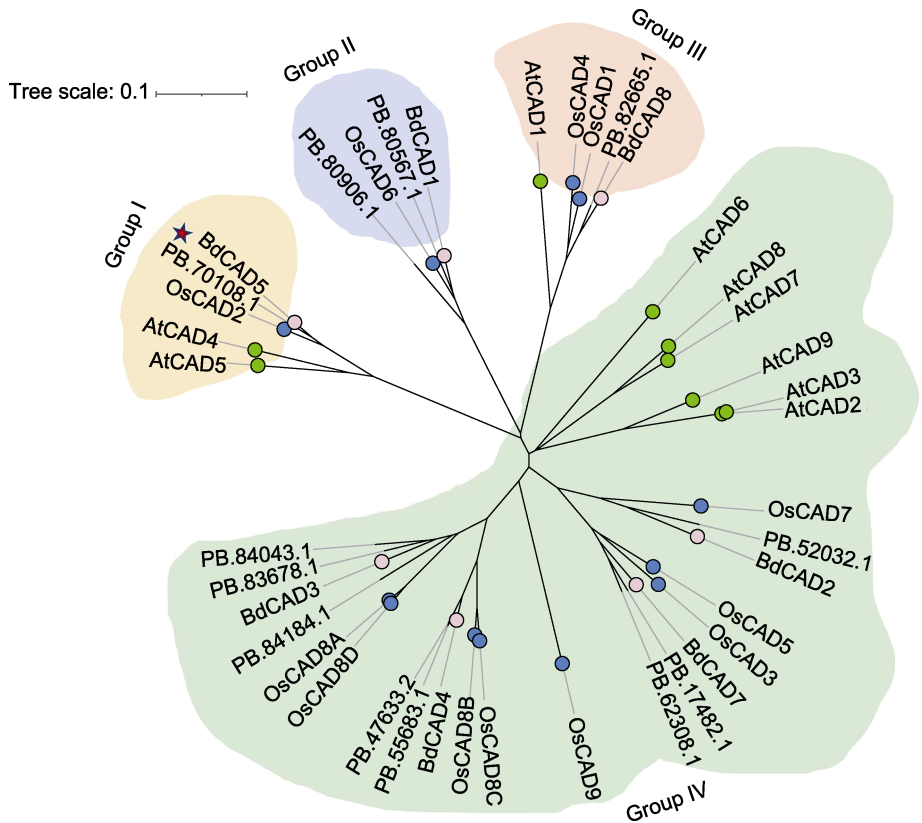


图2 蒙古冰草与拟南芥、水稻和二穗短柄草CAD的系统进化树  
红色五角星代表可能参与木质素合成的蒙古冰草CAD蛋白；粉色点代表二穗短柄草CAD蛋白；绿色点代表拟南芥CAD蛋白；蓝色点代表水稻CAD蛋白。

Figure 2 Phylogenetic tree of CADs in *Agropyron mongolicum*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, and *Brachypodium distachyon*  
The red pentagram represents the functional CAD protein of *A. mongolicum* that may be involved in lignin synthesis; the pink dots represent the CAD protein of *B. distachyon*; the green dots represent the CAD protein of *A. thaliana*; and the blue dots represent the CAD protein of *O. sativa*.

表2 AmCAD重组蛋白催化不同底物的酶动力学特性

Table 2 Enzyme kinetic characteristics of different substrates catalyzed by recombinant AmCAD

Substrat	$K_m$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{cat}}$ ( $\cdot\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{cat}}/K_m$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )
Coniferylaldehyde	$8.94\pm0.15$	$6.87\pm0.008$	$441.37\pm0.53$	$49.35\pm0.90$
Sinapaldehyde	$10.35\pm2.14$	$7.18\pm0.43$	$461.51\pm27.94$	$45.26\pm6.69$
p-coumaraldehyde	$35.35\pm3.74$	$15.21\pm1.60$	$977.60\pm102.97$	$27.65\pm0.01$

