

# 基因工程调控木质素生物合成研究现状及在竹子上改良的应用前景

金顺玉<sup>1</sup>, 卢孟柱<sup>2</sup>, 高健<sup>1\*</sup>

(1. 国际竹藤网络中心 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

**摘要** 利用基因工程手段调控木质素合成途径中关键酶基因能降低木质素含量, 改变木质素组成, 提高造纸工业中纸浆的得率, 减少能源的消耗和降低成本, 有利于环境保护。对木质素生物合成中涉及的几种重要酶类及这些酶的基因工程概况进行了综述, 总结了现阶段木质素研究中存在的一些问题, 提出了一些更有效地利用基因工程改良植物的对策和建议, 展望了生物技术手段在竹子改良上的应用前景。

**关键词** 木质素; 生物合成; 基因工程; 竹子改良; 竹浆造纸

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)20-08497-03

**Research Progress of Lignin Biosynthesis with Genetic Engineering Technology and Its Application Prospect in Bamboo Improvement**  
JIN Shun-yu et al (SFA Key Open Laboratory on Bamboo and Rattan Science and Technology, International Center of Bamboo and Rattan, Beijing 100102)

**Abstract** Regulating key enzyme-genes to reduce the lignin content and alter its components could improve paper pulp production, save energy and cost, as well as decrease pollution. The progress of several important enzymes and genes in lignin biosynthesis process was reviewed using genetic regulation. Some questions that existed in the genetic regulating lignin were analyzed. Better methods were proposed to improve the plant quality efficiently. Future prospect of the biotechnology application in bamboo improvement was forecasted.

**Key words** Lignin; Biosynthesis; Genetic engineering; Bamboo improvement; Bamboo pulping

木质素是植物体的主要化学组分, 它与纤维素紧密结合, 填充于植物细胞骨架中, 增强植物体的韧性和机械强度, 协助疏导组织水分运输, 并能一定程度上抵抗外界环境因子对植株的侵害, 在植物的正常生长中起着重要的作用。但是对于造纸工业, 木质素是严重影响纸浆质量和工艺的重要因素。常规化学方法从植物中去除木质素类物质时, 既消耗大量的化学药品与能源, 又造成严重的环境污染。从 20 世纪末始, 科研工作者就开始利用基因工程手段来调控木质素的生物合成, 致力于开发造纸工业生产中低能源消耗, 少环境污染, 更适合于制浆造纸工业的植物资源, 试图从分子水平上解决造纸污染和能源耗费大的难题。

## 1 木质素单体组成

木质素是复杂的苯丙烷单体聚合物, 其合成途径是植物体中十分复杂的生理生化过程。从生物合成过程研究得知, 木质素有 3 种主要单体为: 香豆醇(coumaryl alcohol)、松柏醇(coniferyl alcohol)、芥子醇(sinapyl alcohol); 3 种组成木质素的基本结构为: 香豆醇衍生由对羟苯基丙烷结构单体聚合而成的对羟苯基木质素(coumaryl lignin, H-木质素)、松柏醇衍生由愈创木基丙烷结构单体聚合而成的愈创木基木质素(coniferyl lignin, G-木质素)、芥子醇衍生由紫丁香基丙烷结构单体聚合而成的紫丁香基木质素(sinapyl lignin, S-木质素)。各个单体首先都是由葡萄糖发生芳环化反应而形成莽草酸, 然后由莽草酸合成上述 3 种木质素的基本结构, 然后再由木质素单体发生脱氢聚合反应, 形成一种类木质素聚合体的脱氢聚合体(DHP), 最终合成木质素。虽然在不同植物中各种单体的含量有所不同, 组成植物的木质素也有一定差异, 但在植物体内木质素的生物合成途径基本是相同的<sup>[1]</sup>。

