

白桦反义 *CCoAOMT* 基因调控木质素生物合成

姚连梅¹ 胡晓晴¹ 周 菲² 郑要强¹ 王国东¹ 刘雪梅¹

(1. 东北林业大学 哈尔滨 150040 ; 2. 黑龙江省农业科学院经济作物所 哈尔滨 150040)

摘要 白桦是我国北方重要的造林树种,但其中的高木质素含量严重制约了它作为造纸资源植物的开发利用。本文利用 RACE 技术获得了白桦咖啡酰辅酶 A-3-O-甲基转移酶(*CCoAOMT*)基因全长 ORF 序列,并构建了白桦 *CCoAOMT* 基因的反义表达载体,通过农杆菌介导法将其导入到白桦中。PCR 检测表明反义 *CCoAOMT* 基因已整合到白桦的基因组中。对转化植株的半定量 PCR 检测显示转基因株系的 *CCoAOMT* 基因表达量下降;Wiesner 染色发现,与野生型相比,转基因植株木质素含量有所下降。对七年生的转基因白桦和野生型对照进行了化学成分分析,结果表明转基因白桦的苯醇抽提物和 Klason 木质素显著减少,聚戊糖含量升高。上述结果暗示 *BpCCoAOMT* 基因参与白桦木质素的合成,反义表达该基因后木质素含量减少,更易于去除。白桦 *CCoAOMT* 基因对木质素的合成起重要作用,这为培育低木质素含量的制浆新品种白桦奠定了基础。

关键词 *CCoAOMT* 基因;反义 RNA;白桦;木质素;Wiesner 染色;转基因

中图分类号:Q786 文献标志码:A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2019.01.015

Antisense *CCoAOMT* Gene Regulates Lignin Biosynthesis in *Betula platyphylla*

YAO Lian-Mei¹ HU Xiao-Qing¹ ZHOU Fei² ZHENG Yao-Qiang¹ WANG Guo-Dong¹

(1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Northeast Forestry University, Harbin 150040; 2. Institute of Economic Crops, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150040)

Abstract *Betula platyphylla* is an important forestation tree species in northern China, but its high lignin content severely restricts its development and utilization as a papermaking resource plant. In this paper, the full-length ORF sequence of *CCoAOMT* (Caffeoyl-coenzyme A-3-O-methyltransferase) gene was obtained using RACE technology. The antisense *CCoAOMT* expression vector was constructed and transformed into *B. platyphylla* by Agrobacterium infection method. The molecular detection indicated that the *CCoAOMT* antisense gene had been successfully integrated into *B. platyphylla*. By semi-quantitative PCR analysis of the transgenic plants, the *CCoAOMT* gene expression of the transgenic lines was decreased. Compared to the wild type, by the Wiesner staining, the lignin content of the transgenic plants was decreased. Chemical compositions of seven-year-old transgenic and wild-type birch were analyzed. The phenyl alcohol extracts and Klason lignin of transgenic birch were significantly reduced, and the pentosan content was increased. The *BpCCoAOMT* gene plays an important role in the synthesis of lignin, which lays a foundation for the cultivation of a new species of birch with low lignin content.

Key words *CCoAOMT* gene; antisense RNA; birch; lignin; Wiesner stain; transgene

木质素为芳香族聚合物,是植物体中含量仅次于纤维素的一类高分子有机物质,主要存在于

次生加厚的植物细胞壁中,可为植物提供机械支持,保护植物免受真菌入侵。而由于木质素结构

基金项目:中央高校基本科研业务费专项基金 E 类项目(2572015EA05)

第一作者简介:姚连梅(1996—),女,本科生,主要从事植物发育与基因工程。

* 通信作者 E-mail:15663717706@163.com

收稿日期:2018-07-02

Foundation item:Project name(number) Special Fund for Basic Scientific research operation Fee of Central University(2572015EA05)

First author introduction:YAO Lian-Mei(1996—),female,undergraduate,mainly engaged in plant development and genetic engineering.

* Corresponding author E-mail:15663717706@163.com

Received date:2018-07-02

的稳定性,使其难以消化和降解。在造纸行业中,需要使用有毒且昂贵的化学药品将木质素从纤维素和半纤维素中分离。近几十年的研究已阐明了木质素单体的主要生物合成路线,并且通过木质素调控能够提高木本植物的制浆率和草料的可消化性等^[1]。

参与木质素生物合成途径的酶有十多种,其中咖啡酰辅酶 A-3-O-甲基转移酶(*CCoAOMT*)是木质素生物合成途径中的一种关键酶,主要催化羟基辅酶 A 酯的甲基化反应,将咖啡酰辅酶 A 转化成阿魏酰辅酶 A^[2]。目前已在烟草^[3~4]、棉花^[5]、苜蓿^[6]、杨树^[7~11]等多种植物中克隆了 *CCoAOMT* 基因。在下调 *CCoAOMT* 的转基因烟草中发现木质素含量下降的同时,纤维素含量有所增加,这说明转基因植株中木质素和纤维素的合成存在着互相补偿关系^[3]。在下调 *CCoAOMT* 的转基因苜蓿中木质素结构发生了变化,G型和S型木质素单体的合成也受到了影响^[6]。在Chen等的进一步研究中发现,在苜蓿中抑制 *CCoAOMT* 基因会使木质素的含量下降,其中G型单体显著减小,而S型单体没有发生变化^[6]。赵华燕等利用转化反义 *CCoAOMT* 基因培育了低木质素的毛白杨^[8],这种转基因杨树表现出优质的制浆性能,木质素更易于去除、制浆得率和纤维聚合度都得到提高^[9]。