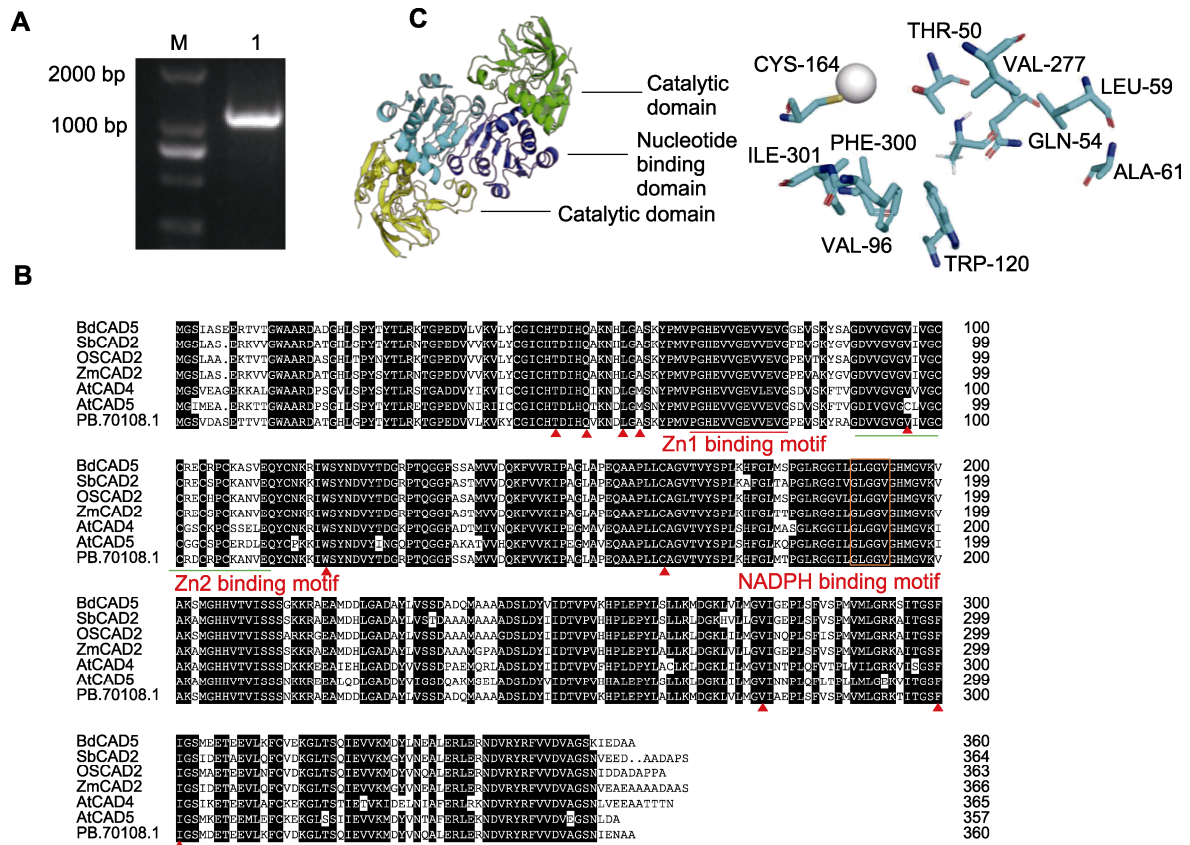
$K_m$ : 米氏常数;  $V_{\text{max}}$ : 最大反应速率;  $K_{\text{cat}}$ : 催化常数  
 $K_m$ : Michaelis constant;  $V_{\text{max}}$ : Maximum reaction rate;  $K_{\text{cat}}$ : Catalytic constant

$15.21\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $K_{\text{cat}}$  为  $977.60\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $K_{\text{cat}}/K_m$  为  $27.65\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 。可以看出, AmCAD对松柏醛的亲合力最强, 芥子醛次之, 对香豆醛最弱。  $K_{\text{cat}}/K_m$  值分析结果显示, AmCAD还原松柏醛的效率是还原对香豆醛的2倍。上述结果表明, AmCAD重组蛋白对不同肉桂醛类底物具有较强的选择性。

## 2.6 AmCAD在不同组织中的表达量分析

为进一步探明AmCAD基因的组织表达特性, 在蒙古冰草抽穗期分别对根、茎、叶、叶鞘和幼穗取样, 并分析不同组织中AmCAD的表达量。结果表明, AmCAD基因表达存在组织特异性, 在茎中的表达量最





**图3** 蒙古冰草*AmCAD*基因扩增和蛋白结构分析  
(A) *AmCAD*电泳图(M: DNA ladder; 1: 扩增序列); (B) 蒙古冰草与其它物种CAD氨基酸序列比对(构成底物结合口袋的残基用三角(▲)标记); (C) *AmCAD*蛋白质三维结构模型和底物结合口袋(底部亚基的核苷酸结合和催化结构域分别呈黄色和蓝色, 在上部亚基中的对应结构分别以绿色和深蓝色显示, 锌离子用灰色球体表示)

**Figure 3** Amplification of *Agropyron mongolicum AmCAD* and protein structure analysis  
(A) *AmCAD* gel map (M: DNA ladder; 1: Amplification sequence); (B) Comparison of CAD amino acid sequences among *A. mongolicum* and other species (the residue forming the substrate binding pocket is marked with a triangle (▲)); (C) Three-dimensional protein structure model and substrate binding pocket of *AmCAD* (the nucleotide binding and catalytic domains of the bottom subunit are colored yellow and blue, respectively, the corresponding compounds in the upper subunit are colored green and dark blue, while the zinc ions are indicated by gray spheres)

高, 其次是幼穗和叶鞘, 在根和叶中的表达量极低(图5A)。

为进一步分析该基因在茎节中的表达模式, 选择抽穗期蒙古冰草的茎节, 按照从幼穗到根的取样顺序分为4个部位, 分别命名为茎节1 (I1)、茎节2 (I2)、茎节3 (I3)和茎节4 (I4)。结果表明, 蒙古冰草*AmCAD*基因在I3中表达量最高, 在I1中表达量最低, 且在I3中表达量约为I1的4倍(图5B)。*AmCAD*在蒙古冰草茎中的特异表达以及在不同茎节中表达量的差异性, 表明该基因在蒙古冰草木质素合成和生长发育中可能发挥重要作用。

## 2.7 *AmCAD*在模拟干旱胁迫下的表达分析

为探究*AmCAD*基因在干旱胁迫下的表达模式, 用不同浓度甘露醇模拟干旱胁迫, 分别在处理后第0、2、6和12小时取样进行qRT-PCR分析。结果表明, 干旱胁迫显著诱导蒙古冰草*AmCAD*的表达(图6)。在75、150和250 mmol·L<sup>-1</sup>甘露醇处理下, *AmCAD*的表达量最高被诱导约2.5、2.7和2倍。此外, *AmCAD*表达量在不同浓度甘露醇处理下均呈现先升高后降低的趋势, 并在处理12小时后基本恢复正常表达水平。*AmCAD*在不同浓度甘露醇处理下都能被快速诱导表达, 说明*AmCAD*可能在蒙古冰草对干旱胁迫抗性中