## 2 木质素生物合成中的几种重要酶

近年来, 通过转基因植物对木质素生物合成调控的研究

主要表现在 3 个方面: 一是苯丙酸途径上的调控, 涉及 5 种酶, 分别是苯丙氨酸解氨酶(PAL), 酪氨酸解氨酶(TAL, 仅存在于草本植物中), 肉桂酸 4-羟化酶(C4H), 对香豆酸 3-羟化酶(C3H)和肉桂酸/4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL); 它们表达活性的高低, 与木质素总量密切相关。二是在木质素特异合成途径上, 与木质素单体特异合成相关的酶的调节。主要集中于 3 种酶, 即咖啡酰/5-羟基阿魏酸 O-甲基转移酶(COMT), 咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶(CCoAOMT) 和阿魏酸 5-羟化酶(F5H); 这些酶类的表达对木质素含量尤其是木质素单体的特异合成影响较大, 决定了各种单体在木质素总量中的比例。三是对位于木质素特异合成途径下游酶类的调控, 包括 2 种还原酶羟基肉桂酸脱氢酶(CAD)和羟基肉桂酰-辅酶 A 还原酶(CCR), 它们负责将各种羟基肉桂酰-辅酶 A 酯最终还原成各种木质素单体, 对木质素的合成与代谢也起关键作用。另外, 木质素单体的聚合过程可能需要过氧化物酶类如过氧化物酶(POD)的催化<sup>[2]</sup>。

## 3 木质素生物合成相关基因的研究进展

PAL 位于苯丙烷类代谢的最上游, 是苯丙烷类代谢途径的限速酶。PAL 基因不仅参与木质素单体的合成, 还参与一些属于植保素类细胞壁组成部分的合成。因此, 抑制 PAL 基因的活性往往伴随非正常生长或出现与次生代谢物质有关的环境适应性和抗逆性下降<sup>[3]</sup>。

C4H 催化苯乙烯酸羟基化为 P-对羟基苯乙烯酸。C4H 是属于 CYP73 亚家族、与细胞色素 P400 有关的单氧化酶。在杨树中, C4H 活性与木质素和厚壁组织相联系, 可被真菌处理、真菌感染、受伤及化学诱导剂所诱导。拟南芥 C4H 启动子保留在 PAL 和 4CL 基因中的顺式作用组分, 控制着对光、紫外照射等处理反应的表达<sup>[4-5]</sup>。国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室已从毛竹 cDNA 序列中克隆得到该基因, 并运用 RNAi 技术将反义 C4H 基因转化到烟草中, 下一步实验将验证抑制 C4H 的表达是否对烟草木质素含量及各木质素单体数量造成改变。

作者简介 金顺玉(1980-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 博士研究生, 研究方向: 分子生物学。\* 通讯作者。

收稿日期 2008-06-24

COMT在木质素生物合成中催化咖啡酸、5-羟基松柏醇、5-羟基松柏醇甲基分别生成阿魏酸、芥子醛和芥子醇<sup>[6-7]</sup>，其主要参与S-木质素前体的合成<sup>[8]</sup>。抑制COMT表达，转基因植物中木质素S组分明显降低<sup>[9]</sup>。赵华艳等<sup>[10]</sup>构建了COMT和CCoAOMT双价反义表达载体转化到烟草中得到转基因植株，结果发现，分别抑制这2个基因的表达均会引起木质素含量的降低，当2个酶同时被抑制时，木质素含量降低幅度更大。

CCoAOMT催化咖啡酰CoA甲基化生成阿魏酰CoA。CCoAOMT被抑制时，S与G同时减少，但S/G比值增加，其主要参与G-木质素前体的合成<sup>[6,11]</sup>。Ye等<sup>[12]</sup>在百日草中首次证实了CCoAOMT参与木质素的生物合成。抑制CCoAOMT表达的转基因烟草<sup>[13]</sup>与杨树<sup>[14]</sup>的木质素含量下降更证实CCoAOMT在木质素合成过程中的重要功能<sup>[13-15]</sup>。

F5H是S-木质素合成中必需的酶基因，缺乏F5H活性的拟南芥*fah1*突变体中几乎全部为G-木质素；F5H过量表达的转基因拟南芥、烟草与杨树中S-木质素的生物合成显著增加，G-木质素生物合成被明显抑制<sup>[16]</sup>。Osakabe等<sup>[17]</sup>与Humphreys等<sup>[18]</sup>发现，F5H可以催化松柏醛和松柏醇5'位置羟基化，其活力高于催化阿魏酸羟基化，认为F5H在木质素单体合成途径中催化松柏醛和松柏醇羟基化生成S-木质素单体。

