

真菌发光途径的研究与应用进展

吴予杰^{1#}, 许嘉锐^{1#}, 陈泓雨¹, 都浩^{1,2*}

1 浙江大学农业与生物技术学院 现代种业研究所, 浙江 杭州 310058

2 浙江大学杭州国际科创中心, 浙江 杭州 311215

吴予杰, 许嘉锐, 陈泓雨, 都浩. 真菌发光途径的研究与应用进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(1): 1-14.

WU Yujie, XU Jiarui, CHEN Hongyu, DU Hao. Fungal luminescence pathways: research and applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(1): 1-14.

摘要: 真菌发光途径(fungal bioluminescence pathway, FBP)是一种来源于真菌的生物发光代谢途径。其能够利用FBP途径基因簇表达的蛋白,以咖啡酸为底物,合成真菌荧光素,在真菌荧光素酶的催化下,生成不稳定高能小分子,之后分子能量衰减释放出波长约为520 nm的绿色荧光。在发光真菌中,真菌发光途径基因在进化上非常保守。与其他生物发光系统不同的是,真菌发光途径适合于真核生物,特别是植物中的工程化应用。目前,经过代谢路径优化的发光植物可以持续发出肉眼可见光,照亮周围环境。该发光系统在生物检测、生物传感器、发光园艺植物培育和绿色照明等领域具有广阔的应用前景。

关键词: 真菌发光系统; 植物; 咖啡酸; 代谢路径; 基因工程

Fungal luminescence pathways: research and applications

WU Yujie^{1#}, XU Jiarui^{1#}, CHEN Hongyu¹, DU Hao^{1,2*}

1 Modern Seed Industry Research Institute, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

2 ZJU-Hangzhou Global Scientific and Technological Innovation Center, Zhejiang University, Hangzhou 311215, Zhejiang, China

Abstract: The fungal bioluminescence pathway (FBP) is a metabolic pathway responsible for the generation of bioluminescence derived from fungi. This pathway utilizes caffeic acid as the substrate, generating a high-energy intermediate, and the decomposition of which yields green

资助项目: 海南省科技计划三亚崖州湾科技城联合项目(320LH031); 浙江大学大学生科研训练计划项目(SRTP, X2022167)
This work was supported by the Hainan Provincial Joint Project of Sanya Yazhou Bay Science and Technology City (320LH031) and the Student Research Training Program of Zhejiang University (SRTP, X2022167).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: du_hao@zju.edu.cn

Received: 2023-05-21; Accepted: 2023-07-03

fluorescence with a wavelength of approximately 520 nm. The FBP is evolutionally conserved in luminescent fungal groups. Unlike other bioluminescent systems, the FBP is particularly suitable for engineering applications in eukaryotic organisms, especially in plants. Currently, metabolically engineered luminescent plants are able to emit visible light to illuminate its surroundings, which can be visualized clearly in the dark. The fungal bioluminescent system could be explored in various applications in molecular biology, biosensors and glowing ornamental plants, and even green lighting along city streets.

Keywords: fungal bioluminescence pathway; plant; caffeic acid; metabolic pathway; genetic engineering

生物发光是自然界中广泛存在的生物学现象。截至 2010 年, 有 800 个属约 10 000 个物种被认为具有生物发光能力^[1]。科学家们从发光生物中发现了相关蛋白和对应编码基因, 并正在或已将其工具化。如细菌来源的 lux 操纵子^[2-3]被用作报告基因等^[4]、海洋生物来源的荧光素腔肠素(coelenterazine)^[5]已被开发用作生物发光共振能量转移系统^[6]、萤火虫来源的发光底物 D-荧光素(D-luciferin)和萤火虫荧光素酶基因(firefly luciferase, *luc*)可指示癌细胞转移^[7]。这些不同的生物发光系统被应用于各种场景。但在工程化应用过程中, 这些生物发光系统存在使用依赖于昂贵的仪器设备、难以做到高通量活体检测^[8]、经常性补充昂贵的外源发光底物^[9]、具有相对较高的细胞毒性^[10-12]等问题, 这极大地限制了生物发光的更广泛应用。

近年来新发现了真菌来源的生物发光途径。真菌发光途径(fungal bioluminescence pathway, FBP)是一种以咖啡酸(caffeic acid)为底物, 最终能够产生波长约为 520 nm 绿色荧光的生物发光途径。通过对光茸菌(*Neonothopanus nambi*)等发光真菌的研究, FBP 相关基因很快被发现, 并于 2018 年实现了全代谢路径的解析^[13]。FBP 途径基因常聚集成基因簇, 在发光真菌类群中具有显著的同源性, 被认为起源于一次进化事件^[13-14]。在植物中, FBP 途径能以植物中常见的代谢物咖

啡酸为原料合成发光底物, 无需添加外源底物。而且 FBP 途径中的各代谢产物对高等植物宿主的不利影响较小^[13,15-17]。这在很大程度上克服了上述其他生物发光系统的局限性。但 FBP 途径也存在发光强度弱、发光调控困难等缺点^[15]。代谢途径改造等方法被认为是一种提高生物发光强度的有效路径。经过代谢途径优化和关键酶改良等手段, 目前已创制出亮度增强的发光植物, 可以照亮周围环境, 使肉眼能够清晰分辨文字^[18]。未来, 新型生物发光系统 FBP 在生物传感器、生物大分子检测工具和发光园艺植物育种等领域存在很好的应用前景。

1 真菌发光途径的研究

1.1 FBP 途径基因的解析

2012 年已报道了 71 种发光真菌, 它们分属于 4 个亲缘性较远的群系^[19]。然而, 对于这一现象的生物学机制研究一直进展缓慢。20 世纪 50 年代中期, R. Airth 和 W. McElroy 从蜜环菌(*Amillaria mellea*)中, 利用冷热水提取法分别分离得到荧光素和荧光素酶^[20]。这一发现明确了真菌发光需要还原性物质等条件, 并提出了 FBP 途径的简单模型^[21-23]。该模型认为真菌的生物发光经历两步过程。在第一步中, 荧光素前体被 NAD(P)H 依赖的酶还原为真菌荧光素。在第二步中, 真菌荧光素在真菌荧光素酶催化下被氧气