白桦是我国北方重要的造林树种,具有较高的经济价值,其材质优良,是适于造纸的好材料。本研究以白桦为试材,构建了反义 *CCoAOMT* 植物表达载体,并将其转化至白桦中,对转基因植株进行了分子检测后进行了组织化学染色及化学成分分析。本文为研究 *CCoAOMT* 基因在白桦中的作用及培育低木质素含量的新品种白桦奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

转基因的受体材料为东北林业大学栽植的白桦(*Betula platyphylla* Suk.)组培苗。用于化学成分分析和纤维形态检测的材料为田间种植的7年生野生型和反义表达 *CCoAOMT* 转基因白桦的7个株系,共89株。

载体、菌株及试剂:植物表达载体 pBI121、根癌农杆菌 EHA105 为本实验室保存;pMD18-T 载体购于宝生物工程有限公司;SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司;引物合

成公司为北京华大基因科技有限公司;普通 Taq 酶、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;T₄ 连接酶、限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bam*H I 均购自 NEB 公司。

1.2 基因克隆

利用 CTAB 法提取 20 年生白桦次生木质部 RNA,反转录合成 cDNA。通过对 NCBI 已分离的欧芹、茄属和烟草等植物的 *CCoAOMT* cDNA 保守序列比较和分析,设计简并引物,F:5'-AGCGATG-CYCTYTAYCAGTA-3',R:5'-TTCCABAGVGTGTT-GTCGTA-3',通过 RT-PCR 获得白桦 *CCoAOMT* 部分序列。根据保守序列结果,设计 3'RACE 特异性引物 5'-TCGTGGACGCTGACAAGGACAAC-3';5'RACE 特异性引物 5'-GAGCCATGGTTCCTCT-CATCTGC-3';使用上述引物 PCR 获得 *CCoAOMT* 基因各片段及全长。将 pMD18-T 连接的白桦 *CCoAOMT* 全长 cDNA 质粒命名为 pTXB。

1.3 植物反义表达载体构建

将 *CCoAOMT* 全长 cDNA 反向连接至 pBI121 载体作为植物反义表达载体。分别提取 pTXB、pBI121 质粒,选择 pTXB 和 pBI121 上的共有酶切位点 *Xba* I、*Bam*H I 对上述质粒分别进行双酶切。反应程序为:37℃ 3 h,65℃ 20 min。白桦 *CCoAOMT* 基因与 pBI121 载体经过回收后,用 T₄ DNA 连接酶连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,提取重组质粒进行 PCR 检测。检测引物为 F:ATGGCTACCAACGGAGAAG;R:TTTGATCCGACG-GCAGAGA;PCR 反应条件 94℃ 5 min,94℃ 30 s;58℃ 30 s,72℃ 45 s,35 个循环后 72℃ 7 min。将经 PCR 检测和测序的植物反义表达载体质粒转入到农杆菌 EHA105 中,PCR 鉴定无误后可用于后续实验。

1.3.1 农杆菌介导的遗传转化和转基因白桦的再生

(1)工程菌的制备:平板上挑取 EHA105 菌株的单菌落,接种到 20 mL 含有卡那霉素(50 mg·L⁻¹)和利福平(50 mg·L⁻¹)的 LB 培养基中,于 28℃ 恒温摇床中培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~1.0。用 WPM 液体培养基将菌液稀释至 OD₆₀₀ 为 0.2~0.3 用于转化;

(2)外植体预培养:取培养 20 d 白桦无菌苗,将其叶片(剪成 0.5 cm×0.5 cm~1 cm×1 cm 的小块)和茎段(1 cm 左右)接种到分化培养基上,黑暗预培养 1~3 d;

(3)菌液侵染:在超净工作台内,将菌液倒入无菌的小烧杯中。取出预培养的外植体,放入菌液,轻轻摇晃,侵染 30 min;

(4)共培养:将叶片和茎段从菌液中取出,于无菌滤纸上吸取多余的菌液,并接种在无抗生素的愈伤诱导培养基(WPM + BA 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹)上共培养 2~4 d;

(5)选择培养:将经过共培养的外植体转移到含有卡那霉素(50 mg · L⁻¹)和头孢抑菌剂(200 mg · L⁻¹)的愈伤诱导培养基上,25℃条件下,进行选择培养;

(6)继代选择培养:选择培养 3~4 周后,外植体的转化细胞将分化出抗性不定芽或产生抗性愈伤组织,将这些抗性材料转入含有卡那霉素(50 mg · L⁻¹)和头孢抑菌剂(200 mg · L⁻¹)的分化培养基(WPM + BA 0.5 mg · L⁻¹)上诱导分化;