3种羟基肉桂酸的辅酶A酯生成相应的肉桂醛后，由CAD催化生成3种肉桂醇。在几种植物体内CAD活性被抑制以后，木质素总量并没有明显改变<sup>[19]</sup>。Halpin等<sup>[20]</sup>报道，在抑制CAD活性的转基因烟草中，CAD活性为正常水平的10%，然而并没有改变烟草的发育及细胞中木质素的总量。Zeliha等<sup>[21]</sup>利用从豆科植物中克隆的过氧化物酶基因*Shpx6a*反向连接到35S启动子后转入杨树，在转基因杨树叶子中过氧化物酶活性为对照组的50%~70%，叶子中木质素含量下降了10%~20%。

4CL是控制木质素生物合成、催化羟基肉桂酸酮生成G或S型木质素单体途中的关键限速酶基因。Hu等<sup>[22]</sup>利用反义RNA技术抑制黑杨4CL基因表达，在活性下降90%以上的转基因株系中，木质素含量下降达45%，纤维素含量增加15%。赵燕玲等<sup>[23]</sup>选择刺槐GRP1.8启动子与反义的4CL1基因连接构建融合基因转入烟草中，使反义4CL1基因只在维管中定位表达，发现转基因烟草的木质素含量较对照平均降低了13.7%，而转基因植株的纤维素含量较对照升高了15.6%。还有研究发现<sup>[22,24]</sup>，抑制4CL基因的表达不仅使木质素含量减少，纤维素含量增加，还伴随转基因植株生长加快。到目前为止的研究尚未发现，转4CL基因植株出现非正常生长。因此，抑制4CL基因表达为理想的改良造纸资源植物品质的方法。

#### 4 竹木质素的组成及竹浆造纸的利用

竹木质素归类于禾草类木质素，属于GSH型，除有愈创木基(G)和紫丁香基(S)两类单体外，还含有相当数量的对羟基苯基(H)结构，同时其结构中还存在有对香豆酸酯键连接<sup>[25]</sup>。从结构上看，竹木质素应比针叶材木质素易于除去，而且较多的酯键连接有利于木质素的脱除。Higuchi从毛竹

木质素的酸、碱水解反应特性及其产物，推断出其结构属于GSH木质素，在光谱分析中也证实了这一点<sup>[26]</sup>。Kuroda认为，毛竹COMT是催化咖啡酸合成阿魏酸，5-羟基阿魏酸合成芥子酸的单一甲基化酶，其催化作用受后续产物的抑制，这与其他植物的COMT研究结果相一致<sup>[27]</sup>。

我国利用竹类造纸历史悠久，据记载已有1700多年历史。竹类植物中含有丰富的纤维素，并且大多数竹种属中长短纤维，适合作造纸原料。竹浆与木浆、草浆合理搭配，可生产文化、生活、包装用纸及纸板等多种纸品<sup>[28]</sup>，目前常用制浆竹材有30多种，造纸用竹材约占竹材总产量的12%。但是在竹类制浆造纸工业中，由于原材料富含木质素，必须利用大量的化学品将原料中的木质素与用于造纸的纤维素分离，而分离的木质素会形成大量废液，造成严重的环境污染，并且脱木质素化学药品的投入及废液碱回收的处理大大增加了造纸成本。通过生物技术手段研究木质素的生物合成和调控，降低木质素的含量及改变其组分，将有利于更好地利用我国丰富的竹类资源。

#### 5 基因工程调控木质素生物合成存在的问题与对策

利用基因工程技术降低植物木质素含量和组成成分虽然能有效改良造纸用材的品质，但还有一些问题值得注意。通过转基因技术改变植物木质素的组成和含量使其更适合生产利用，必须保证转基因方法不会影响植物的正常生长发育。降低植物木质素的含量或改变木质素的组成，可能会导致植物器官强度、木质素内树液传导、细胞壁通透性等发生改变，产生一些异常表型。如将反义PAL基因转化到杨树中的实验发现，转基因植株虽然木质素含量降低了，但植物出现了非正常生长<sup>[2]</sup>。