氧化,产生可见光。

随着真菌荧光素 3-羟基牛奶树碱(3-hydroxyhispidin)和相关酶被鉴定,FBP 途径的 4 步反应很快被全面阐明,并开始得到应用。FBP 途径需要以下 4 种酶:牛奶树碱合酶(hispidin synthase, HispS)、牛奶树碱-3-羟化酶(hispidin-3-hydroxylase, H3H)、荧光素酶(luciferase, Luz)和咖啡丙酮酸水解酶(caffey pyruvate hydrolase, CPH)(图 1)。牛奶树碱(hispidin)是一种存在于真菌和植物次生代谢产物中的小型聚酮^[24]。在 H3H 的催化下,牛奶树碱发生羟基化反应,生成 3-羟基牛奶树碱。这一步反应需要消耗 NAD(P)H 和氧气。3-羟基牛奶树碱即是 FBP 生物发光底物——真菌荧光素(fungal luciferin)。与先前提出的模型不同,3-羟基牛奶树碱的化学组成表明,该步反应需要氧气参与^[25]。H3H 为含有 FAD 的 NAD(P)H 依赖性的单加氧酶。有研究认为,H3H 可能具有严格的底物特异性^[26-27]。在 Luz 的催化下,氧气会将真菌荧光素氧化,并形成处于单线电子激发态的高能中间体,释放出 520 nm 的绿色荧光和 CO₂,然后转化为咖啡丙酮酸^[13]。Luz 对特定的荧光素类似物也有催化活性。尽管发光强度很低,含有其他取代基的 3-羟基- α -吡喃酮环也能产生不同波长的荧光^[28]。CPH 含有高度保守的富马乙酰乙酸水解酶(fumarylacetoacetate hydrolase, FAH)结构域,属于 FAH 超家族^[29-30]。咖啡丙酮酸在 CPH 的催化下水解形成丙酮酸和咖啡酸。咖啡酸可被回收,作为新一轮 FBP 的底物继续参与循环。在植物中,丙酮酸可通过莽草酸途径和苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)和对香豆酰辅酶 A 3-羟化酶(p-coumaroyl-CoA 3-hydroxylase, C3H)系列酶催化形成咖啡酸^[17]。咖啡酸在 HispS 的催化下,消

耗 ATP,缩合两分子量的丙二酰辅酶 A,依次形成咖啡酰辅酶 A、咖啡丙酮酰辅酶 A 得到牛奶树碱^[25]。HispS 的结构复杂,根据 Alphafold2.0 的预测,其由 AMP 结合结构域、酰基载体蛋白结构域、酮合酶、酰基转移酶和另一个 C 端酰基载体蛋白结构域构成^[31]。值得注意的是,一些非发光真菌同样可以产生 HispS,并能在酵母体系中表达、产生荧光^[24]。

尽管 FBP 途径中 4 个关键酶的蛋白结构尚未被揭示,但基于理论模拟可描述 FBP 途径的具体反应细节和机制,展示出更为细致的生物化学反应过程及其分子和电子状态水平^[26,32]。这为进一步改造相关蛋白和工程化利用提供可能。值得注意的是,彼此间亲缘关系不同的发光真菌通常基于同一种生物发光机制^[14,19,25,27,33],因此不同种属的真菌荧光素、荧光素酶间混合也能够产生荧光^[34]。不同真菌的酶的生物化学特性存在细微差别。例如,与 *N. nambi* 不同,荧光小菇(*Mycena chlorophos*)来源的 H3H 对 NADH 有特殊的偏好性^[27]。

从代谢途径中可以发现,FBP 途径以咖啡酸起始,并最终生成咖啡酸。其过程产物对真核生物无明显毒害作用,循环中仅消耗丙二酰辅酶 A 和 NAD(P)H。这意味着 FBP 具有创造无需外源补充底物的、真正“自发光”植物的能力。但是,FBP 发光强度较弱,严重阻碍了其进一步发展和应用^[17,35-36]。通过农杆菌转化导入 *CPH* 基因^[33]或加入外源咖啡酸^[36]等措施可显著增强 FBP 途径的发光强度。这表明植物体内的咖啡酸含量是影响植物发光强度的关键性因素。提高 FBP 途径相关酶活力、提高底物浓度、优化相关代谢通路等是改造 FBP 途径、提高发光强度、扩展适用领域的主要思路。

构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)来源的 *NPGA* 基因可表达一类提高聚酮化合物合成酶

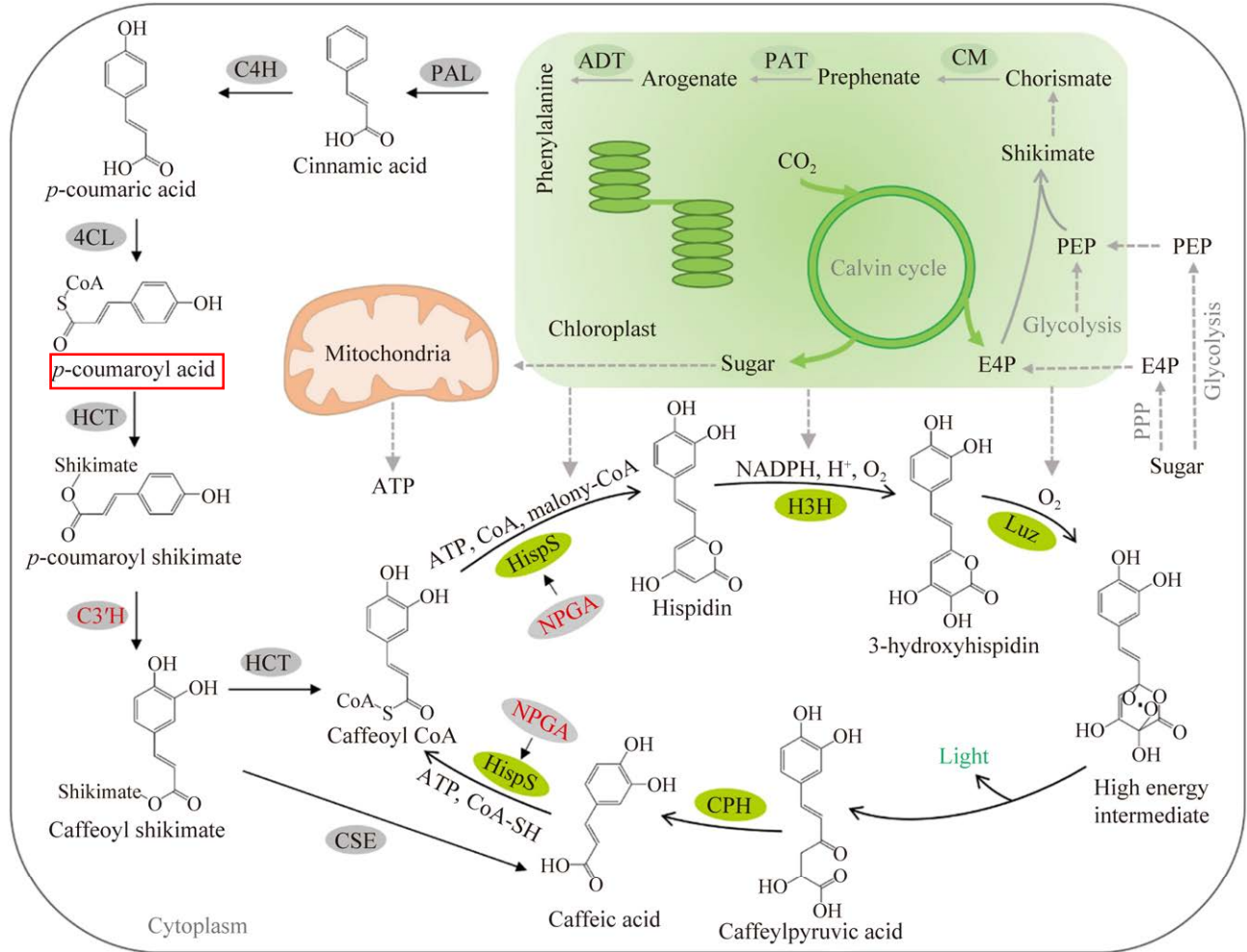


图 1 FBP 途径及其与植物代谢的偶合^[18]

Figure 1 Integration of the FBP into plant metabolic pathways^[18].

