

大豆疫霉菌侵染对大豆木质素含量及合成关键基因表达的影响

甘淑萍, 闫 强, 崔晓霞, 薛 冬, 赵晋铭, 郭 娜, 王海棠, 邢 邯

(南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室(综合)/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘 要:为探究大豆木质素含量及合成关键基因在与大豆疫霉菌互作过程中的变化趋势及相关性,利用大豆疫霉菌株 P6497 接种大豆品种 Williams, 分别于 6, 8, 10 和 15 d 分析了根部组织木质素含量及合成相关基因的表达。结果表明:根组织中木质素含量在疫霉菌侵染过程中积累速度显著增加;对木质素合成过程中 9 个合成关键基因表达模式分析表明, *PAL*, *C4H* 和 *F5H* 表达水平在所选 4 个时间点均显著高于未接种对照; *CCoAOMT* 在接种后第 8, 10 和 15 天 3 个时间点的表达水平显著高于对照; *4CL* 的表达在接种后第 10 和 15 天时比对照上调超过 100 倍; *CAD* 和 *CCR* 表达水平分别在接种后 8 和 10 d 与对照存在显著差异; *C3H* 和 *COMT* 的表达量在处理组和对照组中差异不显著。在接种样品中, *C4H*, *4CL* 和 *CCR* 基因表达与木质素含量变化模式呈显著正相关。以上结果表明:大豆根部木质素积累受疫霉菌侵染诱导,暗示木质素参与大豆与疫霉菌互作过程,同时根据试验结果推测 *C4H*, *4CL* 和 *CCR* 是诱导木质素含量提高的关键基因。

关键词:大豆;木质素;疫霉根腐病抗性;基因表达;相关性
中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2016.05.0789

Lignin Content and Expression of Key Biosynthetic Genes in Soybean upon Infection by *P. sojae*

GAN Shu-ping, YAN Qiang, CUI Xiao-xia, XUE Dong, ZHAO Jin-ming, GUO Na, WANG Hai-tang, XING Han
(Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/Key Laboratory for Biology and Genetic Improvement of Soybean(General), Ministry of Agriculture/National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

Abstract: To explore the variation tendency of soybean lignin content and key biosynthetic genes expression in the progress of soybean and *Phytophthora sojae* interaction and the relationship between them. The lignin contents and key biosynthetic genes expression of Williams roots were analyzed at 6, 8, 10 and 15 days post inoculation(dpi) with *P. sojae* P6497 isolate. The results showed that the lignin content in infected tissues showed a higher accumulations rate when compared with uninfected control. The expression analysis of the 9 key biosynthetic genes exhibit that *PAL*, *C4H* and *F5H* were significantly up-regulated in infected samples than that in control at all selected time points, *CCoAOMT* was significantly higher at 8, 10, 15 dpi, *4CL* showed more than 100 folds higher than control at 10 and 15 dpi, *CAD* and *CCR* were significantly higher at 8 and 10 dpi respectively, the remain two genes(*C3H* and *COMT*) showed no significantly difference between inoculated and control samples. The further analysis found that the expression of *C4H*, *4CL* and *CCR* variation tendency in inoculated samples were significantly positive correlated with lignin content. The above results demonstrated that the content of soybean lignin was induced by *P. sojae* infection, implying that lignin may participate in the interaction between soybean and *P. sojae*, and *C4H*, *4CL* and *CCR* genes plays a crucial role in lignin synthesis induced by *P. sojae* in soybean.

Keywords: Soybean(*Glycine max*); Lignin; PRR resistance; Gene expression; Correlation

大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)引起的大豆疫霉根腐病(*Phytophthora* root rot, PRR)是严重影响大豆生产的毁灭性病害之一,广泛分布于世界各大豆产区,对我国大豆的生产也造成严重威胁^[1]。众多的初级和次级代谢产物已被报道参与产生植物对生物和非生物胁迫抗性^[2]。木质素作为植物细胞壁的主要组分,在植物发育与对病原菌抗性反应中发挥着重要作用。

木质素作为植物体内抵抗病原菌侵染的初始

物理屏障,已被证明参与植物的防卫反应过程。当植物遭受病原菌或昆虫侵染时会诱导细胞壁的木质化,表明木质素可能作为化学或物理屏障保护相邻的植物细胞免遭进一步的损伤^[3]。同时也有研究表明,植物体内由病原菌或其激发子诱导产生的木质素与自然发育形成木质素存在显著差异,因此推测植物防卫反应过程中木质素的合成调控与自然发育过程中木质素合成是由不同调控途径实现的^[4-5]。