(7)生根培养:待不定芽长到 1 cm 以上时,切下并插入加有卡那霉素(50 mg · L⁻¹)和头孢抑菌剂(200 mg · L⁻¹)的生根培养基(WPM + IBA 0.4 mg · L⁻¹)上进行生根培养。

1.4 转化植株的分子检测

基因组水平检测:随机选取在卡那霉素中生根的抗性 11 个转基因株系,采用 CTAB 法分别提取叶片总 DNA 作为模板,以 *CCoAOMT* 基因全长引物进行 PCR 扩增。阳性对照的模板为抑制表达重组载体质粒,阴性对照为野生型白桦。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析并照相。

表达水平检测:以 DNA 水平检测为阳性的 7 个株系和非转基因白桦叶片为材料,利用 CTAB 法提取总 RNA。按照 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover ki(TOYOBO, Japan)试剂盒说明书反转录合成 cDNA。以 7 个转基因株系和野生型 cDNA 为模板,白桦肌动蛋白 actin 作为内参基因进行 RT-PCR 检测,检测引物如下。内参基因引物为 F:5'-CATCTCTGATCGGAATG-GAAG-3', R:5'-AGATCCTTTCTGATATCCACG-3'; *BpCCoAOMT* 引物为 F:5'-TGGCCATGGACATCAA-CAGA-3', R:5'-AGGAGGCCGCCACGACAGAG-3'。

1.5 转基因白桦的组织化学检测

分别取培养 25 d 的组培苗茎基部的野生型和转基因白桦的新鲜茎段,使用冷冻切片机 Leica CM1800 进行切片。对横切的 20 μm 厚的薄片组织进行 Wiesner 反应,将薄片置载玻片上,先加一滴 1% 的间苯三酚,后加 2% 盐酸。盖上盖玻片,

数秒后即可显色。在显微镜下观察、拍照。

1.6 转基因白桦的原料化学组分测定

取 4 个 7 年生转基因株系与对照野生型各 5 株,去掉直径 15 mm 以上树冠及枝丫材后切片风干备用。原料化学组分主要进行水分、1% 氢氧化钠抽出物、有机溶剂抽出物、木素、综纤维素和多戊糖测定。原料水分测定采用 GB/T2677.2-93 造纸原料水分的测定方法进行;1% 氢氧化钠抽出物测定采用 GB/T2677.5-93 造纸原料 1% 氢氧化钠抽出物含量的测定方法进行;苯醇抽出物测定采用 GB/T2677.6-94 造纸原料有机溶剂抽出物含量的测定方法进行;热水抽出物测定采用 GB/T2677.2-1993 造纸原料水分含量测定方法进行;木素测定采用 GB/T2677.8-94 造纸原料酸不溶木素含量的测定方法进行;综纤维素测定采用 GB/T2677.10-1995 造纸原料综纤维素含量的测定方法进行;多戊糖测定采用 GB/T2677.9-94 造纸原料多戊糖含量的测定方法进行。

2 实验结果

2.1 白桦 *CCoAOMT* 基因 cDNA 全长序列的获得

利用快速扩增 cDNA 末端(RACE)技术,对 *CCoAOMT* 基因 cDNA 片段分别进行 5'端和 3'端序列的扩增,电泳结果见图 1A~B。将所得序列用 NCBI BLASTN 和 BLASTP 以及 DNA 分析软件分析,确定获得白桦 *CCoAOMT* 基因全长序列,序列全长为 744 bp(图 1C)。已在 Genbank 上注册,*CCoAOMT* cDNA 注册号为 AY860952。

2.2 反义表达载体的构建

如图 2A 所示,分别将目的片段和植物表达载体 pBI121 进行 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切,回收纯化的目的片段和植物表达载体通过 T₄ DNA 连接酶过夜连接,连接产物转化大肠杆菌感受态 DH5α,经抗性筛选和菌落 PCR 检测获得阳性克隆,提取阳性重组质粒 DNA,进行 PCR 鉴定,扩增出约 750 bp 左右的特异性条带,扩增结果如图 2B 所示。经过测序比对,*CCoAOMT* 全长 cDNA 确实是按照设计反向插入在预定的位点,与预期结果完全相符。将上述重组质粒转化到农杆菌,得到阳性克隆后提取质粒进行 PCR 检测,扩增结果同图 2B。获得重组植物表达载体,命名为 pBI121-anti *CCoAOMT*。

2.3 抗性转基因植株的获得

将构建好的农杆菌植物表达载体 pBI121-an-

tiCCoAOMT 利用农杆菌介导法分别侵染白桦叶片和茎段。通过试验白桦对抑菌剂和卡那霉素浓度的敏感性,本研究最终选择筛选剂卡那霉素浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。抑菌剂羧苄青霉素浓度为 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。转基因的大致过程如图 3 所示,图 3A

为侵染 25 d 后在卡那霉素筛选下叶脉伤口产生的愈伤。继续经卡那霉素筛选,最终获得 11 个绿色抗性芽点,图 3C 为筛选出的抗性外植体。图 3D 为经过 PCR 检测的阳性植株经过再分化后在卡那霉素的生根培养。