家族 HispS 的活性的 4-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶^[37]。研究证明, 将 *NPGA* 与 *HispS* 基因一起导入烟草(*Nicotiana tabacum*), 可以将牛奶树碱合成速率提高 3 倍^[17-18,33]。FAD 是 *N. nambi* 来源的 H3H 的辅因子, 其存在可以将酶的活性提高若干数量级^[38]。作为直接催化生物发光反应的酶, 荧光素酶的特性对进一步改造 FBP 具有重要意义。利用不同的具有 3-羟基- α -吡喃酮环的 3-羟基牛奶树碱类似物作为底物参与反应, 可以得到不同波长的生物发光^[27]。这一特点或能极大地提高 FBP 在合成生物学应用的适用性。

但是荧光素酶对 30 °C 以上的高温不耐受^[33,39], 这在一定程度上阻碍了 FBP 生物发光在生活场景中的应用^[35]。而冷刺激和紫外线却对发光强度有提高作用^[18]。对荧光素 *Luz* 进行针对特定环境条件的改造可以有效提高实际应用场景下的发光可靠性。

1.2 FBP 途径基因的进化分析

在发光真菌, 如 *N. nambi* 中, *Luz*、*H3H* 和 *HispS* 共同构成一保守基因簇。在少数发光真菌物种, 如 *Mycena*、*Omphalotus* 属的一些真菌中, 基因簇容纳 1 个或 2 个额外的基因。其中一个基

因属于细胞色素 P450 家族, 另一个基因属于富马乙酰乙酸水解酶家族, 即 *CPH*^[13]。与萤火虫 D-荧光素系统、细菌 LUX 系统等其他生物发光系统不同, 真菌生物发光 FBP 途径诞生于一次起源。根据 *Luz*, *H3H* 和 *HispS* 基因的系统发育树和 Agaricales 目物种树^[40], 当前已知的发光真菌的共同祖先是在约 1.6 亿年前由 Agaricales 目的 mycenoid 和 marasmiod 分支进化而来的。FBP 途径中的基因在各发光真菌物种间都是同源的^[28]。*Luz* 来源于某个 Agaricales 基部的基因复制且最先发生, 而 *H3H* 和 *HispS* 基因的复制则在近百万年后发生。发育树中许多能编码含有酮还原酶和脱水酶结构域的 *HispS* 的物种并不表现出生物发光, 这可能意味着 *HispS* 结构域的丢失是发光生物诞生的最后一步^[13-14]。发光真菌系统内还存在着 FBP 途径基因簇内基因复制、基因簇周边基因同源性较低等特殊现象, 系统内的进化过程细节还有待进一步探索^[14]。

长期以来, 真菌生物发光的生态学意义一直不甚明晰。有观点认为真菌生物发光可以吸引昆虫。椰子花蘑菇(*Neonothopanus gardneri*)的生物发光现象具有昼夜节律, 其夜间发光的特性被认为与吸引昆虫帮助传播孢子有关。一项在巴西雨季森林中的研究显示, 使用人造材料模拟的 *N. gardneri* 子实体能够吸引某些双翅目和鞘翅目昆虫来访^[41]。而在树冠层茂盛的林下缺乏风力^[42], 节肢动物因而成为了真菌孢子的传播媒介之一^[43]。但同时也有观点认为, 真菌生物发光现象与吸引昆虫无关。在开阔地生长的 *Mycena*、*Omphalotus* 属的部分发光真菌对昆虫没有特别的吸引力。与前一个观点相反, 这些真菌的孢子似乎更适合通过风力来传播^[44]。还有观点认为, 生物发光是其他代谢途径的副产品, 因为并不是所有的真菌发光现象都具有明显的昼夜节律^[19]。FBP 基因簇相关进化细节有待进一

步研究, 真菌生物发光的生物学意义尚未形成统一的观点, 而基于 FBP 途径基因创制的发光植物已经取得了一定的发展。

2 发光植物的创制

2.1 发光植物的研发

早在 1986 年, 利用生物发光相关基因研发发光植物的早期探索已经取得进展^[45]。研究人员尝试将含萤火虫荧光素酶和强启动子的质粒经叶盘转化法导入烟草植株, 得到了依赖外源供给底物的发光植株。然而这种植株的发光强度很低, 需要曝光 15–60 min 才能在 X 光胶片上呈现信号。而且, 发光依赖于昂贵的特殊底物。这些不足使得萤火虫荧光素酶的发光系统的应用局限于基础研究领域。通过引入纳米装载技术处理萤火虫荧光素酶, 研究人员在 2017 年创制了一种发光强度相当于 1 μW 市售二极管一半的发光植物; 纳米装载技术和处理降低了荧光素与荧光素酶对植物的毒害、延长了发光持续时间, 并且能够控制纳米颗粒在特定细胞器的转运和定位。但它仍然不能摆脱对外源荧光素底物的依赖^[9]。

咖啡酸既是 FBP 重要过程产物, 同样也是植物生长发育的必需物质^[46], 其在植物体中的含量丰富^[47]。研究人员在体外合成了 4 个密码子优化的关键基因: 构巢曲霉来源的 4-磷酸泛酰乙胺基转移酶基因 (4-phosphopantetheinyl transferase, *NPGA*)、*N. nambi* 来源的 *H3H* 和 *HispS*、*Luz*; 将上述基因与 *CPH* 体外组装后转入烟草, 即可得到稳定发光的植株, 而且不含有 *CPH* 基因的植株发光强度明显减弱; 这一现象表明, 咖啡酸含量与植物发光强度之间存在显著关联; 为了应对可能的咖啡酸水平变化, 研究人员还导入了荚膜红菌(*Rhodobacter capsulatus*)来源的酪氨酸解氨酶、2 个大肠杆菌(*Escherichia*

coli) 来源的 4-羟基苯乙酸-3-单加氧酶(4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase, HpaB, HpaC)以提高咖啡酸水平^[36]。另一组研究则是将经密码子优化的 *N. nambi* 来源的 *Luz*、*HispS*、*H3H* 和 *CPH* 基因导入烟草; 获得的发光植株的总体表型、叶绿素含量等指标与正常植株并无显著差异, 这表明 FBP 途径对植物体无毒害作用; 而其发光强度达到 10^{10} 光子/(min·cm²), 使用消费级相机仅需数分钟的曝光即可得到发光图像^[17]。