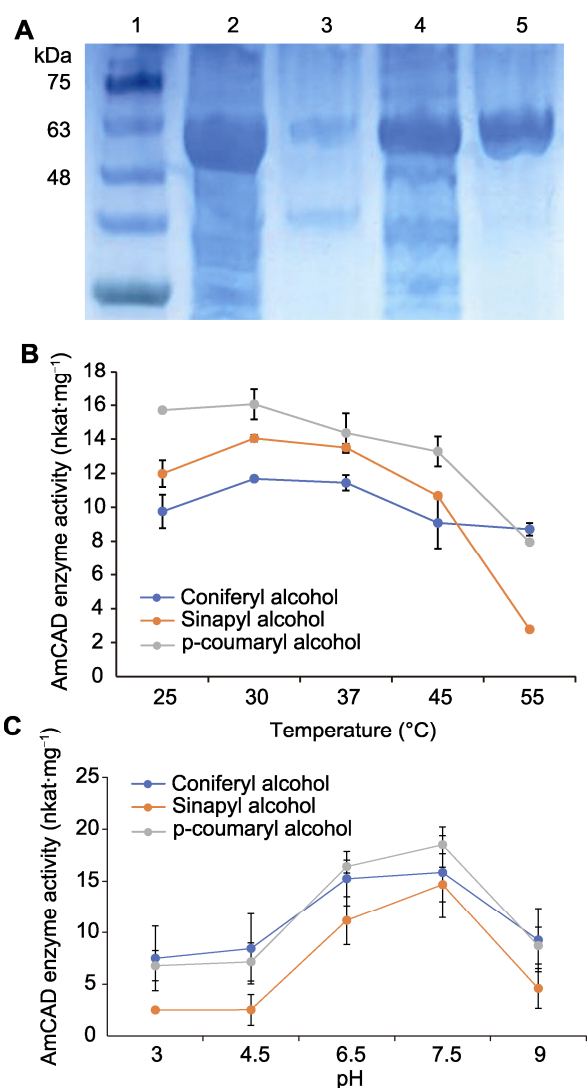


图4 AmCAD重组蛋白在大肠杆菌中的异源表达(A)及不同温度(B)和pH(C)下的酶学性质

1: 蛋白Marker; 2: 上清液; 3: 沉淀; 4: 流出液; 5: 纯化蛋白

Figure 4 Heterologous expression (A) and enzymatic properties of AmCAD recombinant protein in *Escherichia coli* at different temperatures (B) and pH (C)

1: Marker; 2: Supernatant; 3: Precipitant; 4: Effluent; 5: Purified protein

发挥功能,可作为作物抗逆性改良的潜在靶基因,因此具有一定的应用价值。

## 2.8 讨论

肉桂醇脱氢酶是参与植物次生代谢产物尤其是木质素生物合成过程的关键酶,在植物生长发育和对生物/非生物胁迫的耐受性方面发挥重要作用(Lange et al.,

1995)。前人系统分析了拟南芥(Sibout et al., 2003)、杨树(*Populus*) (Barakat et al., 2009)、水稻(Tobias and Chow, 2005)和二穗短柄草(Bukh et al., 2012)等物种中的CAD基因家族,分别鉴定到9、15、12和7个CAD基因。本研究以蒙古冰草全长转录组为基础,共筛选到12个CAD序列,在数量上与上述已鉴定的物种相近。所有鉴定到的AmCAD在蛋白结构和分子特征上表现出一定的保守性,除PB.623.08.1外,其它CAD序列均包含至少7个保守基序。预测结果表明,鉴定到的所有AmCAD等电点均在5.40–6.66之间。亚细胞定位预测结果表明,蒙古冰草CAD多定位于细胞质,仅在PB.47633.2、PB.55683.1、PB.84043.1以及PB.80567.1中发现叶绿体和过氧化物酶体定位信号肽,这在前人的研究中也有报道(Bukh et al., 2012; Jin et al., 2014; Shafiei et al., 2023)。在植物中, CAD具有调控生长发育和影响抗病性等多种生理功能(Rong et al., 2016)。以拟南芥为例, AtCAD1、AtCAD-4和AtCAD5参与木质素合成(Sibout et al., 2003),而AtCAD7和AtCAD8与植物抗性有关(Kim et al., 2004; Barakat et al., 2009)。AtCAD2和AtCAD3也显示出对羟基肉桂醛的活性,但是对木质素沉积几乎无影响,主要参与生物/非生物胁迫反应(Eudes et al., 2006)。AmCAD重组蛋白表现出较强的pH敏感性和较高的温度稳定性。在以松柏醛为底物时, 25–55°C之间AmCAD蛋白均能维持较高的活力。AmCAD催化不同底物的最适pH均约为7,环境pH偏酸或偏碱都会导致重组蛋白的催化活力迅速降低。已报道不同物种中参与木质素合成的CAD均表现出相似的pH敏感性(Bukh et al., 2012)。由此可见,植物细胞质中pH值的稳定性对于木质素单体的高效合成具有重要作用。结构的保守性和定位的多样性均表明,蒙古冰草中AmCAD蛋白可能在体外具有相似的底物催化能力,但在胞内则发挥不同的功能,从而影响蒙古冰草的生长、抗逆以及品质等多个方面。