收稿日期:2016-04-11
基金项目:江苏省农业科技支撑计划(BE2013350);国家公益性行业(农业)科研专项经费(201303018);转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004);国家现代产业技术体系(CARS-004-PS10);江苏省现代作物生产协同创新中心。
第一作者简介:甘淑萍(1992-),女,硕士,主要从事大豆分子遗传育种研究。E-mail:2014101134@njau.edu.cn。
通讯作者:邢邯(1963-),男,教授,博导,主要从事大豆育种研究。E-mail:hanx@njau.edu.cn。

木质素是由植物体内的苯丙烷代谢途径生成的一种天然高分子物质,它的生物合成以苯丙氨酸开始,经过羟基化、甲基化、链接和还原反应,最终生成木质素的 3 种主要单体物质松柏醇 (coniferyl alcohol)、芥子醇 (sinapyl alcohol) 和对 - 香豆醇 (p-coumaryl alcohol),这 3 种单体通过进一步聚合反应生成愈创木基型木质素 (guaiacyl lignin, G 型木质素),紫丁香基型木质素 (syringyl lignin, S 型木质素) 和对 - 羟苯基型木质素 (*p*-hydroxyphenyl lignin, H 型木质素)^[6]。目前对于植物木质素单体合成途径及其中的关键调控酶的研究已经比较清楚,木质素合成代谢过程中主要存在 9 种关键催化酶基因:处于苯丙氨酸代谢途径上游的苯丙氨酸解氨酶基因 (*PAL*)、肉桂酸 4-羟化酶基因 (*C4H*)、4-香豆酰 CoA 连接酶基因 (*4CL*) 和对香豆酸 3-羟化酶基因 (*C3H*),属于木质素特异合成途径的咖啡酸 O-甲基转移酶基因 (*COMT*),咖啡酰 CoA-O-甲基转移酶基因 (*CoAOMT*) 和阿魏酸 5-羟基化酶基因 (*F5H*),以及下游和木质素单体组成相关的肉桂酰 CoA 还原酶基因 (*CCR*) 和肉桂醇脱氢酶基因 (*CAD*)^[7]。

研究发现,部分大豆木质素合成酶基因参与大豆与病原菌互作过程,*PAL* 和 *4CL* 的表达和所编码的酶在根结线虫和胞囊线虫侵染的抗性品种中均上调,但位于木质素合成下游的 *CCR* 和 *CAD* 不参与该两种病原侵染响应^[8]。外源施加肉桂酸能够提高大豆体内 *C4H* 酶活性,增加木质素含量^[9]。但是缺乏整个合成通路关键基因在大豆与病原菌互作过程中表达模式及其与木质素含量相关性的分析,同时对于木质素含量在栽培大豆与疫霉互作过程中的变化趋势及其在对疫霉抗性中的作用尚不明确,在此互作过程中行使关键功能的候选基因也尚无报道。本研究通过分析大豆品种 Williams 接种大豆疫霉菌后木质素含量的变化,明确了木质素在大豆与疫霉互作过程中的积累模式。基于木质素单体合成途径在维管植物中的保守性^[10],利用功能明确的拟南芥木质素合成关键酶基因,通过同源基因比对的方法在大豆基因组数据库中进行同源比对,同时参考大豆中已报道基因信息,对 9 个大豆木质素合成关键基因的表达模式进行了分析。本研究将为获得大豆与疫霉互作过程中调控大豆木质素生物合成的关键候选基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌株的活化及培养

试验所需大豆疫霉菌株为 P6497,由本实验室保存。将生长有大豆疫霉菌 P6497 的 V8 培养基切

成小块反贴于新 V8 培养基上,24℃ 黑暗培养 7 d,待疫霉菌长满培养皿底部后用于下一步试验。

1.2 植物材料的处理

供试大豆品种选择 Williams,其不含有已知的疫霉抗病基因,同时对疫霉具有中等部分抗性。取圆底小花盆,将长满疫霉菌的 V8 培养基平铺于花盆底部,以营养土和蛭石 1:3 混合后选取籽粒完好无机械损伤的大豆 Williams,每盆 10 粒播种于盆中作为处理组,以无疫霉菌 V8 培养基铺底种植的大豆 Williams 为对照,置于人工气候室 25℃,相对湿度 60%,光周期为 16 h 光照,8 h 黑暗培养^[11]。