与其他生物发光途径不同的是, 只要选择合适的启动子和终止子, FBP 途径可以在很多植物中表达。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、长春花(*Catharanthus roseus*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、大丽花(*Dahlia pinnata*)和矮牵牛(*Petunia hybrida*)等植物中使用注射农杆菌的瞬时转化法均能观察到植株发光现象, 并且发光现象还可以在一些观赏植物的花中观察到。值得注意的是, 在花与植株分离后的 1 d 内, 被分离组织的发光强度就开始下降。这可能意味着源器官可能为 FBP 途径提供某些底物或辅因子。

咖啡酸在植物次生代谢物中属于苯丙素类, 苯丙素类由芳香族氨基酸, 如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸, 通过苯丙素途径合成^[48]。植物通过一般苯丙素途径(general phenylpropanoid pathway, GPP)向类黄酮途径、酚酸途径、木质素途径、二苯乙烯途径和香豆素途径等提供上游产物, 在次级代谢过程中具有关键作用。通常, 一般苯丙素途径利用莽草酸途径所合成的苯丙氨酸作为原料, 在苯丙氨酸解氨酶(PAL)作用下生成肉桂酸。肉桂酸在肉桂酸-4-羟化酶的作用下生成对香豆酸^[49]。这与植物体回补生成咖啡酸的代谢通路高度重合。对香豆酸、咖啡酸和咖啡酰辅酶 A 等作为代谢中间体被直接用于木质素、类黄酮等的生物合成途径。真菌来源的 FBP 途径与植物体中的 GPP 在代谢通路上的相关性,

使得通过分析植物代谢途径, 利用植物代谢工程思路, 改造植物代谢, 以提高系统发光强度成为可能。

2.2 发光植物亮度的提高

增强咖啡酸合成, 可直接提高植物发光亮度。研究人员在该方面做了多种努力。例如: 研究者导入了荚膜红菌来源的酪氨酸解氨酶、2 个大肠杆菌来源的 4-羟基苯乙酸-3-单加氧酶 *HpaB* 和 *HpaC*^[36]。这些酶可共同催化酪氨酸合成咖啡酸。研究者引入这些酶来提高植物体内咖啡酸含量, 观察到生物发光信号显著增强^[13]。

此外, 研究者在 FBP 途径中导入甘蓝型油菜(*Brassica napus*)来源的 *BnC3'H1* 基因和来自构巢曲霉的 *AnNPGA* 基因, 成功增强了植株发光亮度; 作为植物体内咖啡酸合成的关键酶, *BnC3'H1* 编码的 C3'H 酶催化对香豆酰莽草酸转化为咖啡酰莽草酸, 由此提高植物体内咖啡酸含量; 此前的实验证明, 将 *NPGA* 与 *HispS* 一同导入烟草或整合到毕赤酵母(*Pichia pastoris*)的基因组中, 可增强发光强度^[13,16]。研究者通过试验证明, 将 *NPGA* 与 *HispS* 一同导入烟草, 可使 *HispS* 催化咖啡酸合成牛奶树碱合成速率提高 3 倍, 进而提高了植物发光强度(图 1)^[18]。

咖啡酸及其在 FBP 途径中的上下游代谢物作为代谢中间体, 可被直接用于类黄酮、木质素等物质的生物合成途径。通过抑制这些途径, 可提高咖啡酸在植株体内的积累, 进而提高植物发光亮度。

在类黄酮合成途径中, 苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶(PAL)作用下生成肉桂酸, 肉桂酸在肉桂酸-4-羟化酶(C4H)的作用下生成对香豆酸^[49]。对香豆酸在被 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4-coumarate: CoA ligase, 4CL)转化为对香豆酰辅酶 A 后, 进入类黄酮合成途径^[50-51]。随后, 对香豆酰辅酶 A 可在查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)、查

尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)的作用下形成黄烷酮^[52-53];或在查尔酮合成酶(CHS)、查尔酮还原酶(chalcone reductase, CHR)和查尔酮异构酶(CHI)作用下形成甘草素^[54],两者进一步合成各种类黄酮物质。

在木质素合成途径中,植物在生成对香豆酸后,通过两条途径合成咖啡酸:一是在 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)的作用下形成对香豆酰辅酶 A,再被羟基肉桂酰辅酶 A-莽草酸/奎尼酸羟基肉桂酰转化酶(hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyl transferase, HCT)转化为对香豆酰莽草酸,通过对香豆酰辅酶 A 3-羟化酶(C3H)的作用转化为咖啡酸莽草酸,最后被咖啡酰莽草酸酯酶(caffeoyl shikimate esterase, CSE)转化为咖啡酸^[55-56]。二是被对香豆酰辅酶 A 3-羟化酶(C3H)或肉桂酸-羟化酶(C4H)直接转化为咖啡酸^[57-59]。咖啡酸在木质素的合成通路中,被 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)转化为咖啡酰辅酶 A,通过咖啡酰辅酶 A-邻-甲基转移酶(caffeoyl-CoA O-ethyltransferase, CCoAOMT)的甲基化作用形成阿魏酰辅酶 A,再被肉桂酰辅酶 A 还原酶(cinnamoyl CoA reductase, CCR)转化为松柏醛^[60-64]。随后,松柏醛在肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)的催化下形成松柏醇,松柏醇由过氧化物酶和漆酶介导聚合形成愈创木基木质素,即 G 木质素^[65]。松柏醇可在阿魏酸-5-羟化酶(ferulate 5-hydroxylase, F5H)、咖啡酸邻位甲基转化酶(caffeic acid O-methyltransferase, COMT)的介导下形成芥子醇^[66]。松柏醛也可在阿魏酸-5-羟化酶(F5H)、咖啡酸邻位甲基转化酶(alpha hydroxy acid, COMT)、肉桂醇脱氢酶(CAD)和芥子醇脱氢酶(sinapyl alcohol dehydrogenase, SAD)介导下最终形成芥子醇,芥子醇由过氧化物酶和漆

酶介导聚合为紫丁香基木质素,即 S 木质素^[65]。

通过对 FBP 途径中关键酶的改造,同样可实现提高植物发光亮度的目的。酶的定向进化通过基因的改造,模拟自然进化机制,可改造并定向选择所需的突变酶,这为酶的改造提供了一种思路。作为一种常见的生物发光酶,荧光素酶被广泛应用于生物领域,在生物标记等方面具有重大作用。有研究团队通过引入基于深度学习的“family-wide hallucination”方法,增强了计算机设计酶的灵活性,并成功设计了具有底物特异催化性的荧光素酶^[67]。此外,有研究团队通过酶的定向进化技术,获得工程化细胞色素 P450,并以此来催化立体选择性原子转移自由基环化反应,为该类反应提供了新的解决方案^[68]。由于咖啡酸合成途径中对香豆酰辅酶 A 3-羟化酶(C3H)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H)均属于细胞色素 P450 单加氧酶家族,该研究对咖啡酸合成途径中关键酶的改造具有一定借鉴意义。基于上述酶定向进化技术,结合咖啡酸合成途径中的关键酶,如咖啡酰莽草酸酯酶和对香豆酰辅酶 A3-羟化酶,或能为 FBP 途径的改造提供启示。