尽管CAD基因家族成员众多,但参与木质素合成的关键基因仅占其中的一小部分。对蒙古冰草AmCAD进行系统进化分析,结果表明这些蛋白可分为4个亚家族,其中AmCAD与其它参与木质素合成的CAD一起聚类于Group I中。结构分析表明, AmCAD能够形成同型二聚体,与拟南芥AtCAD5 (Youn et al., 2006)和二穗短柄草BdCAD5 (Tobias and Chow,



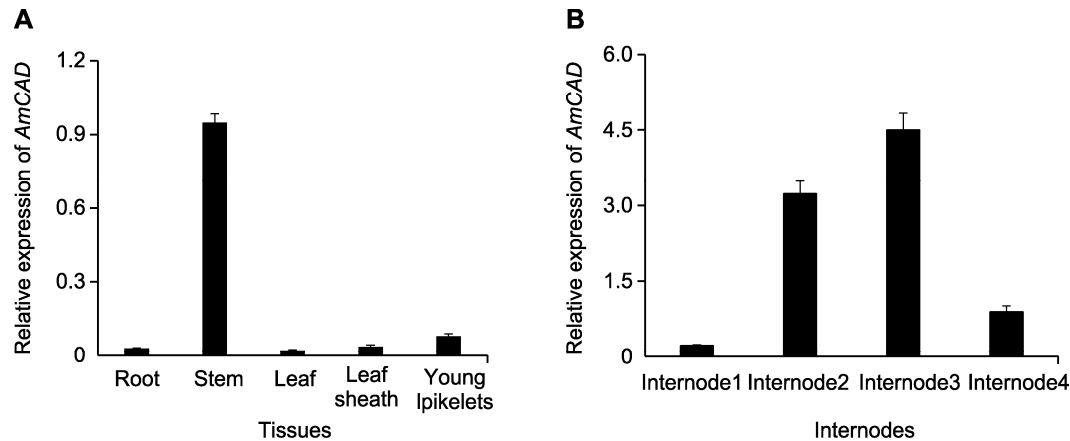


图5 *AmCAD*在蒙古冰草不同组织(A)和茎节部位(B)的表达量

Figure 5 Expression levels of *AmCAD* in different tissues (A) and internodes (B) of *Agropyron mongolicum*

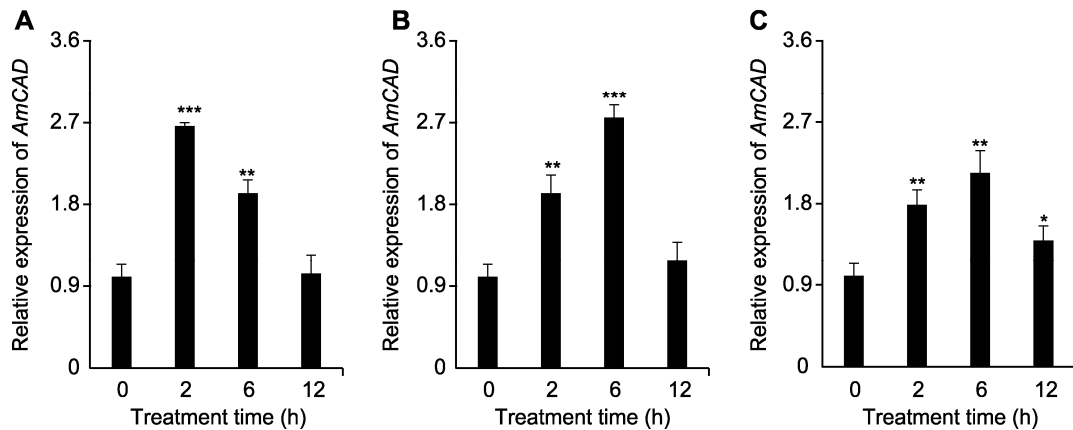


图6 *AmCAD*基因在不同处理时间及不同浓度甘露醇模拟干旱胁迫下的表达分析 (A) 75 mmol·L<sup>-1</sup>甘露醇处理; (B) 150 mmol·L<sup>-1</sup>甘露醇处理; (C) 250 mmol·L<sup>-1</sup>甘露醇处理。\*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ ; \*\*\*  $P<0.001$

Figure 6 Expression analysis of *AmCAD* gene under drought stress at different time points and mannitol concentrations (A) 75 mmol·L<sup>-1</sup> mannitol treatment; (B) 150 mmol·L<sup>-1</sup> mannitol treatment; (C) 250 mmol·L<sup>-1</sup> mannitol treatment. \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ ; \*\*\*  $P<0.001$

2005)一致。生物信息学分析结果也表明, *AmCAD*可能作为*AtCAD5*的同源蛋白参与木质素合成过程。对*AmCAD*重组蛋白底物催化活性的分析进一步证实了这一结论。与其它物种中的CAD蛋白相比, *AmCAD*具有更强的底物催化活性。在小麦中, *TaCAD1*对松柏醛、芥子醛和对香豆醛的 $K_m$ 值分别为21.94、40.63和27.16  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Ma, 2010)。在青蒿(*Artemisia apiacea*)中, *AaCAD*对芥子醛和松柏醛的 $K_m$ 值分别为15.61和10.83  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Li et al., 2012)。在银合欢(*Leucaena leucocephala*)中, *LICAD*对芥子醛的 $K_m$ 值为23.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 对松柏醛的 $K_m$ 为18.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