1.3 间苯三酚染色

本试验利用间苯三酚与木质素之间特殊的显色反应来对大豆根部木质素进行检测。所需的试剂及配制方法如下:将 38% 甲醛 30 mL,冰醋酸 5 mL,70% 酒精 90 mL 与 5 mL 甘油混合配制成 FAA 固定液;间苯三酚 0.05 g 粉末溶于 1 mL 95% 酒精中,避光保存备用。

分别于大豆生长第 6,8,10,15 天取样,将根部清洗后选取生长状况一致的根组织进行徒手切片,用 FAA 固定液固定保存。染色时,将切片从固定液中取出,滤纸吸除固定液置于载玻片上,滴 5% 的间苯三酚数滴后,稍待片刻,滴加 2 mol·L⁻¹ 的盐酸 1 滴,甘油封片后用显微镜在可见光下进行观察^[12]。

1.4 大豆总木质素相对含量测定

木质素含量的测定在胡丹等^[13]描述的方法上进行改进。根组织除杂后称取 1 g 用 95% 乙醇充分研磨为匀浆后 4 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,收集沉淀,95% 乙醇清洗 3 次,乙醇:正己烷 = 1:2 (v/v) 冲洗两次后离心,待沉淀物风干后装入 150 mm×19 mm 的带栓试管中,加入 25% 乙酰溴 (与冰乙酸 1:4 混合) 5 mL 后加盖,充分振荡,在 70℃ 恒温水浴中保温 30 min,每隔 10 min 摇匀一次使沉淀物溶解,接着加入 2 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液 0.9 mL 来终止反应,再加 5 mL 冰乙酸,并将试管中的反应物加入 100 mL 容量瓶中,用少量冰乙酸冲洗,然后加入 7.5 mol·L⁻¹ 的盐酸羟胺 5 mL,边冷却边摇动,加冰乙酸定容至 25 mL。用岛津 UV1800 紫外分光光度计测定样品在 280 nm 处的吸光值,每个样品 3 次重复,以 280 nm 处的吸光值来表示木质素的相对含量,单位为 OD·g⁻¹ FW。

1.5 大豆木质素代谢关键基因表达分析

将保存的根部样品用 RNA simple total kit (Tiangen, China) 试剂盒进行 RNA 提取,用 Prime-Script TMRT reagent Kit (TaKaRa, Japan) 试剂盒进行基因组 DNA 消除和反转录,合成 cDNA 后于 -20℃

保存备用。

查找已报道的拟南芥木质素合成关键基因核酸序列,分别以拟南芥 *PAL1* (*AT2G37040*)^[14], *C4H* (*AT2G30490*)^[15], *C3H* (*AT2G40890*)^[16], *4CL* (*AT3G21240*)^[17], *COMT* (*AT5G54160*)^[18], *CCoAOMT* (*AT4G34050*)^[19], *F5H* (*At4g36220*)^[20], *CCR* (*AT1G15950*)^[21], *CAD* (*AT1G72680*)^[22] 的序列在大豆基因组数据库 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search>) 中搜索

表 1 木质素合成关键基因及引物序列

Table 1 Primer sequences of lignin synthesis genes			
基因 Gene	基因登录号 Gene model ID	引物序列 Primer sequence (5'-3')	
<i>PAL</i>	Glyma.03G181600	F: TAACTGGCAGACCCAACCTC	R: CATTAAACAAGGGCAAGACC
<i>C4H</i>	Glyma.02G236500	F: AAGCTGCCCTGGAATCAT	R: CCTGAATGAACAAAGGGTC
<i>C3H</i>	Glyma.03G122000	F: TCTCAAGCCTGCCTTATCTAC	R: ATAGCCTCCAACCTTTGACATT
<i>4CL</i>	Glyma.11G091600	F: AGGTTCTACGGAATAGGTTGC	R: GTCTTTGTGCGGAATGGATA
<i>COMT</i>	Glyma.06G137200	F: TGGGACTGGAGCGATAAT	R: TTCGGAACACTCACAAACAT
<i>CCoAOMT</i>	Glyma.07G214700	F: TACTACAGGGACTTCGTGC	R: CGACGGCAGATAGTGATT
<i>F5H</i>	Glyma.01G169200	F: ATGAGTTGCTGGCGTTCT	R: TGATAGCCTTGATGTTATCCTT
<i>CCR</i>	Glyma.13G369800	F: TCCTTCATCTTGACTCCGTTAG	R: AGGCTCCACCATTTCCTCG
<i>CAD</i>	Glyma.15G059500	F: CTGGGATGGGCAGCAAGA	R: ACATCGGCGAAGCAAACA