咖啡酰莽草酸酯酶(CSE)于 2013 年被发现,其在拟南芥和苜蓿(*Medicago sativa*)中的功能为选择性水解咖啡酰莽草酸为咖啡酸^[56],与咖啡酸的合成直接关联。实验证明,其对于咖啡酰莽草酸以及其相似底物对香豆酰莽草酸均具有催化作用,但对咖啡酰莽草酸表现出更强的亲和性,是对香豆酰莽草酸的 31 倍。这为植物更偏好于由对香豆酸合成咖啡酰莽草酸,再转化为咖啡酸提供了依据^[55]。对香豆酰辅酶 A3-羟化酶(C3H)是细胞色素 P450 单加氧酶家族的一种,属于 CYP98 亚族,部分家族成员参与木质素合成途径。C3H 可介导木质素合成中

的多个反应,包括咖啡酰莽草酸的合成,以及对香豆酸直接合成咖啡酸。值得注意的是,C3H 优先将对香豆酰莽草酸转化为咖啡酰莽草酸,而不是优先选择对香豆酸作为底物,同样证明植物优先选择将对香豆酸转化为咖啡酰莽草酸,进而合成咖啡酸^[56-58]。4-香豆酸辅酶 A 连接酶属于腺苷酸合成酶家族,催化一般苯丙素类化合物途径中 3 个共有步骤的最后一个步骤,在苯丙素类合成中起到重要的调控作用。4CL 存在多种异构体形式,由小基因家族编码,在双子叶植物和单子叶植物中分别分化为 2 个类型:双子叶植物中 I 型与 II 型、单子叶植物中的 III 型与 IV 型。I 型和 III 型主要参与木质素单体的合成,II 型与 IV 型主要参与其他苯丙素类的合成。如在拟南芥中, *At4CL1*、*At4CL2* 和 *At4CL4* 属于 I 型,而 *At4CL3* 属于 II 型^[69]。

4CL 在植物中普遍存在表达部位特异性和底物特异性。对白杨(*Populus tremuloides*)的 4CL 基因家族的分析发现, *Pt4CL1* 基因在含木质素的组织如木质部中特异性表达,而 *Pt4CL2* 在茎和叶的表皮层中表达^[70]。在毛果杨和美洲黑杨的杂交种(*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*)中, *4CL1* 在老叶、绿色茎和木质部中表达,而 *4CL2* 在幼叶中表达^[71]。在刺槐(*Robinia pseudoacacia*)木质部提取的 4CL 则表现出了对底物选择的特异性, *Rp4CL1* 倾向于利用对香豆酸作为底物,但不能利用阿魏酸和芥子酸,而 *Rp4CL2* 和 *Rp4CL3* 则倾向于利用芥子酸,并且还对咖啡酸盐和对香豆酸盐具有高活性^[72]。根据不同植物中多样的 4CL 酶的表达部位和特异性底物,可以引入外源的 4CL 或激活、抑制内源的不同 4CL,促进咖啡酸的合成。一般苯丙素途径的重要调节方式是转录调节^[61]。转录因子 MYB4 是苯丙素途径的重要调节因子,调控 4CL

的表达。在烟草中过表达 *AtMYB4* 降低了 *C4H*、*4CL1* 和 *CAD* 基因的基础转录水平,而 *AtMYB4* 突变体拟南芥表现出比野生型更强的 UV-B 耐受性^[73]。但 MYB4 转录因子主要功能为负调节紫外线保护物质的合成,与咖啡酸合成存在一定的偏差。

3 FBP 新型发光系统应用展望

最近一种发光增强型植物新品种研制成功。通过转入甘蓝型油菜来源的 *BnC3'H1* 基因和构巢曲霉来源的 *AnNPGA* 基因,该新品种的发光强度显著提升(图 2),其发光强度达到 3×10^{11} 光量子/(min·cm²)。而且该品种植株的发光具有较强的稳定性和持续性,从植株上分离的叶片可以继续发光 3 d 左右。而且,FBP 与植物能量代谢途径间的关系进一步被揭示。光合产物(如糖)是植物能量和机体组成的主要来源,生物发光也需要植物供给能量。光合作用和呼吸作用产生 FBP 途径所需的所有底物和辅因子,包括 CoA、丙二酰辅酶 A、NAD(P)H、FADH-2、ATP 和氧气等。这些物质均能被植物大量合成,为发光提供充足的底物和能量。基于动植物 FBP 系统的进一步应用需要系统地考虑影响耦合 FBP 系统的不同因素(图 1)^[18]。目前已有许多研究证明,酶定向进化可以改变蛋白酶的很多特性,在提高酶的热稳定性方面很有帮助, Yu 等^[74]在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中进行了两轮易错聚合酶链式反应以及两轮 DNA 改组,使得在毕赤酵母中表达的脂肪酶的热稳定性大大提高,酶的溶解温度提高了 22 °C,在 60 °C 和 65 °C 时的半衰期分别延长了 46 倍和 23 倍。Ohta 等^[75]通过随机诱变与饱和诱变提高了 β 果糖呋喃糖苷酶的热稳定性,稳定性最高的突变体,60 °C 的半衰期为野生型的 16.5 倍。可以预见,酶定向进化应用



图 2 发光显著增强的自发光植物

Figure 2 Autoluminescent plants with significantly enhanced luminescence.

于荧光素酶的改造,有望解决荧光素酶高温不耐受的问题。这些观点为进一步提高发光植物的发光强度提供启发和新思路。

增强型发光系统可以用于生物学工具开发,具有广泛的应用前景。与萤火虫荧光素酶基因相似,FBP 途径也可以用于动植物基础生物大分子检测工具的开发。由于发光底物分子量小,对真核生物几乎无毒副作用,整体代谢过程简单,不需要添加外源底物,且无需大型仪器检测发光,FBP 途径可以有效降低检测成本、简化检测程序。而且 FBP 途径释放的波长 520 nm 的绿光被植物组织中的叶绿素吸收的量较少^[28],尤其适用于绿色植物。FBP 途径与其他生物发光途径

(如萤火虫生物发光途径)具有较好的兼容性。在同一生物体中,FBP 与其他发光系统在代谢上互不干扰,在光谱上可以相互区识别^[76]。值得一提的是,该发光系统检测不损伤植物体,可实现在植物生长全周期中连续检测和高通量的活体检测^[35,77]。该发光系统也可以被用于高灵敏性生物传感器的开发^[78]。新型检测技术还将助力动植物基础研究推进和大健康产业发展。

在进一步提高发光强度的基础上,基于 FBP 的发光增强型植物新品种可以作为低亮度生物照明工具,应用于城市规划等领域^[35]。生物发光植物在日间进行光合作用,吸收 CO₂,将太阳能固定于有机物中;夜间通过异化作用释放光