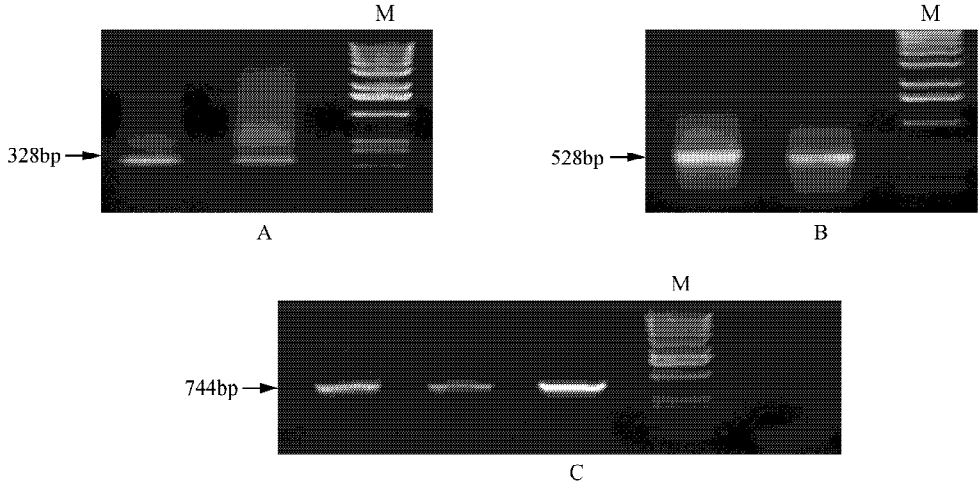


图 1 *BpCCoAOMT* cDNA 的获得 A. 3'末端扩增产物 B. 5'末端扩增产物 C. *BpCCoAOMT* cDNA 扩增产物

Fig.1 Cloning of *BpCCoAOMT* cDNA A. 3' sequence of CCoAOMT from *B. platyphylla* ; B. 5' sequence of *BpCCoAOMT* ; C. PCR detection of CCoAOMT cDNA (M. 1 kD ladder)

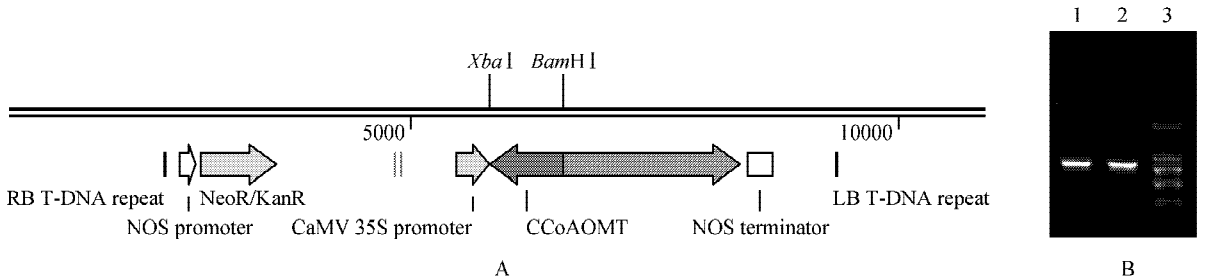


图 2 白桦 *CCoAOMT* 基因植物反义表达载体构建 A. pBII121-antiCCoAOMT 意图 B. pBII121-antiCCoAOMT 的 PCR 扩增检测 (1~2. pBII121-antiCCoAOMT 3. DL2000 分子量标准)

Fig.2 Construction of antisense expression vectors of *CCoAOMT* gene in *B. platyphylla* A. Schematic representation of pBII121-antiCCoAOMT constructs ; B. Identification of pBII121-antiCCoAOMT by PCR (1-2. pBII121-antiCCoAOMT ;3. DL2000 DNA maker)

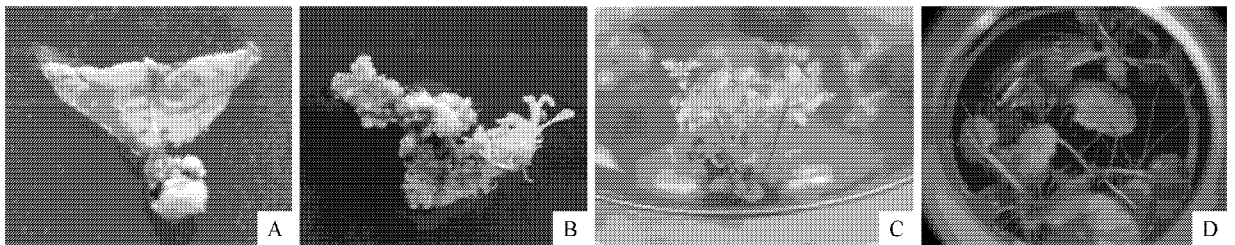


图 3 转化植株的愈伤诱导、分化及生根 A. 叶片愈伤组织 B. 茎段愈伤组织 C. 愈伤组织诱导的丛生芽 D. 移栽成活的再生植株

Fig.3 Complete process of the genetic transformation of birch A. Callus of the leaves ; B. Callus of the stems ; C. Buds differentiating from callus ; D. Transplanting survival of regeneration plants