2 结果与分析

2.1 疫霉菌侵染影响大豆生长

与对照相比,大豆品种 Williams 接种大豆疫霉菌株 P6497 后,大豆根系的生长明显受到抑制,处理组的根短细,并且随着接种时间的推延,根系组织出现褐色病斑,病斑逐渐向茎部扩展,待幼苗生长至第 15 天时,处理组根部有明显的腐烂坏死(图 1)。

2.2 疫霉菌侵染诱导大豆木质素积累

为研究疫霉侵染是否会诱导大豆木质素的合成,首先利用间苯三酚染色法对图 1 所示的接种和对照植株近地表茎根交接处的根组织进行切片染色观察。发现对照植株随着时间推移,木质部染色程度逐渐加深,被染色细胞层数增加,说明木质素在木质部随大豆生长发育进程逐渐积累。对比同时间点处理组和对照组的染色结果发现,接种疫霉的植株木质部细胞染色程度明显深于对照,同时在第 15 天的处理样本中韧皮部出现明显的木质化现象(图 2),表明大豆疫霉菌处理诱导大豆根部长木质素的合成增加。为了进一步研究在这 4 个时间点,木质素含量的具体变化趋势,用紫外分光光度法对根系中总木质素的相对含量进行检测。发现对照

同源序列,选择同源性最高的序列利用 Primer Premier 5 软件设计引物,并进行 PCR 验证引物扩增效率,最终获得 9 个大豆中木质素合成关键酶基因候选序列(表 1),其编码氨基酸序列同源性分别为 89.5%、69.6%、88.6%、67.7%、86.6%、95.1%、75.9%、83.4%、88.5%。利用实时荧光定量 PCR 的方法分析基因表达量,以大豆 *Tubulin* 基因作为内参基因。

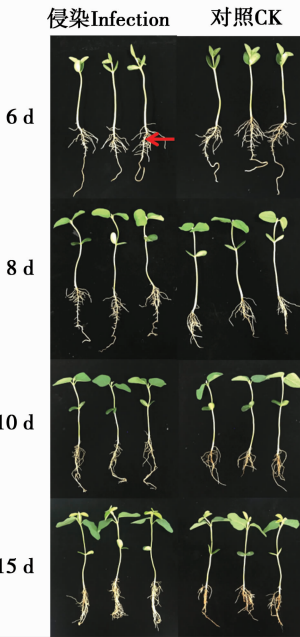


图 1 植株接种表型

Fig. 1 The pathological phenotype

植株中木质素的含量随着大豆生长缓慢增加,而在疫霉侵染组织中,木质素积累速度和含量均显著高于对照组(图 3),以上结果表明疫霉菌侵染促进了大豆根部木质素的积累。

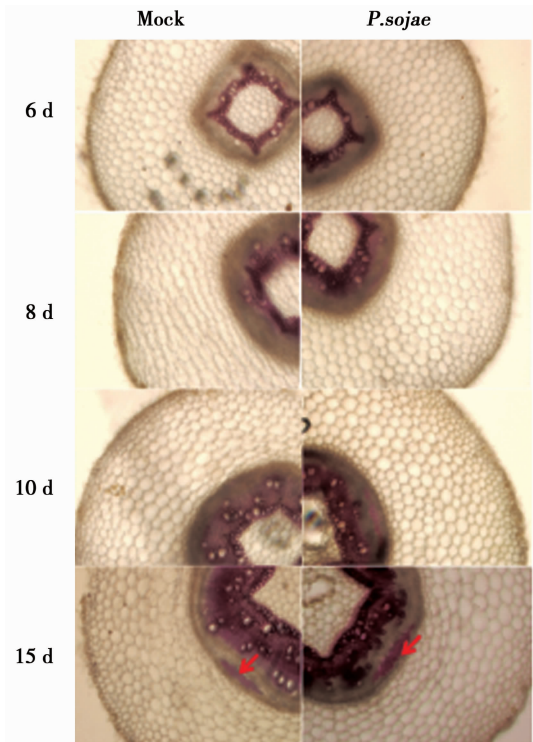
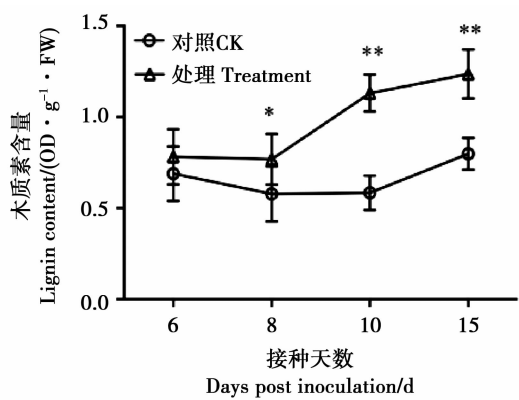


