

抑制 CCoAOMT 表达对烟草木质素生物合成的影响

刘惠荣¹, 赵华燕², 魏建华³, 邵金旺¹, 朱至清², 宋艳茹²

(¹ 内蒙古农业大学, 呼和浩特 010018; ² 光合作用和环境分子生理学重点实验室, 中国科学院植物研究所, 北京 100093;

³ 北京农业生物技术研究中心, 北京 100089)

摘要: 通过农杆菌介导法将毛白杨 CCoAOMT cDNA 反向导入烟草。PCR、PCR-Southern 和 Northern 点杂交检测表明, CCoAOMT cDNA 已反向整合到烟草基因组中并在转录水平表达。将转基因株系移栽温室 3 个月后, 以 Klason 法测下部茎木质素含量。与对照相比, 大部分转基因株系木质素含量均有不同程度的下降, 其中下降最多达 37%, 表明抑制植物内源 CCoAOMT 的表达可有效地降低木质素含量。

关键词: CCoAOMT; 反义 RNA; 木质素; 烟草; 毛白杨

Effects of Repression of CCoAOMT Expression on Lignin Biosynthesis in Tobacco

LIU Hui-rong¹, ZHAO Hua-yan², WEI Jian-hua³, SHAO Jin-wang¹, ZHU Zhi-qing², SONG Yan-ru²

(¹ Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018; ² Key Laboratory of Photosynthesis and

Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093;

³ Beijing Center of Agro-Biotechnology, Beijing 100089)

Abstract: Antisense CCoAOMT cDNA of Chinese white poplar (*Populus tomentosa*) was transformed into tobacco W38 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The results of PCR, PCR-Southern and Northern dot analysis indicated that the antisense CCoAOMT cDNA had integrated in the transgenic tobacco genome and expressed at transcriptional level. The basic stems of the 3-month-old transgenic plants growing in the green house were cut off and dried for Klason lignin analysis. Lignin content of most of the transgenic plants declined compared with the control plants, and one of them, the lignin content decreased by 37%. Our results suggest that the suppression of endogenous CCoAOMT expression can reduce lignin content of the plants effectively.

Key words: CCoAOMT; Antisense RNA; Lignin; *Nicotiana tabacum*; *Populus tomentosa*

木质素是植物体中含量仅次于纤维素的一类高分子有机物质, 陆生植物的木质素合成是适应陆地环境的重要进化特征之一。木质素为植物提供机械支持, 保护植物免受真菌入侵, 其疏水性保证了水分在植物体内的正常运输。然而, 在制浆造纸中, 为去除木质素所采取的化学处理不仅费用昂贵, 且对环境造成的危害极大。此外, 牧草的木质素含量与其对牲畜的消化性呈负相关。因此, 通过基因工程降低植物木质素含量具有重大的环保效益与经济意义^[1,2]。

木质素单体是通过苯丙酸途径合成的, 由最初前体经脱氨、羟基化、甲基化与还原反应形成 3 种单体: 香豆醇、松柏醇、芥子醇^[3]。它们的主要区别在于甲基化程度的不同, 从而最终聚合形成致密程度不同的木质素类型, 因此影响在制浆中的脱除^[4], 所以甲基化酶在苯丙酸途径中比较重要。

Kühnl 等首次在胡萝卜和欧芹的细胞悬浮培养中发现咖啡酰辅酶 A 甲基转移酶 (CCoAOMT), 其活性受真菌激活因子诱导, 作者认为 CCoAOMT 主要与植物的防御机制有关^[5]。直到 1994 年 Ye 在百日草中首次验证 CCoAOMT 参与木质素的合

收稿日期: 2001-11-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30170783), 国家“863”资助项目 (2001 AA212151)

作者简介: 刘惠荣 (1973-), 女, 硕士研究生, 通讯作者为宋艳茹, Tel: 010-62591431-6208; E-mail: songyr@ns.ibcas.ac.cn