能,可用于低亮度照明。根据计算,要使植物自发光的光照强度达到普通照明路灯水平,仅需一株树冠面积 30 m²植物的净光合能量的 0.3%^[79]。另外,有研究者在巴西的天然可可发酵箱中分离鉴定到发光真菌 *N. nambi*,该研究认为,*N. nambi*可能为与巧克力风味形成密切相关的可可发酵环节提供了淀粉酶^[80]。这暗示了 FBP 途径对人的潜在安全风险较低,在发光植物育种领域具有广阔的应用前景。这是一种全新的生物能源转化和利用模式,有利于助力“双碳”目标。可以预见,发光植物将为未来社会提供全新生物能源转化和利用模式,为花卉、树木的生物育种提供新思路,为降低能源资源消耗和碳排放提供新策略。

REFERENCES

- [1] HADDOCK SHD, MOLINE MA, CASE JF. Bioluminescence in the sea[J]. Annual Review of Marine Science, 2010, 2: 443-493.
- [2] MEIGHEN EA. Molecular biology of bacterial bioluminescence[J]. Microbiological Reviews, 1991, 55(1): 123-142.
- [3] BRODL E, WINKLER A, MACHEROUX P. Molecular mechanisms of bacterial bioluminescence[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2018, 16: 551-564.
- [4] FLEISS A, SARKISYAN KS. A brief review of bioluminescent systems (2019)[J]. Current Genetics, 2019, 65(4): 877-882.
- [5] MARKOVA SV, LARIONOVA MD, VYSOTSKI ES. Shining light on the secreted luciferases of marine copepods: current knowledge and applications[J]. Photochemistry and Photobiology, 2019, 95(3): 705-721.
- [6] MASSOUD TF, PAULMURUGAN R, de A, RAY P, GAMBHIR SS. Reporter gene imaging of protein-protein interactions in living subjects[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2007, 18(1): 31-37.
- [7] JENKINS DE, YU SF, HORNIG YS, PURCHIO T, CONTAG PR. *In vivo* monitoring of tumor relapse and metastasis using bioluminescent PC-3M-luc-C6 cells in murine models of human prostate cancer[J]. Clinical & Experimental Metastasis, 2003, 20(8): 745-756.
- [8] CONTAG CH, BACHMANN MH. Advances in *in vivo* bioluminescence imaging of gene expression[J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2002, 4: 235-260.
- [9] KWAK SY, GIRALDO JP, WONG MH, KOMAN VB, LEW TTS, ELL J, WEIDMAN MC, SINCLAIR RM, LANDRY MP, TISDALE WA, STRANO MS. A nanobionic light-emitting plant[J]. Nano Letters, 2017, 17(12): 7951-7961.
- [10] HOLLIS RP, LAGIDO C, PETTITT J, PORTER AJR, KILLHAM K, PATON GI, GLOVER LA. Toxicity of the bacterial luciferase substrate, n-decyl aldehyde, to *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans*[J]. FEBS Letters, 2001, 506(2): 140-142.
- [11] JIANG TY, DU LP, LI MY. Lighting up bioluminescence with coelenterazine: strategies and applications[J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2016, 15(4): 466-480.
- [12] LOVE AC, PRESCHER JA. Seeing (and using) the light: recent developments in bioluminescence technology[J]. Cell Chemical Biology, 2020, 27(8): 904-920.
- [13] KOTLOBAY AA, SARKISYAN KS, MOKRUSHINA YA, MARCET-HOUBEN M, SEREBROVSKAYA EO, MARKINA NM, SOMERMEYERLG, GOROKHOVATSKY AY, VVEDENSKY A, PURTOV KV, PETUSHKOV VN, RODIONOVA NS, CHEPURNYH TV, FAKHRANUROVA LI, GUGLYA EB, ZIGANSHIN R, TSARKOVA AS, KASKOVA ZM, SHENDER V, ABAKUMOV M, et al. Genetically encodable bioluminescent system from fungi[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(50): 12728-12732.
- [14] KE HM, LEE HH, LIN CY I, LIU YC, LU MR, HSIEH JW A, CHANG CC, WU PH, LU MJ, LI JY, SHANG G, LU RJH, NAGY LG, CHEN PY, KAO HW, TSAI IJ. *Mycena* genomes resolve the evolution of fungal bioluminescence[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(49): 31267-31277.
- [15] KE H-M, TSAI IJ. Understanding and using fungal bioluminescence-Rrecent progress and future perspectives[J]. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 2022, 33: 100570.
- [16] KHAKHAR A, LEYDON AR, LEMMEX AC, KLAVINS E, NEMHAUSER JL. Synthetic hormone-responsive transcription factors can monitor and re-program plant development[J]. eLife, 2018, 7: 34702.

- [17] MITIOUCHKINA T, MISHIN AS, SOMERMEYER LG, MARKINA NM, CHEPURNYH TV, GUGLYA EB, KARATAEVA TA, PALKINA KA, SHAKHOVA ES, FAKHRANUROVA LI, CHEKOVA SV, TSARKOVA AS, GOLUBEV YV, NEGREBETSKY VV, DOLGUSHIN SA, SHALAEV PV, SHLYKOV D, MELNIK OA, SHIPUNOVA VO, DEYEV SM, et al. Plants with genetically encoded autoluminescence[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(8): 944-946.
- [18] ZHENG P, GE JY, JI JY, ZHONG JL, CHEN HY, LUO DR, LI W, BI B, MA YJ, TONG WH, HAN LQ, MA SQ, ZHANG YQ, WU JP, ZHAO YQ, PAN RH, FAN PX, LU MZ, DU H. Metabolic engineering and mechanical investigation of enhanced plant autoluminescence[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023: PBI-225.
- [19] OLIVEIRA AG, DESJARDIN DE, PERRY BA, STEVANI CV. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages[J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2012, 11(5): 848-852.
- [20] AIRTH RL, MCELROY WD. Light emission from extracts of luminous fungi[J]. *Journal of Bacteriology*, 1959, 77(2): 249-250.
- [21] AIRTH R. Characteristics of cell-free fungal bioluminescence[J]. *Light and Life*, 1961: 262.
- [22] AIRTH RL, FOERSTER GE. Enzymes associated with bioluminescence in *panus stypticus luminescens* and *panus stypticus non-luminescens*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1964, 88(5): 1372-1379.
- [23] OLIVEIRA AG, STEVANI CV. The enzymatic nature of fungal bioluminescence[J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2009, 8(10): 1416-1421.
- [24] PALKINA KA, BALAKIREVA AV, BELOZEROVA OA, CHEPURNYKH TV, MARKINA NM, KOVALCHUK SI, TSARKOVA AS, MISHIN AS, YAMPOLSKY IV, SARKISYAN KS. Domain truncation in hispidin synthase orthologs from non-bioluminescent fungi does not lead to hispidin biosynthesis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(2): 1317.
- [25] PURTOV KV, PETUSHKOV VN, BARANOV MS, MINEEV KS, RODIONOVA NS, KASKOVA ZM, TSARKOVA AS, PETUNIN AI, BONDAR VS, RODICHEVA EK, MEDVEDEVA SE, OBA Y, OBA Y, ARSENIIEV AS, LUKYANOV S, GITELSON JI, YAMPOLSKY IV. The chemical basis of fungal bioluminescence[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(28): 8124-8128.
- [26] LIU XY, WANG MY, LIU YJ. Chemistry in fungal bioluminescence: theoretical studies on biosynthesis of luciferin from caffeic acid and regeneration of caffeic acid from oxidized luciferin[J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(3): 369.
- [27] TONG Y, TRAJKOVIC M, SAVINO S, van BERKEL WJH, FRAAIJE MW. Substrate binding tunes the reactivity of hispidin 3-hydroxylase, a flavoprotein monooxygenase involved in fungal bioluminescence[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(47): 16013-16022.
- [28] KASKOVA ZM, DÖRR FA, PETUSHKOV VN, PURTOV KV, TSARKOVA AS, RODIONOVA NS, MINEEV KS, GUGLYA EB, KOTLOBAY A, BALEEVA NS, BARANOV MS, ARSENIIEV AS, GITELSON JI, LUKYANOV S, SUZUKI Y, KANIE S, PINTO E, DI MASCIO P, WALDENMAIER HE, PEREIRA TA, et al. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence[J]. *Science Advances*, 2017, 3(4): e1602847.
- [29] BROUNS SJJ, BARENDS TRM, WORM P, AKERBOOM J, TURNBULL AP, SALMON L, van der OOST J. Structural insight into substrate binding and catalysis of a novel 2-keto-3-deoxy-D-arabinonate dehydratase illustrates common mechanistic features of the FAH superfamily[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 379(2): 357-371.
- [30] PIRCHER H, STRAGANZ GD, EHEHALT D, MORROW G, TANGUAY RM, JANSEN-DÜRR P. Identification of human fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 1 (FAHD1) as a novel mitochondrial acylpyruvase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(42): 36500-36508.
- [31] CRAMER P. AlphaFold2 and the future of structural biology[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2021, 28(9): 704-705.
- [32] WANGMY, LIU YJ. Chemistry in fungal bioluminescence: a theoretical study from luciferin to light emission[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2021, 86(2): 1874-1881.
- [33] KOTLOBAY AA, KASKOVA ZM, YAMPOLSKY IV. Palette of luciferases: natural biotools for new applications in biomedicine[J]. *Acta Naturae*, 2020, 12(2): 15-27.
- [34] STEVANI CV, OLIVEIRA AG, MENDES LF, VENTURA FF, WALDENMAIER HE, CARVALHO RP, PEREIRA TA. Current status of research on fungal