细胞壁中的其他酚类化合物以及细胞质中的某些相关物质的变化也会对造纸产生一定的影响。例如，下调赤杨CAD基因会产生较多的单宁，在造纸过程中影响纸的漂白<sup>[29]</sup>。研究还发现，抑制COMT的表达虽然降低了转基因杨树中木质素的含量，但使得S/G比值下降，S/G比值下降导致木质素结构紧密，对木质素的去除可能增加了难度<sup>[30]</sup>。

转基因植物的风险也是一个特别的挑战。改变植物木质素含量和组成可能会降低其抗病、抗虫等防御能力。如Bolwell等在菜豆中发现3个PAL基因，其中PAL2受真菌激发诱导表达，PAL3不受其诱导，但两者均受机械损伤诱导<sup>[31]</sup>。而不合适的转基因还可能会改变其他次生代谢的水平或途径，产生预想不到的后果，这些结果还需要我们做进一步的精确检测和详细评价。虽然转基因技术在木质素合成相关基因的调控应用方面还存在一些问题，但同时也发现了一些对改良品种有利的方法。除了抑制某些相关基因的表达外，上调某些基因的表达或下调一些基因同时伴随过表达某些基因可能也会对纸浆材的有效利用产生有利的影响。例如，F5H基因过量表达的转基因拟南芥、烟草及杨树中，G-木质素含量减少，S-木质素含量增加，制浆过程中木质素更容易被去除<sup>[32]</sup>。使用组成型或部位特异性启动子也是避免转基因发生副作用的一种方法。例如在拟南芥中表达F5H基因，使用C4H基因启动子，比使用组成型启动子CaMV35S更有效<sup>[33]</sup>。用维管组织特异表达启动子调节COMT基因的

转录使转基因烟草中木质素含量明显降低<sup>[34]</sup>。

有研究证明,多基因的遗传调控存在交互作用,COMT-CAD 双转化杨树植株<sup>[35]</sup>中木质素的含量显著下降。研究还表明,同时抑制多个基因的表达具有加和相应,赵华艳等将 COMT 与 CCoAOMT 反义基因以共整合载体方式导入烟草中,发现 2 个基因同时被抑制引起的木质素含量下降程度比单基因分别抑制时要显著。因此,在抑制木质素基因表达时采用共表达载体得到转基因植株,这样抑制效果会更加显著<sup>[10]</sup>。

合适的转化方式也很重要。采用超声波辅助农杆菌介导法、低能离子数与农杆菌结合法均能提高遗传转化效率。Santarem 等在将 *gus* 基因和 *hpt* 基因转化到棕榈中的过程中发现,采用超声波辅助农杆菌法(SAAT 法)的转化效率比用农杆菌介导的方法提高了 30%~45%。因此推测,可能是超声波使材料表面产生微创伤,利于农杆菌进入细胞,提高了农杆菌的感染效率<sup>[36]</sup>。

因此,降低木质素的含量或者改变木质素单体的数量还要考虑是否影响植株的正常生长,选择合适的基因、表达载体及转化方法对于调控木质素生物合成也很重要。在不影响植物正常生长的前提下,应选择不减少造纸主要原料纤维素含量的木质素合成酶基因作为调控核心,以降低木质素含量,提高 S/G 比值等作为衡量标准。现有研究发现,CAH、4CL、CCoAOMT、F5H 是较为理想的目标基因。

## 6 基因工程调控木质素生物合成在竹子上的应用前景展望

我国是少林缺材,木材资源特别是长纤维资源比较缺乏的国家,而且是造纸生产、消费大国,但我国纸浆生产能力严重不足。2005 年全国纸浆消耗总量为 5 200 万 t,进口纸浆达到 759 万 t。对进口原料的严重依赖,增加了我国造纸行业的风险,产业安全受到威胁。目前造纸工业一直是以木材利用为主,但是林木生长周期较长,因此寻找更为合适的材料一直是科研工作者研究的重点。我国竹资源非常丰富,且很多竹种的纤维素含量很高,一般在 20%~30%。如毛竹纤维含量高达 30%~35%,纤维长度长达 2 000 μm,一株毛竹从出笋到成竹只需 2 个月左右的时间,当年即可砍伐,可再生,一次造林,年年受益,永续利用,被认为是除针叶材以外最好的纤维造纸工业原料,是木浆的最佳替代和补充<sup>[37-38]</sup>。充分利用我国的竹子资源,发展竹浆造纸是提升造纸行业国际竞争力的有效途径。