图2 木质素组织化学染色分析
Fig. 2 Histochemical stain of lignin

2.3 木质素合成相关基因的表达分析

研究大豆木质素合成途径中相关基因的表达模式发现未接种疫霉菌的大豆根中 *PAL*、*C4H*、*4CL*、*F5H* 和 *CAD* 在大豆生长至第6,8,10 和 15 天时基因表达水平未见显著差异, 基因 *C3H*、*COMT*、*CCoAOMT* 和 *CCR* 均随大豆生长发育出现上调表达



* 和 ** 分别表示在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平差异显著。
下同。
* and ** indicate significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$. The same below.

图3 疫霉侵染后木质素含量变化

Fig. 3 Changes of lignin content post *P. sojae* inoculation
模式。进一步比较接种前后木质素合成关键基因的表达模式差异发现,接种疫霉后 *PAL*、*C4H* 和 *F5H* 基因的表达水平在所选 4 个时间点均显著高于未接种对照组, *CCoAOMT* 在接种后在第8,10 和 15 天表达水平显著高于对照, *4CL* 在接种后第 10 和 15 天的表达量比对照上调超过 100 倍, *CCR* 和 *CAD* 表达水平分别在接种后第 10 和 8 天与对照存在显著差异, *C3H* 和 *COMT* 则在接种处理和对照中的表达量不存在显著差异(图 4)。说明在大豆与疫霉互作过程中,所选择 9 个候选基因的表达模式存在显著差异。

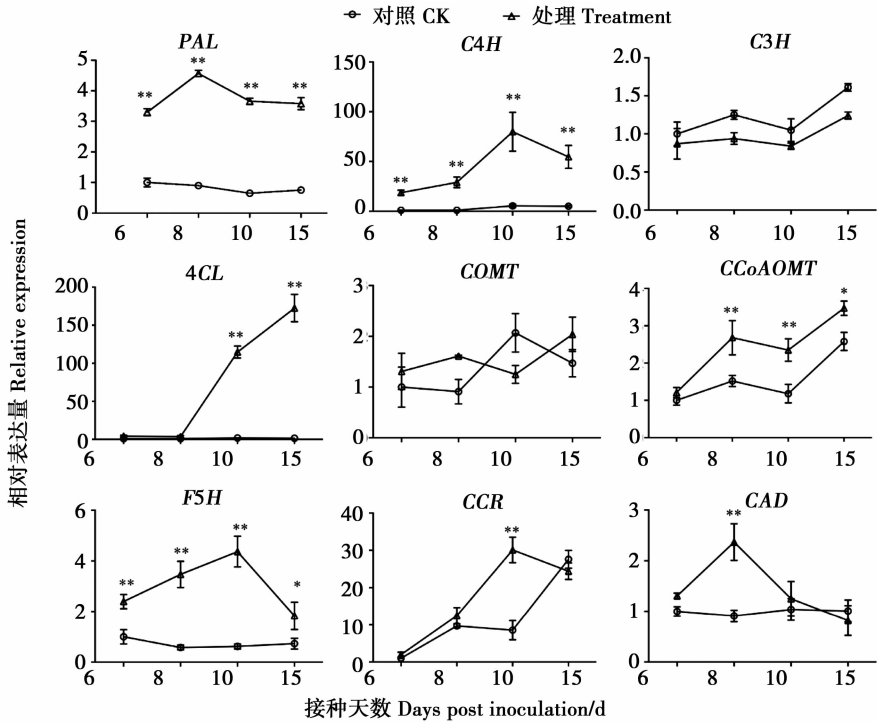


图4 9个木质素合成关键基因表达分析
Fig. 4 The transcriptional analysis of 9 lignin anabolism key genes