- bioluminescence: biochemistry and prospects for ecotoxicological application[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2013, 89(6): 1318-1326.
- [35] REUTER DN, STEWART CN JR, LENAGHAN SC. Lighting the way: advances in engineering autoluminescent plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2020, 25(12): 1176-1179.
- [36] KHAKHAR A, STARKER CG, CHAMNESS JC, LEE N, STOKKE S, WANG C, SWANSON R, RIZVI F, IMAIZUMI T, VOYTAS DF. Building customizable auto-luminescent luciferase-based reporters in plants[J]. *eLife*, 2020, 9: e52786.
- [37] LEE IK, YUN BS. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2011, 64(5): 349-359.
- [38] GERASIMOV AS, ROGOZHNIKIN SO, SHAKHOVA ES, CHEPURNYKH TV, GOROKHOVATSKY AY, MYSHKINA NM, BALAKIREVA AV, YAMPOLSKY IV. Recombinant production of hispidin-3-hydroxylase: the key enzyme in fungal luciferin biosynthesis[J]. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2021, 47(5): 1066-1076.
- [39] GOROKHOVATSKY AY, CHEPURNYKH TV, SHCHEGLOV AS, MOKRUSHINA YA, BARANOVA MN, GONCHARUK SA, PURTOV KV, PETUSHKOV VN, RODIONOVA NS, YAMPOLSKY IV. The recombinant luciferase of the fungus *Neonothopanus nambi*: obtaining and properties[J]. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2021, 496(1): 52-55.
- [40] YANG ZH. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1586-1591.
- [41] OLIVEIRA AG, STEVANI CV, WALDENMAIER HE, VIVIANI V, EMERSON JM, LOROS JJ, DUNLAP JC. Circadian control sheds light on fungal bioluminescence[J]. *Current Biology: CB*, 2015, 25(7): 964-968.
- [42] SHAW DC. Vertical organization of canopy biota[M]// *Forest Canopies*. Amsterdam: Elsevier, 2004: 73-101.
- [43] LILLESKOV EA, BRUNS TD. Spore dispersal of a resupinate ectomycorrhizal fungus, *Tomentella subtilacina*, via soil food webs[J]. *Mycologia*, 2005, 97(4): 762-769.
- [44] WEINSTEIN P, DELEAN S, WOOD T, AUSTIN AD. Bioluminescence in the ghost fungus *Omphalotus nidiformis* does not attract potential spore dispersing insects[J]. *IMA Fungus*, 2016, 7(2): 229-234.
- [45] OW DW, WOOD KV, DELUCA M, de WET JR, HELINSKI DR, HOWELL SH. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants[J]. *Science*, 1986, 234(4778): 856-859.
- [46] DENG YX, LU SF. Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2017, 36(4): 257-290.
- [47] KHAN F, BAMUNUARACHCHI NI, TABASSUM N, KIM YM. Caffeic acid and its derivatives: antimicrobial drugs toward microbial pathogens[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(10): 2979-3004.
- [48] ANAND A, JAYARAMAIAH RH, BEEDKAR SD, SINGH PA, JOSHI RS, MULANI FA, DHOLAKIA BB, PUNEKAR SA, GADE WN, THULASIRAM HV, GIRI AP. Comparative functional characterization of eugenol synthase from four different *Ocimum* species: implications on eugenol accumulation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2016, 1864(11): 1539-1547.
- [49] VOGT T. Phenylpropanoid biosynthesis[J]. *Molecular Plant*, 2010, 3(1): 2-20.
- [50] WILLIAMS JS, THOMAS M, CLARKE DJ. The gene *stilA* encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene antibiotic in *Photorhabdus luminescens* TT01[J]. *Microbiology*, 2005, 151(8): 2543-2550.
- [51] WOHL J, PETERSEN M. Functional expression and characterization of cinnamic acid 4-hydroxylase from the hornwort *Anthoceros agrestis* in *Physcomitrella patens*[J]. *Plant Cell Reports*, 2020, 39(5): 597-607.
- [52] DENG XB, BASHANDY H, AINASOJA M, KONTTURI J, PIETIÄINEN M, LAITINEN RAE, ALBERT VA, VALKONEN JPT, ELOMAA P, TEERI TH. Functional diversification of duplicated chalcone synthase genes in anthocyanin biosynthesis of *Gerbera hybrida*[J]. *New Phytologist*, 2014, 201(4): 1469-1483.
- [53] BURBULIS IE, WINKEL-SHIRLEY B. Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(22): 12929-12934.
- [54] BOMATI EK, AUSTIN MB, BOWMAN ME, DIXON RA, NOEL JP. Structural elucidation of chalcone reductase and implications for deoxychalcone biosynthesis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(34): 30496-30503.