印度使用竹材造纸占造纸原料超过 60%,孟加拉占 60%,而中国用于造纸的竹材却只占极少比例,竹浆仅占 3%;因此,竹材在竹浆、造纸方面有很广阔的利用空间。根据国家发改委对全国林纸一体化工程建设的规划,2010 年我国竹浆的生产能力要达到 190 万 t,需建设原料林基地 60 万 hm<sup>2</sup>;2010 年以后,竹浆生产能力达到 495 万 t,要建设原料林基地 180 万 hm<sup>2</sup>。目前,造纸业与竹产业的联系越来越密切,工业上作为竹浆造纸,为减少碱的用量,降低成本和黑液污染,往往要求采伐木质素含量较低的新竹,但从资源培育的角度来看,过多地采伐新竹无疑对竹林的可持续经营不利。我国的大部分竹浆造纸企业都存在着优良高产竹种的选育难题,而转基因技术能从一定程度上缓解这一难题。通过基

因工程手段调控竹子木质素生物合成途径中的一些重要酶基因,改变竹材中木质素含量或木质素单体数量,改良适于造纸的竹材品种,将为我国造纸业带来直接且巨大的经济效益;同时还能减少传统分离木质素过程中产生的能源浪费、化学药品大量使用、工业废液污染环境等问题,既有利于环保又减少资源的损耗。

目前,竹类植物的分子生物学研究,在分子标记、功能基因的分离与鉴定等方面取得一定的进展,但仍严重滞后于禾本科如水稻、玉米、小麦等农作物的研究进展。同时,竹子本身特殊的生物学特性也限制了其遗传改良进程。常规的改良手段多集中于种质资源收集、引种驯化等,有性遗传改良因其开花的不确定性和开花后即死亡而受到很大限制。采用基因工程手段降低竹木质素含量已成为当前一个活跃的研究领域,通过分子生物学方法从基因水平研究竹子的遗传基础才刚刚起步,采用基因工程手段改良竹材势在必行。

## 参考文献

- [1] 蒋挺大. 木质素[M]. 北京:化学工业出版社,2001.
- [2] 薛永常,李金花,卢孟柱,等. 木质素单体生物合成途径及其修订[J]. 林业科学,2003,39(6):148-152.
- [3] BATE N, ORR J, NI W, et al. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 7608-7612.
- [4] SEWALT V J H, NI W, BLOUNT J W, et al. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase [J]. Plant Physiol, 1997, 115: 41.
- [5] VINCENT J H, SEWALT T, WELTING N, et al. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase [J]. Plant Physiology, 1997, 115: 41-50.
- [6] HU W J, HARDING S A, JRHAN LUNG, et al. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees [J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 808-812.
- [7] CHANDRA A, GUHA S R D. Studies on the decay of bamboo (*Dendrocalamus strictus*) during outside storage-degradation of lignin [J]. Indian Forester, 1981, 107(1): 54-59.
- [8] 陈永忠,谭晓风,DAVID CLAPHAM. 木质素生物合成及其基因调控研究综述[J]. 江西农业大学学报,2003,25(4): 613-617.
- [9] 魏建华,赵华燕,卢善发,等. 毛白杨 COMT 基因 cDNA 的克隆、序列与特异性表达分析[J]. 植物学报,2001,43(3): 326-328.
- [10] 赵华燕,魏建华,张景昱,等. 抑制 COMT 与 CCoAOMT 调控植物木质素的生物合成[J]. 科学通报,2002,47(8): 604-607.
- [11] SEWALT V J H. Lignin impact on fiber degradation: Increased enzymatic digestibility of genetically engineered tobacco stems reduced in lignin content [J]. Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45: 1977.
- [12] YE Z H, KNEUSEL R E, MATERN U. An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia* [J]. Plant Cell, 1994, 6: 1427-1439.
- [13] ZHONG R Q, MORRISON W H, HIMMELSBACH D S. Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyl-transferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants [J]. Plant Physiol, 2000, 124(2): 563-578.
- [14] MEYERMANS H, MORREEL K, LAPIERRE C, et al. Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis [J]. Biol Chem, 2000, 275(47): 36899-36909.
- [15] 刘惠荣,赵华燕,魏建华. 抑制 CCoAOMT 表达对烟草木质素生物合成的影响[J]. 中国农业科学,2002,35(8): 921-924.
- [16] 付月,李学龙,薛永常. 木质素合成酶基因 F5H 的克隆及其鉴定[J]. 安徽农业科学,2006,34(8): 1553-1555.
- [17] OSAKABE K, TSAO C C, LI L. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct S-syringyl lignin biosynthesis in angiosperms [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 8955-8960.