成^[6]。之后,该基因相继在欧洲山杨、烟草等植物中被克隆^[7,8]。抑制 CCoAOMT 表达,不仅木质素含量降低,且其组分也发生改变,S/G(S-紫丁香基木质素;G-愈创木基木质素)比率增加^[4,9,10],这些改变均有利于制浆生产。故抑制 CCoAOMT 表达是利用分子生物学方法培育环保型造纸用资源树种的有效途径。

毛白杨是我国的特有树种,也是重要造纸资源植物。本实验室已从毛白杨中首次分离了 CCoAOMT 基因。为了进一步验证 CCoAOMT 的功能,研究降低转基因植物木质素含量的途径,我们将毛白杨 CCoAOMT cDNA 反向导入烟草,并对转基因植株的木质素含量进行测定。结果所有转基因株系的木质素含量均有不同程度的下降,最长达 37%,且其生长发育未见异常,表明 CCoAOMT 是木质素生物合成的一个关键酶,通过抑制其表达降低毛白杨木质素含量是可行的。

1 材料与方法

1.1 材料

烟草(*Nicotiana tabacum*) W38 来自本实验室保存的组培苗,毛白杨(*Populus tomentosa*) CCoAOMT 的反义表达载体 APCOA 由本实验室构建^[11]。

1.2 方法

1.2.1 转化 通过冻融法将反义表达载体 APCOA 转入农杆菌 LBA4404。用叶盘法对烟草进行转化^[12],将侵染后的叶切块置共培养基(MS + 6-BA 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L)上 2d,然后转入分化培养基(MS + 6-BA 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L + Kan 200 mg/L)。再生芽产生后,移到继代培养基(MS + NAA 0.1 mg/L + Kan 200 mg/L + Carb 500 mg/L)上培养。待分化芽长至 2~3cm 时,将之切下转至生根培养基(MS + NAA 0.1 mg/L + Kan 100 mg/L + Carb 200 mg/L),生根后移至花盆于温室培养。

1.2.2 转化植株的 PCR 检测 利用 SDS 法小量提取烟草基因组 DNA 为模板,以 CCoAOMT 基因的 5' 引物和对应于 CaMV 35S 启动子的一段核苷酸为引物,进行 PCR 检测。扩增程序为 95℃ 变性 5 min,95℃ 1 min,59℃ 1 min,72℃ 1~2 min,30 个循环,72℃ 延伸 7 min。0.9% 的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,拍照记录。

1.2.3 转化植株的 PCR-Southern 检测 将 PCR 产物经 0.9% 的琼脂糖凝胶电泳后吸印转至尼龙膜

上,以 Digoxigenin 标记的 CCoAOMT cDNA 为探针,与转至尼龙膜上的 PCR 产物进行杂交,洗膜、检测杂交信号。

1.2.4 RNA 单链标记为探针的 Northern 点杂交检测 用 EcoRI 将整合 CCoAOMT cDNA 的 TCOA 质粒(图 1) 切开,以 T7/Sp6 Transcription Kit (Roche) 标记对应于反义链的 RNA 单链为探针,与点到尼龙膜上的总 RNA 进行杂交,洗膜、检测杂交信号。