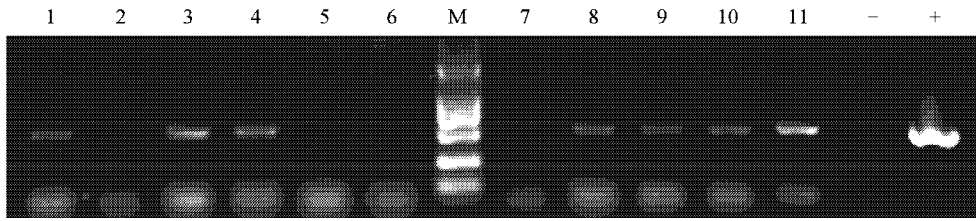


图4 对部分 Kan 抗性植株的 PCR 检测 +. 阳性对照 (pBPCOA 质粒); -. 阴性对照 (未转化植株); 1 ~ 11. 转基因株系; M. DL2000 标准分子量

Fig. 4 PCR detection of the selective Kan resistant plants +. Positive control (pBPCOA plasmid); -. Negative control (wild type birch); 1 ~ 11. Transgenic lines; M. DL2000 DNA maker

2.4 转化白桦的检测和分析

2.4.1 转基因白桦 DNA 水平的 PCR 检测结果

将获得的 11 个卡那霉素抗性株系进行 PCR 扩增检测,部分扩增结果见图 4,其中 7 个株系在 744 bp 左右处有单一扩增谱带,而阴性对照未见扩增谱带,初步证明 *CCoAOMT* 基因已经整合到这 7 个株系的基因组中,将 7 个转基因株系通过分化生根 PCR 检测,最终获得转 *CCoAOMT* 基因抗性植株共 89 株。

2.4.2 转基因白桦的 RT-PCR 检测结果

选取上述 7 个株系的转基因白桦和野生型的新鲜叶片,提取白桦总 RNA,凝胶电泳结果见图 5, RNA 样品无降解无杂质,可以用于后续实验。将上述 RNA 样品反转录合成 cDNA,以新合成的 cDNA 为模板,用内参 actin 引物检测 cDNA 模板量。在所有样品的 cDNA 模板量基本相同的情况下,用白桦 *CCoAOMT* 基因的特异性引物进行 PCR 扩增。如图 5 所示,转基因白桦 *CCoAOMT* 基因的表达量明显低于野生型,说明在转入反义 *CCoAOMT* 基因后,白桦中的 *CCoAOMT* 基因表达受到一定程度的抑制。

2.5 木质素的组织化学染色

为研究 *CCoAOMT* 反义表达后对木质素含量的影响,利用 Wiesner 染色法对转基因株系的茎切片进行染色。Wiesner 主要与木质素中的羟基肉桂醛和苯甲醛反应,该试剂对木质素中松柏醛产生特异性反应,其染色强度可粗略反映木质素含量。随机选取不同株系的转基因白桦进行 Wiesner 染色,结果显示与野生型相比,反义表达 *CCoAOMT* 基因植株木质化细胞染色相比野生型染色均变浅,其中 4 号株系表现最为明显(图 6),表明反义转化 *CCoAOMT* 基因后木质素含量有所下降。

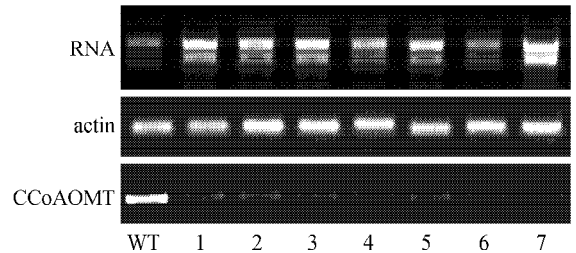


图5 RT-PCR 检测转基因白桦中内源 *CCoAOMT* 基因的表达 上为野生型与转基因株系的 RNA;中为 actin 扩增产物;下为内源 *CCoAOMT* 基因的 RT-PCR 产物;WT. 野生型对照;1 ~ 7. 转基因株系

Fig. 5 The expression of endogenous *CCoAOMT* in transgenic birch by RT-PCR The up panel means RNA of wild type and transgenic lines, and the middle panel indicated the PCR production of actin. The bottom part means the RT-PCR production of endogenous *CCoAOMT*; WT. Wild type of birch; 1 ~ 7. Transgenic lines

2.6 化学成分分析

对 4 个反义转化 *CCoAOMT* 基因的转基因白桦株系和野生型对照进行化学成分分析(表 1),结果表明,反义转化株系的原料水分、综纤维素含量、1% 氢氧化钠抽提物含量没有明显差别。反义表达 4 号株系的苯醇抽提物明显低于对照组,其中苯醇抽提物的主要成分是树脂、蜡质、脂肪和其他水溶性物,其较高的含量是不利于制浆造纸的,而 4 号株系中较低的苯醇抽提物说明其是有利于造纸的。聚戊糖是半纤维素中五碳糖组成的高聚物的总称。转基因 1、3、7 号株系的聚戊糖含量显著升高暗示着抑制 *CCoAOMT* 基因表达会引起半纤维素含量升高。值得注意得是 4 个转基因株系的酸不溶木质素(亦称 Klason 木素)含量在 12.18% ~ 12.65%,而野生型为 16.72%,转基因株系的木质素明显下降。

