

苯丙烷代谢关键基因 *Cc4CL3* 对山核桃愈伤组织褐化的影响

刘晨¹ 周小红¹

(1.浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室 浙江杭州 311300)

摘要: 木质素、类黄酮等酚类化合物参与了植物的生物或非生物胁迫响应,同时作为氧化反应的底物影响着组织培养材料的褐化。4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)是苯丙烷代谢途径关键限速酶,调控着下游代谢流向,不同 4CL 同源基因可能参与不同酚类物质的合成而影响褐化。山核桃是重要经济林树种,褐化问题突出。本研究以山核桃为代表研究 4CL 基因与褐化的关系,首先通过表型观察结合二乙酸荧光素(FDA)染色跟踪山核桃愈伤组织的褐化进程,探究愈伤组织褐化的规律,继代后 7-10 天荧光最强,愈伤增殖最快,继代 17 天时荧光强度局部减弱,随后愈伤组织快速褐化,继代 24 天时愈伤组织褐化严重,无法增殖;利用 TBtools 等生信工具筛选山核桃 4CL 家族成员,共鉴定出 4 个 4CL 成员,通过系统发育进化树的构建发现 *Cc4CL1*、*Cc4CL2*、*Cc4CL4* 聚类在 I 型分支,可能参与木质素合成,*Cc4CL3* 聚类在 II 型分支,可能与其他苯丙烷类合成相关;通过 RT-qPCR 分析各成员表达特征,不同分支的 4CL 在愈伤组织褐化发生前后表达量变化差异明显,其中 *Cc4CL3* 在 17 天后愈伤组织出现褐化时显著上调表达,可能是影响褐化的关键 4CL 基因;克隆 *Cc4CL3* 基因序列,构建 35S::*Cc4CL3*-GFP 过表达载体,获得的 *Cc4CL3* 过表达愈伤组织系与对照相比增殖困难,褐化进程提前;之后在 *Cc4CL3* 基因第一个外显子上设计一条特异性的 gRNA,采用 CRISPR/Cas9 技术对 *Cc4CL3* 基因进行编辑,和对照相比,基因编辑 *Cc4CL3* 愈伤组织系增殖显著加快,褐化被抑制;通过外施 NAA 可以改善过表达 *Cc4CL3* 愈伤组织生长不良的现象,缓解褐化程度,而对基因编辑 *Cc4CL3* 愈伤组织促进增殖效果不明显,且愈伤组织呈现淡黄色。综上所述,FDA 染色可作为指示剂用于表征愈伤组织褐化的发生,*Cc4CL3* 的表达影响着愈伤组织褐化的发生,NAA 可以缓解过表达 *Cc4CL3* 愈伤组织的褐化程度。

关键词: 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL); 褐化; 山核桃; 愈伤组织; CRISPR/Cas9