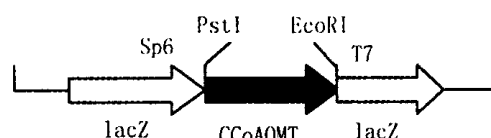


图 1 质粒 TCOA 结构简图

Fig.1 The construction of plasmid TCOA

1.2.5 Klason 木质素测定 将转基因植株与未转基因对照植株移栽温室 3 个月后,取其下部主茎,烘干后测 Klason 木质素含量^[10]。

2 结果与分析

2.1 PCR 及 PCR-Southern 检测

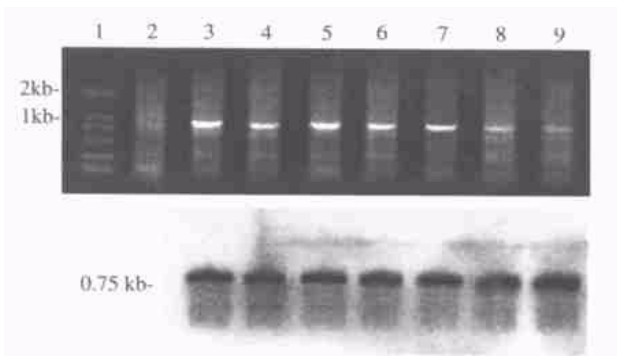
以 CCoAOMT 特异性 5' 引物与对应于 CaMV 35S 启动子区域的一段核苷酸为引物,进行 PCR 扩增,结果阳性对照与转基因株系均扩增出约 0.75kb 的一条特异性条带,而未转基因的对照植株则没有任何条带,初步表明 CCoAOMT cDNA 已反向整合到烟草基因组中。以 Digoxigenin 标记的 CCoAOMT cDNA 为探针,与转到膜上的 PCR 产物进行杂交,结果转基因株系均产生明显的杂交信号,进一步说明 CCoAOMT cDNA 已反向整合到转基因烟草的基因组中(图 2)。

2.2 以 RNA 单链标记为探针的 Northern 点杂交检测

杂交结果如图 3 所示,除阴性对照外,转基因株系均产生了强烈的杂交信号,表明反向整合到烟草基因组中的 CCoAOMT cDNA 已在转录水平表达。阴性对照所产生的极弱杂交信号可能是由总基因组 DNA 残留所致。

2.3 Klason 木质素测定

将转基因烟草及对照植株移栽入温室,观察其生长发育状态。3 个月后,取下部主茎烘干,采用 Klason 方法测其木质素含量(表)。野生型对照测定 3 个植株,3 株木质素含量的平均值为 20.47%,各



1 - DNA marker; 2 - W38; 3 - 质粒 APCOA; 4~9 转基因烟草
1 - DNA marker; 2 - W38; 3 - Plasmid APCOA; 4 - 9 Transgenic tobacco plants

图 2 部分转基因烟草 TAPCOA 的 PCR、PCR-Southern 检测
Fig. 2 PCR, PCR-Southern Analysis of transgenic tobacco plants



从左至右分别为: W38、TAPCOA1、9、5、7、10
From left to right: W38, TAPCOA1, 9, 5, 7, 10

图 3 部分转基因株系 CCoAOMT 反义 cDNA 表达的 Northern 检测

Fig. 3 Northern Dot Hybridization Analysis of the transgenic plants

转基因株系木质素含量与之相比均有不同程度的下降,其中株系 TAPCOA5 木质素含量为 12.68%,降低 37%,且所有转基因株系在生长发育过程中表型未见异常(图 4)。说明抑制 CCoAOMT 表达可以有效地降低植物木质素含量。

表 转基因烟草与对照的木质素含量

Table Lignin content analysis of transgenic tobacco plants and W38

株系 Lines	木质素含量 (3 株的平均值) Lignin content	占对照木质素含量的比率 Compare to CK(%)
W38(CK)	20.47	100
TAPCOA1	17.09	83
TAPCOA2	19.62	96
TAPCOA3	19.90	97
TAPCOA4	18.47	90
TAPCOA5	12.68	63
TAPCOA6	17.74	86
TAPCOA7	19.52	95
TAPCOA8	18.13	88
TAPCOA9	16.99	83
TAPCOA10	16.78	82