表 1 化学成分测定结果

Table 1 chemical composition determination results

株系号 Line No.	原料水 Raw water (%)	苯醇抽提物含量 Phenyl alcohol extract content(%)	酸不溶木素含量 Acid insoluble lignin content(%)	综纤维素含量 Heddle cellulose content(%)	1% 氢氧化钠抽提物含量 1% sodium hydroxide extract content(%)	聚戊糖含量 Polypentose content(%)	热水抽提物含量 Hot water extract content(%)
WT	4.35 ± 0.03	3.38 ± 0.08	16.72 ± 0.52	80.37 ± 1.20	17.81 ± 0.31	14.54 ± 0.17	3.60 ± 0.19
L1	4.55 ± 0.08	3.63 ± 0.36	12.31 ± 0.60 **	82.23 ± 0.08	17.86 ± 0.12	16.71 ± 0.21 **	3.45 ± 0.07
L3	4.22 ± 0.10	3.48 ± 0.10	12.18 ± 0.28 **	83.12 ± 0.16	18.13 ± 0.17	16.24 ± 0.09 **	4.31 ± 0.12 **
L4	4.54 ± 0.03	2.68 ± 0.03 **	12.65 ± 0.34 **	81.71 ± 0.10	16.66 ± 0.23	14.56 ± 0.15	2.89 ± 0.06 **
L7	4.47 ± 0.05	3.75 ± 0.14 *	12.36 ± 0.63 **	82.63 ± 1.10	17.11 ± 0.19	17.58 ± 0.42 **	3.13 ± 0.16 *

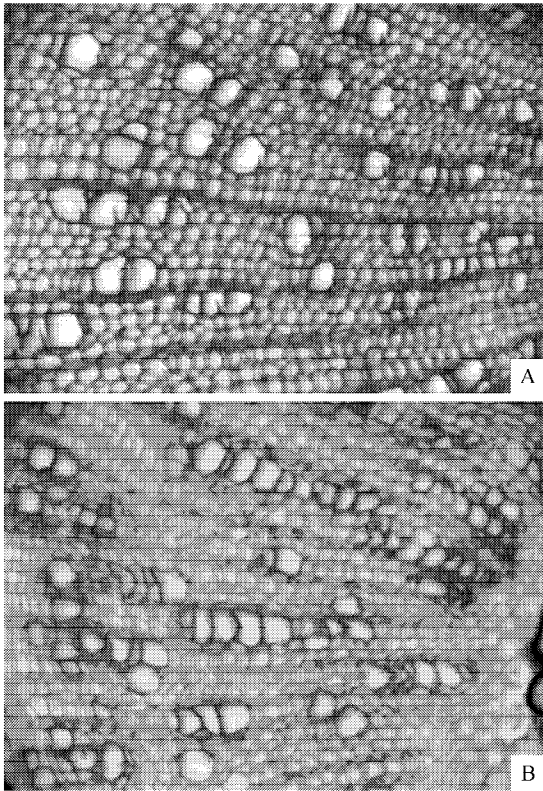
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 图 6 转基因白桦组织化学染色 A. 野生型; B. 反义 *CCoAOMT* 转基因白桦 4 号株系

Fig. 6 The histochemical stain of transgenic birch

A. Wild type; B. Line 4 of Anti *CCoAOMT* transgenic white birch

3 讨论

研究表明在绝大多数植物中,木质素合成途径是十分保守的^[9]。利用基因工程手段下调参与木质素合成途径的基因,可有效降低木质素含量。木质素既可改善胶粘剂的性质,又可节约苯酚的用量^[10]。*CCoAOMT* 基因是调控木质素合成过程中的关键酶基因。研究表明,咖啡酰辅酶 A-3-O-甲基转移酶由多基因编码,例如,水稻中有 9 个