2.4 木质素含量与候选基因表达水平相关性分析

为了进一步挖掘疫霉侵染诱导大豆木质素产生过程中行使主要功能的候选基因,对各时间点木质素含量和基因表达水平的相关性进行了分析。结果表明,*C4H*、*4CL* 和 *CCR* 基因的表达在侵染和对

照样品中均和木质素含量极显著正相关, *PAL* 和 *CCoAOMT* 的表达在未接种样品中与木质素含量呈显著正相关关系,但在接种样品中与木质素含量相关性不显著(表2)。

表 2 木质素含量与合成关键基因表达量相关性分析
Table 2 Correlation analysis of lignin content and its anabolism genes expression

	<i>PAL</i>	<i>C4H</i>	<i>C3H</i>	<i>4CL</i>	<i>COMT</i>	<i>CCoAOMT</i>	<i>F5H</i>	<i>CCR</i>	<i>CAD</i>
对照 Control	0.886 **	0.869 **	0.571	0.714 **	0.265	0.732 **	-0.087	0.827 **	0.158
侵染 Inoculation	-0.351	0.827 **	0.347	0.967 **	0.364	0.471	-0.098	0.818 **	-0.511

3 结论与讨论

3.1 木质素含量与植物抗病反应的关系

木质素与细胞壁中的纤维素等多糖分子相互交联,成为植物次生细胞壁的重要组分。由于其特殊的性质结构,木质素有多种重要的生物学功能,例如木质素在植物与病原菌互作中充当天然物理屏障阻遏病原菌入侵^[23],此过程通常也伴随着木质素含量的积累。并且研究表明,木质素含量与植物抗病性之间存在正相关性,木质素参与植物对病原菌的抗性反应^[24-25]。在玉米与黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)互作过程中,抗病和感病品种中木质素含量在接种前不存在显著差异,但接种后抗病品种穗轴中木质素积累显著高于感病品种,由于细胞壁木质素的交联抑制了病原菌的移动和生长^[26]。对禾谷镰刀菌(*Fursarium graminearum*)表现抗病的玉米品种吉单 180 茎基部髓组织原生木质素含量低于感病品种吉单 327,但是经病原菌诱导后木质素高于感病品种^[27]。在辣椒中,黄萎菌侵染诱导产生的木质素能够减缓菌丝对细胞壁的穿透。野生大豆疫霉处理后,同样发现木质素含量的增加^[28]。在这些不同类型的植物与病原菌互作过程中,木质化使得细胞壁增厚,侵染点组织结构发生变化,从而抑制病原菌的进一步扩展。在本研究中,栽培大豆品种 Williams 接种大豆疫霉后根部木质素积累速度显著高于对照,说明疫霉侵染同样触发了大豆根组织的木质化过程,这也验证了前人在野生大豆与疫霉互作过程中的结果。

3.2 抗病反应中调控植物木质素合成关键基因

木质化作为植物木质部次生壁主要的此生代谢现象,木质素合成途径及关键功能基因随着研究的不断深入而逐渐被报导^[29]。木质素的合成作为一个复杂的过程,木质化在植物不同发育时期和不同器官中的发生程度也存在巨大差异,同时,其每步合成催化酶编码基因的功能并不一致^[30-31]。在病原菌诱导木质素沉积的过程中,仅有部分合成基因的表达水平与对照相比存在显著差异。在玉米中,作为木质素合成过程中的关键酶,咖啡酰甲基转移酶(*CCoAOMT*) 基因的表达水平在抗病和感病

品种接种黄曲霉菌后并没有表现出差异^[26],但是在与禾谷镰刀菌的互作过程中,抗病品种中苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)、酪氨酸解氨酶(*TAL*) 和过氧化物酶(*POD*)等的酶活性在接种后显著高于感病品种^[27]。Bi 等^[32]通过对小麦 32 个木质素合成候选基因的表达分析表明,有 17 个基因受禾谷镰刀菌侵染诱导表达,而仅有 *PAL1* 受锈病菌(*Puccinia triticina*) 诱导。本研究中 *PAL*、*C4H*、*4CL*、*CCoAOMT*、*F5H*、*CCR*、*CAD* 等基因的表达在疫霉接种样品中均表现出不同水平的上调,其中 *C4H*、*4CL* 和 *CCR* 基因表达和木质素含量极显著正相关。这些结果表明,在不同作物与病原互作系统中,调控诱导木质素积累的基因可能存在差异,这也表明了在大豆与疫霉互作过程中,筛选调控木质素积累关键基因的重要性。