节保证标准化的实施,使其达到量少质高的效应。

在此基础上,积极开发蓝莓品类市场,打造中国高档水果市场的蓝莓第一品牌,抢占市场先机。按照先入为主的消费心理特点,使消费者首先接受品牌,继而接受产品,为提高品牌忠诚度打下坚实的基础。

**3.4.2 产品策略。**市场营销对于产品的研究发展较快,而且强调不应只局限于传统的理解,应该深入研究蓝莓产品的整体内涵,其核心产品包括果品的口感和外形,所含丰富的营养成分,以及对人体极高的保健作用,另外还有作为高档水果带给消费者的荣耀感和满足感。而产品的其他层次要与核心产品相一致,如形式产品、期望产品要注重产品的外形设计,鲜果、加工品的外包装设计要时尚高档,采取小容量、分档包装更容易满足消费者送礼的需求,体现商品高贵的特征。通过打造一流的产品品牌,开发出系列产品,如深加工产品,增加产品的功能、样式,满足消费者对潜在产品的需求。

**3.4.3 定价策略。**由于蓝莓生产的技术壁垒较高,且需求量较大,短时期内很难达到供需平衡,因此蓝莓产品定价应采用产品导入期的撇脂定价法,而且要保证其价格的长期稳定,满足消费者对高档水果的心理价格预期。且产品定价要有别于目前市场上一些具有蓝莓口味的加工品,要突出纯果实的成分含量,从价格上体现出产品的高端定位。

**3.4.4 渠道策略。**

**3.4.4.1 蓝莓鲜果的渠道策略。**由于鲜果的易腐性特征以及企业经营规模的因素,使得蓝莓鲜果在流通过程中最好选择层次较少的短渠道,目前其他鲜果品种多采用生产企业—

批发商—零售商—消费者的多层次渠道,而蓝莓鲜果应该多开发零渠道形式,如在零售店建立柜中柜,生产企业自建零售专卖店,或者通过连锁加盟的形式开设品牌专卖店。另外,还可以根据城市高端消费者返璞归真的需求,通过建立生态园的模式打造鲜果的独特销售渠道,让消费者在生态园中自栽、自采、自收,并附之以相应的技术指导。

**3.4.4.2 蓝莓加工品的渠道策略。**目前蓝莓生产企业对于加工品的渠道设计多为展会宣传,渠道较为狭窄,应该通过中间商,尤其是代理商的营销网络打开市场,对渠道模式选择较为广泛。如根据不同的加工品种类选择相应的代理商,根据高端消费者的消费习惯选择零售商,如五星级宾馆、酒店、酒吧、果品专业店、婴儿用品商店、高档超市、美容院、健身房等高档消费区。

**3.4.5 促销策略。**根据中国市场蓝莓产品的现状,各种蓝莓正处于产品生命周期的导入期,因此在这一阶段企业应该侧重于消费者对产品的认知宣传,其中包括对蓝莓产品的认知以及对企业品牌的认知,尤其是中国蓝莓鲜果销量还未大面积铺开,更适合打造品类市场。另外,蓝莓产品比较适合快速掠取策略,应加大促销投入,选择覆盖面广、宣传效果好的强势传播媒体,迅速占领市场。