(Pandey et al., 2011)。研究表明, 参与木质素合成的CAD基因主要在茎秆中表达。小麦*TaCAD1*呈现出独特的器官特异性表达模式, 在茎中表达量高, 在叶中表达量非常低, 在根中检测不到表达量(Ma, 2010)。Tsuruta等(2007)在高粱茎中也发现了CAD基因的高表达, 该基因参与次生细胞壁中木质素含量和组分调控。对蒙古冰草不同组织中*AmCAD*表达量的分析显示该基因在茎秆中特异性表达。结合生物信息学、体外酶活以及组织特异性表达分析结果, 表明*AmCAD*是蒙古冰草中参与木质素合成的重要基因。

研究表明, CAD蛋白的底物偏好性与木质素的结

构组成相关(Bukh et al., 2012)。木质素主要包括对羟基苯基木质素(H型木质素)、愈创木基木质素(G型木质素)和紫丁香基木质素(S型木质素)等结构单元, 单子叶植物的木质素主要由G型和S型木质素构成(Zeng et al., 2013)。酶活测定和酶动力学分析结果表明, AmCAD重组蛋白对松柏醛、芥子醛和对香豆醛等不同肉桂醛底物均具有很强的催化能力, 同时也表现出对松柏醛和芥子醛的偏好性。在最适反应条件下, 该蛋白对松柏醛和芥子醛亲和力较强,  $K_m$ 值分别为8.94和10.35  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。AmCAD蛋白对3种底物的催化能力和亲和力强弱与木质素中H型、G型和S型含量相对应, 表明AmCAD的底物偏好性可能影响蒙古冰草木质素结构和各类型单体的组成。

通过对CAD基因进行调控, 研究人员能够定向改变木质素含量或木质素单体比例, 进而提高能源作物的酶解糖化效率或牧草作物的消化率。玉米(*Zea mays*)和高粱的棕色中脉突变体表现出叶中脉和茎的红棕色色素沉积, 这种表型通常与木质素含量降低和组成改变及青贮饲料消化率提高有关(Cherney et al., 1991; Vermerris et al., 2002)。玉米**bm1**突变体中CAD基因的碱基突变影响CAD蛋白的催化活性, 降低了该突变体细胞壁中的木质素含量以及G型和S型单体含量(Halpin et al., 1998)。高粱**bmr6**突变体中CAD基因的突变也导致木质素含量和组成发生改变, 突变体植株的生物质具有更高的糖化效率(Sattler et al., 2009)。在柳枝稷(*Panicum virgatum*)中, 研究人员利用RNAi技术抑制PvCAD基因的表达, 获得了木质素含量降低的基因工程植株, 显著提高了柳枝稷的酶解糖化效率和牧草消化率(Fu et al., 2011)。我国缺乏高品质牧草品种, AmCAD基因的筛选和鉴定为蒙古冰草品质改良和种质创新提供了重要的基因资源。

此外, CAD基因也在植物的抗逆性和抗病性等过程中发挥关键作用(Park et al., 2018; Lee et al., 2021)。已有研究表明, 在生物和非生物胁迫下甘薯(*Dioscorea esculenta*)和银杏(*Ginkgo biloba*) CAD1基因被强烈诱导表达(Saballos et al., 2009; Xu et al., 2011; Pan et al., 2014)。在棉花中也发现, 几种GhCAD在大丽弧菌感染时被诱导表达(Xiao et al., 2021)。对毛竹(*Phyllostachys edulis*) PheCAD基因响应非生物胁迫的研究发现, 经过干旱、ABA和盐等不同非生物胁迫处理后, PheCAD2均被显著诱导表

达(Vasupalli et al., 2021)。在蒙古冰草中, AmCAD基因的表达量受干旱胁迫强烈诱导, 表明该基因既参与木质素合成, 也可能参与对非生物胁迫的防御(Li et al., 2001)。

本研究从蒙古冰草中筛选和鉴定了参与木质素合成的关键基因AmCAD, 其编码蛋白具有很强的催化肉桂醛类底物反应的能力, 参与木质素合成的同时也显著响应干旱胁迫。因此, 该基因可能参与木质素等重要苯丙素类化合物的合成, 同时与蒙古冰草的耐旱性相关。该基因作为蒙古冰草分子改良的候选基因, 对于提高蒙古冰草牧草品质和抗逆性具有重要意义。然而, 目前蒙古冰草遗传转化体系的欠缺严重限制了这一重要本土牧草的分子育种工作。本文作者研究团队正致力于突破蒙古冰草的遗传转化瓶颈, 在包括AmCAD的基因功能鉴定的基础上, 通过基因编辑等技术手段, 继续推进蒙古冰草的分子育种工作。

## 作者贡献声明

王贺萍: 撰写论文; 孙震、刘雨辰和苏彦龙: 分析数据并提供技术支持; 杜锦瑜: 提供实验协助; 赵彦、赵竑博、王召明、苑峰、刘亚玲和吴振映: 提供实验思路; 何峰和付春祥: 设计实验并修改文章。

## 参考文献

- Barakat A, Bagniewska-Zadworna A, Choi A, Plakkat U, DiLoreto DS, Yellanki P, Carlson JE (2009). The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family in *Populus*: phylogeny, organization, and expression. *BMC Plant Biol* 9, 26.
- Bukh C, Nord-Larsen PH, Rasmussen SK (2012). Phylogeny and structure of the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family in *Brachypodium distachyon*. *J Exp Bot* 63, 6223–6236.
- Che YH, Li LH (2007). Genetic diversity of prolamines in *Agropyron mongolicum* Keng indigenous to northern China. *Genet Resour Crop Evol* 54, 1145–1151.
- Cherney JH, Cherney DJR, Akin DE, Axtell JD (1991). Potential of brown-midrib, low-lignin mutants for improving forage quality. *Adv Agron* 46, 157–198.
- Eudes A, Pollet B, Sibout R, Do CT, Séguin A, Lapierre C, Jouanin L (2006). Evidence for a role of AtCAD 1 in lignification of elongating stems of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 225, 23–39.