3.3 木质素在育种中的潜在利用价值

本文研究了大豆木质素含量和大豆对疫霉抗性的关系,结合前人在野生大豆和其它作物的研究结果^[27-29],推测在栽培大豆中,木质素同样参与大豆对疫霉的防卫反应。通过对侵染和对照组织中木质素合成相关基因表达模式的分析,筛选到 3 个在病原菌诱导木质素积累过程中关键候选基因。因此,通过培育高木质素含量的大豆品种提高对大豆疫霉抗性为防控疫霉危害提供了一个新的思路。同时,木质素在作物抗倒伏性中的功能也被广泛研究,作物茎秆中较高的木质素含量能显著提高抗倒伏性^[33-34]。因此,对大豆木质素及其代谢的研究不仅在抗性育种中有潜在利用价值,而且对培育抗倒伏品种也具有参考价值。

参考文献

[1] 孙石,赵晋铭,武晓玲,等. 大豆对大豆疫霉根腐病抗性的遗传分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(2): 492-498. (Sun S, Zhao J M, Wu X L, et al. Inheritance of resistance to *Phytophthora sojae* in soybean[J]. 2009, 42(2): 492-498.)
[2] Stitt M, Sulpice R, Keurentjes J. Metabolic networks: How to identify key components in the regulation of metabolism and growth [J]. Plant Physiology, 2010, 152(2): 428-444.
[3] Vance C P, Kirk T K, and Sherwood R T. Lignification as a mechanism of disease resistance[J]. Annual Review of Phytopathology, 1980, 18(1): 259-288.
[4] Lange B M, Lapierre C, Sander mann H. Elicitor-induced spruce