- [55] VANHOLME R, CESARINO I, RATAJ K, XIAO YG, SUNDIN L, GOEMINNE G, KIM H, CROSS J, MORREEL K, ARAUJO P, WELSH L, HAUSTRAETE J, MCCLELLAN C, VANHOLME B, RALPH J, SIMPSON GG, HALPIN C, BOERJAN W. Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 2013, 341(6150): 1103-1106.
- [56] HA CM, ESCAMILLA-TREVINO L, YARCE JCS, KIM H, RALPH J, CHEN F, DIXON RA. An essential role of caffeoyl shikimate esterase in monolignol biosynthesis in *Medicago truncatula*[J]. *The Plant Journal*, 2016, 86(5): 363-375.
- [57] NAIR RB, XIA Q, KARTHA CJ, KURYLO E, HIRJI RN, DATLA R, SELVARAJ G. *Arabidopsis* CYP98A3 mediating aromatic 3-hydroxylation. Developmental regulation of the gene, and expression in yeast[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(1): 210-220.
- [58] GUO D, CHEN F, INOUE K, BLOUNT JW, DIXON RA. Downregulation 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[J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(1): 73-88.
- [59] FRANKE R, HUMPHREYS JM, HEMM MR, DENAULT JW, RUEGGER MO, CUSUMANO JC, CHAPPLE C. The *Arabidopsis* *REF8* gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism[J]. *The Plant Journal*, 2002, 30(1): 33-45.
- [60] HAHNBROCK K, SCHEEL D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1989, 40: 347-369.
- [61] DIXON RA, PAIVA NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism[J]. *The Plant Cell*, 1995, 7(7): 1085-1097.
- [62] EHLTING J, BÜTTNER D, WANG Q, DOUGLAS CJ, SOMSSICH IE, KOMBRINK E. Three 4-coumarate: coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms[J]. *The Plant Journal*, 1999, 19(1): 9-20.
- [63] YE ZH, KNEUSEL RE, MATERN U, VARNER JE. An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*[J]. *The Plant Cell*, 1994, 6(10): 1427-1439.
- [64] MENG HB, CAMPBELL WH. Substrate profiles and expression of caffeoyl coenzyme A and caffeic acid O-methyltransferases in secondary xylem of aspen during seasonal development[J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 38(4): 513-520.
- [65] LI L, CHENG XF, LESHKEVICH J, UMEZAWA T, HARDING SA, CHIANG VL. The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase[J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(7): 1567-1586.
- [66] DAVIN LB, LEWIS NG. Phenylpropanoid metabolism: biosynthesis of monolignols, lignans and neolignans, lignins and suberins[M]//*Phenolic Metabolism in Plants*. Boston, MA: Springer US, 1992: 325-375.
- [67] YEH AHW, NORN C, KIPNIS Y, TISCHER D, PELLOCK SJ, EVANS D, MA PC, LEE GR, ZHANG JZ, ANISHCHENKO I, COVENTRY B, CAO LX, DAUPARAS J, HALABIYA S, DEWITT M, CARTER L, HOUK KN, BAKER D. *De novo* design of luciferases using deep learning[J]. *Nature*, 2023, 614(7949): 774-780.
- [68] ZHOU Q, CHIN M, FU Y, LIU P, YANG Y. Stereodivergent atom-transfer radical cyclization by engineered cytochromes P450[J]. *Science*, 2021, 374(6575): 1612-1616.
- [69] SUN HY, LI Y, FENG SQ, ZOU WH, GUO K, FAN CF, SI SL, PENG LC. Analysis of five rice 4-coumarate: coenzyme A ligase enzyme activity and stress response for potential roles in lignin and flavonoid biosynthesis in rice[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 430(3): 1151-1156.
- [70] SUTELA S, HAHN T, TIIMONEN H, ARONEN T, YLIOJA T, LAAKSO T, SARANPÄÄ P, CHIANG V, JULKUNEN-TIITTO R, HÄGGMAN H. Phenolic compounds and expression of *4CL* genes in silver birch clones and Pt4CL1a lines[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114434.
- [71] ALLINA SM, PRI-HADASH A, THEILMANN DA, ELLIS BE, DOUGLAS CJ. 4-coumarate: coenzyme A ligase in hybrid Poplar1[J]. *Plant Physiology*, 1998, 116(2): 743-754.
- [72] HAMADA K, NISHIDA T, YAMAUCHI K, FUKUSHIMA K, KONDO R, TSUTSUMI Y. 4-coumarate: coenzyme A ligase in black locust (*Robinia pseudoacacia*) catalyses the conversion of sinapate to sinapoyl-CoA[J]. *Journal of Plant Research*, 2004, 117(4): 303-310.
- [73] JIN H, COMINELLI E, BAILEY P, PARR A, MEHRTENS F, JONES J, TONELLI C, WEISSHAAR B, MARTIN C. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in

- Arabidopsis*[J]. The EMBO Journal, 2000, 19(22): 6150-6161.
- [74] YU XW, WANG R, ZHANG M, XU Y, XIAO R. Enhanced thermostability of a *Rhizopus chinensis* lipase by *in vivo* recombination in *Pichia pastoris*[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 102.
- [75] OHTA Y, HATADA Y, HIDAKA Y, SHIMANE Y, USUI K, ITO T, FUJITA K, YOKOI G, MORI M, SATO S, MIYAZAKI T, NISHIKAWA A, TONOZUKA T. Enhancing thermostability and the structural characterization of *Microbacterium saccharophilum* K-1 β -fructofuranosidase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(15): 6667-6677.
- [76] SATO W, RASMUSSEN M, DEICH C, ENGELHART AE, ADAMALA KP. Expanding luciferase reporter systems for cell-free protein expression[J]. Scientific Reports, 2022, 12: 11489.
- [77] 张晓红, 周增, 左泽乘. 生物发光及其在分子植物育种中的应用[J]. 分子植物育种, 2022: 1-10.
- ZHANG XH, ZHOU Z, ZUO ZC, Bioluminescence and its application in molecular plant breeding[J]. Molecular Plant Breeding, 2022: 1-10 (in Chinese).
- [78] TANNER F, TONN S, WIT J, ACKERVEKEN G, BERGER B, PLETT D. Sensor-based phenotyping of above-ground plant-pathogen interactions[J]. Plant Methods, 2022, 18(1): 1-18.
- [79] REEVE B, SANDERSON T, ELLIS T, FREEMONT P. How synthetic biology will reconsider natural bioluminescence and its applications[M]//Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014: 3-30.
- [80] de ARAÚJO JA, FERREIRA N, DA SILVA SD, OLIVEIRA G, MONTEIRO RC, ALVES YFM, LOPES A. Filamentous fungi diversity in the natural fermentation of Amazonian cocoa beans and the microbial enzyme activities[J]. Annals of Microbiology, 2019, 69(9): 975-987.

(本文责编 陈宏宇)