- Fan BB, Zhang XF, Yu Z, Zhao Y, Ma YH (2021). Bioinformatics and expression analysis of NAC transcription factors related to drought resistance of *Agropyron mongolicum* Keng. *Acta Agre Sin* **29**, 1183–1192. (in Chinese)
- 范菠菠, 张学峰, 于卓, 赵彦, 马艳红 (2021). 与蒙古冰草抗旱相关的NAC转录因子生物信息学及其表达分析. 草地学报 **29**, 1183–1192.
- Fu CX, Xiao XR, Xi YJ, Ge YX, Chen F, Bouton J, Dixon RA, Wang ZY (2011). Downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) leads to improved saccharification efficiency in switchgrass. *BioEnergy Res* **4**, 153–164.
- Halpin C, Holt K, Chojecki J, Oliver D, Chabbert B, Monties B, Edwards K, Barakate A, Foxon GA (1998). *Brown-midrib* maize (*bm1*)—a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. *Plant J* **14**, 545–553.
- Huang WH (2014). Selection of Control Gene in Quantitative PCR and Analysis of Differential Expression of *P5CS* Gene in *Agropyron mongolicum* Keng Under Drought Stress. Master's thesis. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University. pp. 11–17. (in Chinese)
- 黄文华 (2014). 蒙古冰草干旱胁迫下内参基因的筛选及 *P5CS* 基因定量表达分析. 硕士论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学. pp. 11–17.
- Ibrahim W, Zhu YM, Chen Y, Qiu CW, Zhu SJ, Wu FB (2019). Genotypic differences in leaf secondary metabolism, plant hormones and yield under alone and combined stress of drought and salinity in cotton genotypes. *Physiol Plant* **165**, 343–355.
- Janiak A, Kwaśniewski M, Szarejko I (2016). Gene expression regulation in roots under drought. *J Exp Bot* **67**, 1003–1014.
- Jin YZ, Zhang C, Liu W, Qi HY, Chen H, Cao SX (2014). The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family in melon (*Cucumis melo* L.): bioinformatic analysis and expression patterns. *PLoS One* **9**, e101730.
- Kim SJ, Kim MR, Bedgar DL, Moinuddin SGA, Cardenas CL, Davin LB, Kang C, Lewis NG (2004). Functional reclassification of the putative cinnamyl alcohol dehydrogenase multigene family in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 1455–1460.
- Lange BM, Lapierre C, Sandermann Jr H (1995). Elicitor-induced spruce stress lignin (structural similarity to early developmental lignins). *Plant Physiol* **108**, 1277–1287.
- Lee CJ, Kim SE, Park SU, Lim YH, Choi HY, Kim WG, Ji CY, Kim HS, Kwak SS (2021). Tuberous roots of transgenic sweetpotato overexpressing *IbCAD1* have enhanced low-temperature storage phenotypes. *Plant Physiol Biochem* **166**, 549–557.
- Li LG, Cheng XF, Leshkevich J, Umezawa T, Harding SA, Chiang VL (2001). The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell* **13**, 1567–1586.
- Li X, Ma DM, Chen JL, Pu GB, Ji YP, Lei CY, Du ZG, Liu BY, Ye HC, Wang H (2012). Biochemical characterization and identification of a cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Artemisia annua*. *Plant Sci* **193–194**, 85–95.
- Li Z, Wang HZ, Li RF, Wei JH (2009). Lignin biosynthesis and manipulation in plants and utilization of biomass energy. *Chin Bull Bot* **44**, 262–272. (in Chinese)
- 李桢, 王宏芝, 李瑞芬, 魏建华 (2009). 植物木质素合成调控与生物质能源利用. 植物学报 **44**, 262–272.
- Lin KJ, Liu ZP, Luo D, Wu ZN (2023). The current status, problems and suggestions for the research on forage germplasm resources. *Chin Bull Bot* **58**, 241–247. (in Chinese)
- 林克剑, 刘志鹏, 罗栋, 武自念 (2023). 饲草种质资源研究现状、存在问题与发展建议. 植物学报 **58**, 241–247.
- Liu W, Jiang Y, Wang CH, Zhao LL, Jin YZ, Xing QJ, Li M, Lv TH, Qi HY (2020). Lignin synthesized by *CmCAD2* and *CmCAD3* in oriental melon (*Cucumis melo* L.) seedlings contributes to drought tolerance. *Plant Mol Biol* **103**, 689–704.
- Livak KJ, Schmittgen TDL (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* **25**, 402–408.
- Ma QH (2010). Functional analysis of a cinnamyl alcohol dehydrogenase involved in lignin biosynthesis in wheat. *J Exp Bot* **61**, 2735–2744.
- Ma QH, Tian B (2005). Biochemical characterization of a cinnamoyl-CoA reductase from wheat. *Biol Chem* **386**, 553–560.
- McKie JH, Jaouhari R, Douglas KT, Goffner D, Feuillet C, Grima-Pettenati J, Boudet AM, Baltas M, Gorrichon L (1993). A molecular model for cinnamyl alcohol dehydrogenase, a plant aromatic alcohol dehydrogenase involved in lignification. *Biochim Biophys Acta* **1202**, 61–69.
- Pan HY, Zhou R, Louie GV, Mühlemann JK, Bomati EK, Bowman ME, Dudareva N, Dixon RA, Noel JP, Wang XQ (2014). Structural studies of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl-alcohol dehydrogenase, key enzymes of monolignol biosynthesis. *Plant Cell* **26**, 3709–3727.