CCoAOMT 基因家族成员,白桦中存在 6 个 *CCoAOMT* 基因家族成员,而拟南芥中多达 11 个 *CCoAOMT* 基因^[12-14]。本文利用 RACE 技术首次得到了白桦长为 744 bp 的 *BpCCoAOMT* cDNA 序列,将其反向连接至 35S 驱动的 pBI121 植物表达载体,利用农杆菌侵染法转入白桦。转基因茎段切片 Wiesner 染色和化学成分分析表明抑制 *BpCCoAOMT* 基因后,白桦木质素含量明显下降。这与王玲^[4]等将美洲黑杨 *CCoAOMT* cDNA 反义转化至烟草中,转基因株系的木质素含量最多下降了 9.2% 的结果一致。在白桦中的 *CCoAOMT* 反义表达导致木质素含量降低,并且对转基因植物早期生长阶段及其内部机械疏导系统基本没有影响,暗示植物中残余的木质素可能足以维持植物正常的生理活动及其细胞原有结构,或者当木质素合成途径受到干扰时,可能刺激植物产生相应的应激反应,这与赵华燕^[8]等将反义 *CCoAOMT* 基因整合到毛白杨基因组中结果一致。魏建华^[15]等研究表明反义表达 *CCoAOMT* 的转基因杨树的木质素含量比野生型下降了 13%, G/S 略有增加,纤维品质也有所提高。Wagner^[16]等发现在辐射松中抑制 *CCoAOMT* 后,木质素含量和结构均有所改变。除了明显的木质素下降,本研究发现下调 *CCoAOMT* 后表现出较高的半纤维素含量和较低的茶醇抽提物。半纤维素的增加有利于纸张强度,而较低的茶醇抽提物也是有利于制浆的。总之,我们的结果证实了 *CCoAOMT* 参与木质素的合成,反义 *CCoAOMT* 能有效的可利用 *CCoAOMT* 调控木质素合成途径。总之, *CCoAOMT* cDNA 是木质素生物合成的遗传操作的理想靶标,为培育低木质素含量的制浆新品种白桦奠定基础^[17-18]。

反义 RNA 与靶 RNA 具有互补序列,通过与靶 RNA 进行碱基互补配对,进而影响 mRNA 前体

拼接、转移以及 5' 和 3' 端修饰等^[19-20]。反义 RNA 参与植物基因表达的调控,抑制靶基因表达,现已广泛用于植物基因工程。本文利用反义 RNA 技术,有效地降低了 *CCoAOMT* 基因在白桦中的表达。近年来,利用 Cas9/gRNA 技术实现基因编辑的研究受到全球的瞩目^[21],未来有望利用该技术进一步研究白桦 *CCoAOMT* 基因功能。

参 考 文 献

- 宋福南. 白桦木质素合成苯丙氨酸途径相关酶基因的表达和功能分析[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2009.
Song F N. Expression and functional analysis of correlative enzyme gene of lignin Phenylpropanoid Biosynthetic Pathway in *Betula Platphylla*[D]. Harbin:Northeast Forestry University,2009.
- Ye Z H. Association of caffeoyl coenzyme A3-O-methyltransferase expression with lignifying tissues in several dicot plants[J]. *Plant Physiology*,1997,115(4):1341-1350.
- 黄春琼,刘国道,郭安平. 反义 *CCoAOMT* 基因调控烟草木质素的生物合成[J]. *安徽农业科学*,2008,36(19):8026-8027,8043.
Huang C Q, Liu G D, Guo A P. Lignin biosynthesis regulated by antisense *CCoAOMT* gene in tobacco[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*,2008,36(19):8026-8027,8043.
- 王玲,田敏,段红平,等. 反义 *CCoAOMT* 基因转化烟草调控木质素生物合成[J]. *江苏农业科学*,2011,39(2):62-64.
Wang L, Tian M, Duan H P, et al. Study on content and ratio of lignin in transformed tobacco plants changed by antisense *CCoAOMT*[J]. *Jiangsu Agricultural Science*,2011,39(2):62-64.
- 倪志勇,吕萌,范玲. 棉花咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶基因的克隆及特征分析[J]. *西北植物学报*,2010,30(6):1083-1091.
Ni Z Y, Lü M, Fan L. Cloning and characterization of *CCoAOMT* gene from *Gossypium hirsutum* L.[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*,2010,30(6):1083-1091.
- Guo D J, Chen F, Inoue K, et al. 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.
- 刘红梅,胡尚连,卢学琴,等. 青杨 *CCoAOMT* 基因的克隆及其生物信息学分析[J]. *湖北农业科学*,2014,53(11):2670-2674.
Liu H M, Hu S L, Lu X Q, et al. Cloning and bioinformatics analysis of *CCoAOMT* gene of *Populus cathayana* Rehd [J]. *Hubei Agricultural Science*,2014,53(11):2670-2674.
- 赵华燕,魏建华,路静,等. 利用反义 *CCoAOMT* 基因培育低木质素含量毛白杨的研究[J]. *自然科学进展*,2004,14(9):1067-1071.
Zhao H Y, Wei J H, Lu J, et al. Studies on the cultivation of *Populus tomentosa* with low lignin content by antisense *CCoAOMT* gene[J]. *Progress in Natural Sciences*,2004,14(9):1067-1071.
- 魏建华,王彦珍,王宏芝,等. 抑制 *CCoAOMT* 表达的转基因杨树的制浆性能[J]. *科学通报*,2008,53(21):2612-2616.
Wei J H, Wang Y Z, Wang H Z, et al. Pulping performance of transgenic poplar with depressed Caffeoyl-CoA O-methyltransferase[J]. *Chinese Science Bulletin*,2008,53(22):3553-3558.
- 张学科,刘文俊,朱明华,等. 木质素酚醛树脂的研究进展[J]. *植物研究*,2012,32(6):760-764,769.
Zhang X K, Liu W J, Zhu M H, et al. Research progress of phenol-formaldehyde resin[J]. *Bulletin of Botanical Research*,2012,32(6):760-764,769.
- 赵华燕. 利用反义 RNA 技术进行木质素生物合成调控的研究[D]. 北京:中国科学院研究生院,2004.
Zhao H Y. Studies on the regulation of lignin biosynthesis by antisense RNA technique[D]. Beijing:Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Institute of Botany,2004.
- Shi R, Sun Y H, Li Q Z, et al. Towards a systems approach for lignin biosynthesis in *Populus trichocarpa*: transcript abundance and specificity of the monolignol biosynthetic genes[J]. *Plant and Cell Physiology*,2009,51(1):144-163.
- 陈肃. 白桦 *4CL* 与 *CCoAOMT* 基因表达分析及蛋白预测[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2009.
Chen S. Expression and forecast of *4CL* and *CCoAOMT* of Birch[D]. Harbin:Northeast Forestry University,2009.
- 姜爽. *CCoAOMT* 和 *4CL* cDNA 的克隆及转基因紫穗槐的研究[D]. 长春:吉林大学,2007.
Jiang S. Cloning of two cDNA encoding *CCoAOMT* and *4CL* and their transformation in *Amorpha fruticosa* [D]. Changchun:Jilin University,2007.
- 赵华燕,魏建华,宋艳茹. 木质素生物合成及其基因工程研究进展[J]. *植物生理与分子生物学报*,2004,30(4):361-370.
Zhao H Y, Wei J H, Song Y R. Advances in research on lignin biosynthesis and its genetic engineering[J]. *Journal*