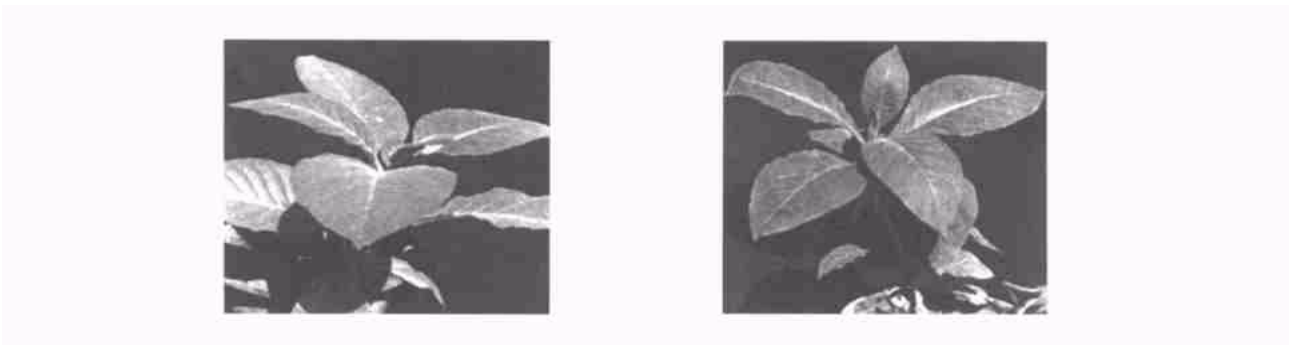


图 4 移栽入温室生长的对照(左)及阳性转基因植株(右)

Fig. 4 The control line(left) and the transgenic line(right) grown in the greenhouse

3 讨论

试验结果表明,来自毛白杨 CCoAOMT cDNA 的反义基因有效地抑制了烟草内源 CCoAOMT 基因的表达。在降低转基因烟草木质素的同时,并未对其生长发育产生不良影响。Zhong、Meyermans、Guo 等报道^[4,9,10],抑制 CCoAOMT 表达不但使转基因植物的木质素含量明显下降,而且改变了木质素的组成,使 S/G 比率增加。说明 CCoAOMT 是木质素生物合成途径中的一个关键酶,且木质素下降

并未对植物的正常生长发育造成不良影响,表明植物内源 CCoAOMT 表达被抑制后,植物体内合成的木质素足以满足其正常生长发育所需,因此抑制 CCoAOMT 表达是培育低木质素含量造纸资源植物的理想途径。但在大田生产中,转基因植株的生长状态是否与其在温室中的表现相同,还须进一步观察。本项研究为利用反义 RNA 技术抑制 CCoAOMT 表达,降低毛白杨的木质素含量,为培育造纸用环保型资源树种奠定了基础。

References

- [1] Douglas C J. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends Plant Sci.* 1996, 1:171 - 178.
- [2] Che mey D J R, Patterson J A, Johnson K D. Digestibility and feeding value of pearl millet as influenced by the brown midrib, low lignin trait. *Anim. Sci.* 1990, 68:4345 - 4351.
- [3] Wei J H, Song Y R. Recent advances in study of lignin biosynthesis and manipulation. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(9): 771 - 779. (in Chinese)
魏建华, 宋艳茹. 木质素生物合成途径及调控的研究进展. *植物学报*, 2001, 43(9): 771 - 779.
- [4] Meyermand H, Morreel K, Lapierre C, Pollet B. 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(47): 36899 - 36909.
- [5] Kühnl T, Koch U, Heller W, Wellmann E. Elicitor induced S-adenosyl L-methionine: caffeoyl CoA 3-O methyltransferase from carrot cell suspension cultures. *Plant Sci.* 1989, 60:21 - 25.
- [6] Ye Z H, Kneusel R E, Matern U, Varner J E. An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in Zinnia. *Plant Cell*, 1994, 6:1427 - 1439.
- [7] Meng H, Campbell W H. Cloning of aspen xylem caffeoyl CoA 3-O methyltransferase (GenBank U27116). *Plant Physiol.* 1995, 108:1749.
- [8] Martz F, Maury S, Pincon G, Legrand M. cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl CoA 3-O methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme. *Plant Mol. Biol.* 1998, 36:427 - 437.
- [9] Zhong R, Morrison W H, Negrel J, Ye Z H. Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *Plant Cell*, 1998, 10:2033 - 2046.
- [10] Guo D J, Chen F, Inoue K, Blount J W, Dixon R A. 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. *The Plant Cell*, 2001, 13:73 - 88.
- [11] Wei J H, Zhao H Y, Zhang J Y, Liu H R, Song Y R. Cloning of cDNA encoding CCoAOMT from *Populus tomentosa* and down regulation of lignin content in transgenic plant expression antisense gene. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(11): 1179 - 1183.
- [12] Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N L, Eichholtz D, Rogers S G, Fraley R T. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, 227:1229 - 1231.