- Pandey B, Pandey VP, Dwivedi UN (2011). Cloning, expression, functional validation and modeling of cinnamyl alcohol dehydrogenase isolated from xylem of *Leucaena leucocephala*. *Protein Express Purif* **79**, 197–203.
- Park HL, Kim TL, Bhoo SH, Lee TH, Lee SW, Cho MH (2018). Biochemical characterization of the rice cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family. *Molecules* **23**, 2659.
- Qi KJ, Song XF, Yuan YZ, Bao JP, Gong X, Huang XS, Khanizadeh S, Zhang SL, Tao ST (2021). CAD genes: genome-wide identification, evolution, and their contribution to lignin biosynthesis in pear (*Pyrus bretschneideri*). *Plants* **10**, 1444.
- Qiu R, He F, Li R, Wang YM, Xing SN, Cao YP, Liu YF, Zhou XY, Zhao Y, Fu CX (2023). Highly efficient gene editing of lignin gene *F5H* in switchgrass. *Chin Bull Bot* **58**, 298–307. (in Chinese)
- 邱锐, 何峰, 李瑞, 王亚梅, 邢思年, 曹英萍, 刘叶飞, 周昕越, 赵彦, 付春祥 (2023). 柳枝稷木质素基因 *F5H* 的高效编辑. *植物学报* **58**, 298–307.
- Rollins JA, Habte E, Templer SE, Colby T, Schmidt J, von Korff M (2013). Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot* **64**, 3201–3212.
- Rong W, Luo MY, Shan TL, Wei XN, Du LP, Xu HJ, Zhang ZY (2016). A wheat cinnamyl alcohol dehydrogenase TaCAD12 contributes to host resistance to the sharp eyespot disease. *Front Plant Sci* **7**, 1723.
- Saballos A, Ejeta G, Sanchez E, Kang C, Vermerris W (2009). A genomewide analysis of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] identifies *SbCAD2* as the *Brown midrib6* gene. *Genetics* **181**, 783–795.
- Sattler SE, Saathoff AJ, Haas EJ, Palmer NA, Funnell-Harris DL, Sarath G, Pedersen JF (2009). A non-sense mutation in a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene is responsible for the sorghum *brown midrib6* phenotype. *Plant Physiol* **150**, 584–595.
- Shafiei R, Hooper M, McClellan C, Oakey H, Stephens J, Lapierre C, Tsuji Y, Goeminne G, Vanholme R, Boerjan W, Ralph J, Halpin C (2023). Downregulation of barley ferulate 5-hydroxylase dramatically alters straw lignin structure without impact on mechanical properties. *Front Plant Sci* **13**, 1125003.
- Sibout R, Eudes A, Pollet B, Goujon T, Mila I, Granier F, Séguin A, Lapierre C, Jouanin L (2003). Expression pattern of two paralogs encoding cinnamyl alcohol dehydrogenases in *Arabidopsis*. Isolation and characterization of the corresponding mutants. *Plant Physiol* **132**, 848–860.
- Tobias CM, Chow EK (2005). Structure of the cinnamyl-alcohol dehydrogenase gene family in rice and promoter activity of a member associated with lignification. *Planta* **220**, 678–688.
- Tsuruta SI, Ebina M, Nakagawa H, Kawamura O, Akashi R (2007). Isolation and characterization of cDNA encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Grass Sci* **53**, 103–109.
- Vasupalli N, Hou D, Singh RM, Wei HT, Zou LH, Yrjälä K, Wu AM, Lin XC (2021). Homo- and hetero-dimers of CAD enzymes regulate lignification and abiotic stress response in moso bamboo. *Int J Mol Sci* **22**, 12917.
- Vermerris W, Thompson KJ, McIntyre LM (2002). The maize *Brown midrib1* locus affects cell wall composition and plant development in a dose-dependent manner. *Heredity* **88**, 450–457.
- Wang RH, Shi L, Tang GG, Liang YC, Zhang CY (2003). Effect of osmotic stress on activities of protective enzymes system in *Agropyron mongolicum* seedling. *Chin Bull Bot* **20**, 330–335. (in Chinese)
- 王荣华, 石雷, 汤庚国, 梁寅初, 张称意 (2003). 渗透胁迫对蒙古冰草幼苗保护酶系统的影响. *植物学通报* **20**, 330–335. (in Chinese)
- Wang RH, Shi L, Tang GG, Liang YC, Zhang CY (2004). Effect of NaCl stress on growth and content of severalions of wheatgrass. *Bull Botanical Res* **24**, 326–330. (in Chinese)
- 王荣华, 石雷, 汤庚国, 梁寅初, 张称意 (2004). 盐胁迫下蒙古冰草幼苗生长和离子含量的变化. *植物研究* **24**, 326–330.
- Xiao SH, Hu Q, Shen JL, Liu SM, Yang ZG, Chen K, Klosterman SJ, Javornik B, Zhang XL, Zhu LF (2021). GhMYB4 downregulates lignin biosynthesis and enhances cotton resistance to *Verticillium dahliae*. *Plant Cell Rep* **40**, 735–751.
- Xu L, Zhu LF, Tu LL, Liu LL, Yuan DJ, Jin L, Long L, Zhang XL (2011). Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *J Exp Bot* **62**, 5607–5621.
- Youn B, Camacho R, Moinuddin SGA, Lee C, Davin LB, Lewis NG, Kang C (2006). Crystal structures and catalytic mechanism of the *Arabidopsis* cinnamyl alcohol dehydrogenases AtCAD5 and AtCAD4. *Org Biomol Chem* **4**,