- of Plant Physiology and Molecular Biology, 2004, 30(4): 361-370.
16. Wagner A, Tobimatsu Y, Phillips L, et al. *CCoAOMT* suppression modifies lignin composition in *Pinus radiata*[J]. The Plant Journal 2011, 67(1): 119-129.
17. 贾彩红. 低木质素含量的转基因毛白杨(*Populus tomentosa*)的获得与毛白杨 4CL 基因启动子的克隆[D]. 保定: 河北农业大学, 2004.
- Jia C H. Obtaining the transgenic poplars with low lignin content and cloning of 4CL promoter from Chinese white poplar(*Populus tomentosa*) [D]. Baoding: Hebei Agricultural University 2004.
18. 徐洋, 蒯占兵, 马庆虎. 木质素与人类生活[J]. 植物杂志 2002(4): 40-41.
- Xu Y, Lin Z B, Ma Q H. Lignin and human life[J]. Plants 2002(4): 40-41.
19. Umezawa T. The cinnamate/monolignol pathway[J]. Phytochemistry Reviews 2010, 9(1): 1-17.
20. 涂红艳, 刘元凤. 反义 RNA 的作用机理及其在植物基因工程领域的应用[J]. 生物磁学 2005(02): 32-34.
- Tu H Y, Liu Y F. The mechanism of antisense RNA and its application in plant gene engineering[J]. Biomagnetism. 2005(02): 32-34.
21. 马兴亮, 刘耀光. 植物 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统与突变分析[J]. 遗传 2016, 38(2): 118-125.
- Ma X L, Liu Y G. CRISPR/Cas9-based genome editing systems and the analysis of targeted genome mutations in plants[J]. Hereditas 2016, 38(2): 118-125.

稿件格式要求

1. 稿件可用中英文两种语言撰写。按以下顺序书写: 题目(一般不超过 20 字)、作者姓名(署名不宜超过 6 位)、作者单位(附所在城市和邮编)、摘要、关键词(3~8 个)、中图分类号、文献标识码。英文题目、作者姓名(汉语拼音)、作者单位(英文)、英文摘要、关键词、正文、致谢(可无)、参考文献、图版说明。中英文摘要应详细概括目的、方法、结果和主要结论。

2. 来稿首页注脚应注明第一作者简介(包括出生年月、性别、职称、学位及主要从事研究方向); 基金资助的研究项目名称和编号。

3. 外文字母大小写必须分清, 数字或符号的斜体、上下标必须标明。凡文中首次出现的植物属、种须附拉丁文学名(一定用斜体), 并核对无误。量和单位按我国法定计量单位以及国际标准中规定书写。外文学术名词术语的译名用通用译名, 在文中第一次出现时应注明全称。文中的表格与插图中的所有文字均需具中、英文两种文字, 表格用三线表形式。插图须在文中相应处直接给出, 并在图下方给出中、英文图题。插图须用硫酸纸、高级白纸黑墨清绘或用 600dpi 分辨率电脑打印(插图尽可能大些尺寸)插图线条务求准确光洁。插图原件应注明次号。图版照片要求排列整齐紧凑, 照片应清晰、层次分明、黑白反差大。按 20cm × 16cm 版心贴于白纸上。图与实物的比例用线段比例尺在图中标注, 以便缩放自如。图题、坐标的标目名称、单位要给齐全。新植物种要给出硫酸纸绘制的模式图, 标出比例线段。图的大小为: 半栏图宽 5~6cm, 通栏图宽 10~13cm。

4. 本刊参考文献采用顺序编码制。请作者主要引用国内外同行发表的相关论文。未公开发表的资料请勿列入, 但可以脚标形式标注, 请参照本样刊。

《植物研究》编辑部