另外,要善于运用各种促销手段,在蓝莓产品导入期可以利用一些专家或组织、协会的力量,通过发表论文、科普性的文章、讲座等非商业渠道,增加信息的可信度以及传播力度。

**参考文献**

(上接第8499页)

- [18] HUMPHREYSS J M, HERMME M R, CHAPPLE C. new routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96:10045-10050.
- [19] HIBINO T, TAKABE K, KAWAZU T, et al. Increase of cinnamaldehyde groups in lignin of transgenic tobacco plants carrying and antisense gene for cinnamyl alcohol dehydrogenase. [J]. Biosci Biotech Biotechm, 1995, 59:929-931.
- [20] HALPIN C, HOLT K, CHOJECKI J, et al. Brown-midrib maize (bml) -a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene[J]. Plant J, 1998, 14(5):545.
- [21] ZELIHA J, TIJEN O, AHU A, et al. Reduced leaf peroxidase activity is associated with reduced lignin content in transgenic poplar[J]. Plant Biotech, 1999, 16(5):381-387.
- [22] HU W J, KAWAOKA A, TSAI C J, et al. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*) [J]. PNAS USA, 1998, 95:5407-5412.
- [23] 赵艳玲, 陆海, 陶霞娟, 等. GRP1.8 融合反义 4CL1 基因调控烟草木质素生物合成[J]. 北京林业大学学报, 2003, 25(4):16-20.
- [24] 贾彩红, 王宏芝, 杜克久, 等. 抑制 4CL 基因表达的转基因毛白杨中木质素含量与茎秆颜色的关系[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(6):621-624.
- [25] 张齐生. 中国竹的工业化利用[M]. 北京:中国林业出版社, 2001.
- [26] HIGUCHI T, NAKATSUBO F, HIGUCHI T. Acidolysis of bamboo lignin (I, II, III) [J]. Mokuzai Gakkaishi Journal of the Japan Wood Research Society, 1972, 18(4):183-189.
- [27] KURODA H, SHIMDA M, HIGUCHI T. Roles of bamboo O-methyltransferase in the lignin biosynthesis [J]. Wood Research Kyoto University, 1981, 67:17-28.
- [28] 徐有明, 郝培应, 刘清平. 竹材性质及其资源开发利用的研究进展[J]. 东北林业大学学报, 2003, 31(5):71-77.
- [29] ALAIN M BOUDET. Lignins and lignification: Selected issues [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2000, 38(1):81-96.
- [30] JOUANIN L, THOMAS G, CATHERINE L. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity [J]. Plant Physiol, 2000, 22(6):85-88.
- [31] BOLWELL G P, CRAMER C L. L-Phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris* characterization and differential induction of multiple from elicitor-treated cell suspension cultures [J]. European Journal of Biochemistry, 1985, 149:411.
- [32] BAUCHER M, MARIE A B, BRIGITTE C. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa and the effect on lignin composition and digestibility [J]. Plant Molecular Biology, 1999, 39:437-477.
- [33] HUNTLEY S K, ELLIS D, GILBERT M, et al. Significant increases in pulping efficiency in C4H-F5H transformed poplars: Improved chemical savings and reduced environmental toxins [J]. Agr Food Chem, 2003, 5(21):6178-6183.
- [34] 梁海泳, 夏秀英, 冯雪松. UGPase 和反义 4CL 基因对转基因烟草纤维素的木质素合成的调控 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(6):1067-1072.
- [35] ABBORTT J C. Simultaneous suppression of multiple genes by single Transgenes. Down-regulation of three unrelated lignin biosynthetic genes in tobacco [J]. Plant Physiol, 2002, 3(128):844.
- [36] SANTAREM E R, TRICK H N, ESSIG J S, et al. Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression [J]. Plant Cell Rep, 1998, 17:752-759.
- [37] 蒋身学. 竹材工业化利用研究与开发 [J]. 林业科技开发, 2002, 16(3):5-6.
- [38] 江泽慧. 世界竹藤 [M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社, 2002.