- stress lignin (structural similarity to early developmental lignins) [J]. *Plant Physiology*, 1995, 108(3): 1277-1287.
- [5] Pomar F, et al. Changes in stem lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annum* [J]. *New Phytologist*, 2004, 163(1): 111-123.
 - [6] 曹双瑜, 胡文冉, 范玲. 木质素结构及分析方法的研究进展 [J]. *高分子通报*, 2012(3): 8-13. (Cao S Y, Hu W R, Fan L. The development of analysis method and lignin structure [J]. *Polymer Bulletin*, 2012(3): 8-13.
 - [7] Whetten R, Sederoff R. Lignin biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1001-1013.
 - [8] Edens R M, Anand S C, Bolla R I. Enzymes of the phenylpropanoid pathway in soybean infected with meloidogyne incognita or *Heterodera glycines* [J]. *Journal of Nematology*, 1995, 27(3): 292-303.
 - [9] Salvador V H, Lima R B, dos Santos W D, et al. Cinnamic acid increases lignin production and inhibits soybean root growth [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69105.
 - [10] Xu Z, Zhang D, Hu J, et al. Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom [J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10(5): 1-15.
 - [11] Kosala R, Thomas R H, Fang X X, et al. Soybean root suberin and partial resistance to root rot caused by *Phytophthora sojae* [J]. *Phytopathology*, 2008, 98(11): 1179-1189.
 - [12] 刘彤, 杨文凤, 校现周, 等. 橡胶树 *HbMYB20* 基因的克隆及其对拟南芥次生壁发育的调控 [J]. *林业科学*, 2015(4): 52-59. (Liu T, Yang W F, Xiao X Z, et al. Cloning of *HbMYB20* from *Hevea brasiliensis* and its regulation of secondary wall development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015(4): 52-59.)
 - [13] 胡丹, 刘星贝, 汪灿, 等. 不同抗倒性甜养茎秆木质素合成关键酶基因的表达分析 [J]. *中国农业科学*, 2015, 48(9): 1864-1872. (Hu D, Liu X B, Wang C, et al. Expression analysis of key enzyme genes in lignin synthesis of culm among different lodging resistances of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2015, 48(9): 1864-1872.
 - [14] Ruben V, Véronique S, Bartel V, et al. A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(9): 3506-3529.
 - [15] Capron A, Chang X F, Hall H, et al. Identification of quantitative trait loci controlling fibre length and lignin content in *Arabidopsis thaliana* stems [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(1): 185-197.
 - [16] Rochus F, Hemm M R, Denault J W, et al. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of *Arabidopsis* [J]. *Plant Journal*, 2002, 30(1): 47-59.
 - [17] Ruben V, Véronique S, Bartel V, et al. A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(9): 3506-3529.
 - [18] Moinuddin S G, Jourdes M, Laskar D D, et al. Insights into lignin primary structure and deconstruction from *Arabidopsis thaliana* COMT (caffeic acid O-methyl transferase) mutant *Atom1* [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2010, 8(17): 3928-3946.
 - [19] Richard S, Aymerick E, Gregory M, et al. CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(7): 2059-2076.
 - [20] Weng J K, Mo H, Chapple C. Over-expression of *F5H* in COMT-deficient *Arabidopsis* leads to enrichment of an unusual lignin and disruption of pollen wall formation [J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2010, 64(6): 898-911.
 - [21] Mohammad M D, Jimmy Berrio S, Katia R, et al. Redirection of the phenylpropanoid pathway to feruloyl malate in *Arabidopsis* mutants deficient for cinnamoyl-CoA reductase 1 [J]. *Planta*, 2008, 227(5): 943-56.
 - [22] Rogers L A, Dubos C, Cullis I F, et al. Light, the circadian clock, and sugar perception in the control of lignin biosynthesis [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(416): 1651-1663.
 - [23] Zhong R, Taylor J J, Ye Z H. Disruption of interfascicular fiber differentiation in an *Arabidopsis* mutant [J]. *The Plant Cell*, 1997, 9(12): 2159-2170.
 - [24] 杨家书, 李舜芳, 薛应龙, 等. 小麦品种对白粉病抗病性与过氧化物酶的关系 [J]. *植物病理学报*, 1984(4): 235-240. (Yang J S, Li S F, Xue Y L, et al. Varietal resistance of wheat to powdery mildew and its relation to peroxidases [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1984(4): 235-240.)
 - [25] Schmitthenner A F. Problems and progress in control of phytophthora root rot of soybean [J]. *Plant Disease*, 1985, 69(4): 362-368.
 - [26] Spangler L M. Impact of lignin and caffeoyl coenzyme a O-methyltransferase 1 on *Aspergillus flavus* growth in maize cobs [J]. *American; The Pennsylvania State University*, 2008.
 - [27] 刘晓燕, 金继运, 何萍, 等. 氯化钾对玉米木质素代谢的影响及其与茎腐病抗性的关系 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(12): 2780-2787. (Liu X Y, Jin J Y, He P, et al. Effect of potassium chloride on lignin metabolism and its relation to resistance of corn to stalk rot [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 40(12): 2780-2787.
 - [28] 方东鹏, 靳立梅, 董利东, 等. 野生大豆接种大豆疫霉菌后木质素含量的变化 [J]. *大豆科学*, 2015, 34(1): 99-102. (Fang D P, Jin L M, Dong L D, et al. Change of lignin content in wild soybeans inoculated with *Phytophthora sojae* [J]. *Soybean Science*, 2015, 34(1): 99-102.
 - [29] 高原, 陈信波, 张志扬. 木质素生物合成途径及其基因调控的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2007, 28(2): 47-51. (Gao Y, Chen X B, Zhang Z Y. Advances in research on lignin biosynthesis and its molecular regulation [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2007, 28(2): 47-51.)
 - [30] 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.
 - [31] Koutaniemi S, Warinowski T, Kärkönen A, et al. Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 65(3): 311-328.
 - [32] Bi C, Chen F, Jackson L, et al. Expression of lignin biosynthetic genes in wheat during development and upon infection by fungal pathogens [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2011, 29(1): 149-161.
 - [33] 汪灿, 阮仁武, 袁晓辉, 等. 荞麦茎秆解剖结构和木质素代谢及其与抗倒性的关系 [J]. *作物学报*, 2014, 40(10): 1846-1856. (Wang C, Ruan R W, Yuan X H, et al. Relationship of anatomical structure and lignin metabolism with lodging resistance of culm in buckwheat [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40(10): 1846-1856.
 - [34] Jones L, Ennos A R, Turner S R, et al. Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): A severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis* [J]. *Plant Journal*, 2001, 26(2): 205-216.