1687–1697.

Yusuf CYL, Nabilah NS, Taufik NAAM, Seman IA, Abdullah MP (2022). Genome-wide analysis of the CAD gene family reveals two *bona fide* CAD genes in oil palm. *3 Biotech* **12**, 149.

Zeng JJ, Helms GL, Gao X, Chen SL (2013). Quantification of wheat straw lignin structure by comprehensive NMR analysis. *J Agric Food Chem* **61**, 10848–10857.

Zhang KW, Qian Q, Huang ZJ, Wang YQ, Li M, Hong LL,

Zeng DL, Gu MH, Chu CC, Cheng ZK (2006). GOLD HULL AND INTERNODE2 encodes a primarily multifunctional cinnamyl-alcohol dehydrogenase in rice. *Plant Physiol* **140**, 972–983.

Zhao Y, Chen XY, Shi FM, Yun JF, Wang JJ (2015). Cloning and expression analysis of *MwDREB3* from Mongolian wheatgrass. *Acta Agre Sin* **23**, 377. (in Chinese)

赵彦, 陈雪英, 石凤敏, 云锦凤, 王俊杰 (2015). 蒙古冰草 *MwDREB3*基因的克隆及表达分析. 草地学报 **23**, 377.

## Sequence Identification and Functional Analysis of *Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase* Gene from *Agropyron mongolicum*

Heping Wang<sup>1,2</sup>, Zhen Sun<sup>2</sup>, Yuchen Liu<sup>2</sup>, Yanlong Su<sup>2</sup>, Jinyu Du<sup>2,5</sup>, Yan Zhao<sup>5</sup>, Hongbo Zhao<sup>1</sup>, Zhaoming Wang<sup>6</sup>, Feng Yuan<sup>6</sup>, Yaling Liu<sup>6</sup>, Zhenying Wu<sup>2,3,4</sup>, Feng He<sup>2,3,4\*</sup>, Chunxiang Fu<sup>2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; <sup>2</sup>Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China; <sup>3</sup>Shandong Energy Institute, Qingdao 266101, China; <sup>4</sup>Qingdao New Energy Shandong Laboratory, Qingdao 266101, China; <sup>5</sup>Key Laboratory of Grassland Resources, Ministry of Education/Key Laboratory of Forage Cultivation, Processing and Efficient Utilization of Ministry of Agriculture and Rural Affairs/College of Grassland, Resource and Environmental Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; <sup>6</sup>Key Laboratory of Forage Breeding and Seed Production in Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010018, China

**Abstract** As an essential enzyme in plant secondary metabolism, cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) plays a key role in regulating plant growth and development, as well as biological/abiotic stress resistance. *Agropyron mongolicum* is a traditional forage grass widely distributed in the desert grassland areas of northern China, which exhibited high tolerance to drought and cold stresses. To explore the role of cinnamyl alcohol dehydrogenase in *A. mongolicum*, in this study, a CAD gene was identified from the full-length transcriptome data of *A. mongolicum* and subsequently analyzed *in vitro*. The 1 083 bp coding sequence of *AmCAD* encodes 361 amino acids, which has typical conserved CAD region containing two Zn<sup>2+</sup> binding motifs and NADP(H) cofactor binding motifs, belongs to the typical CAD protein, and its three-dimensional structure is similar to AtCAD5. *AmCAD* is highly expressed in the stem. The *AmCAD* recombinant protein showed a robust catalytic ability to different cinnamaldehyde substrates, with the highest substrate affinity of cinnamyl aldehyde and sinapaldehyde. Under drought stress condition, the expression level of *AmCAD* was significantly induced, indicating a potential function of this gene in stress tolerance. The experimental results indicate that *AmCAD* may play an important role in lignin biosynthesis and drought stress tolerance in *A. mongolicum*. Our research provided potentially valuable genetic resources for molecular breeding of *A. mongolicum* to improve biomass quality and stress resistance.

**Key words** *Agropyron mongolicum*, cinnamyl alcohol dehydrogenase, lignin, drought resistance

Wang HP, Sun Z, Liu YC, Su YL, Du JY, Zhao Y, Zhao HB, Wang ZM, Yuan F, Liu YL, Wu ZY, He F, Fu CX (2024). Sequence identification and functional analysis of *Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase* gene from *Agropyron mongolicum*. *Chin Bull Bot* **59**, 204–216.

\* Authors for correspondence. E-mail: hefeng@qibebt.ac.cn; fucx@qibebt.ac.cn

(责任编辑: 朱亚娜)