科学通报 2008 年 第 53 卷 第 21 期: 2612 ~ 2616
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

抑制 *CCoAOMT* 表达的转基因杨树的制浆性能

魏建华[①], 王彦珍[①], 王宏芝[①], 李瑞芬[①], 林楠[①], 马荣才[①], 曲乐庆[②], 宋艳茹[②*]

① 北京农业生物技术研究中心, 北京市农林科学院, 北京 100097;
② 中国科学院植物研究所, 北京 100093
* 联系人, E-mail: songyr@ns.ibcas.ac.cn

2008-06-30 收稿, 2008-08-08 接受
国家自然科学基金(批准号: 30671699)、国家林业局"引进国际先进科学技术"项目(批准号: 2008-4-26)、北京市自然科学基金(批准号: 5072013)和北京市科委转基因重大专项(批准号: Z07070501770701)资助

摘要 检测了生长 3 年的转反义 *CCoAOMT* 基因杨树(*Populus tremula* × *Populus alba*)的制浆性能. 该株系木质素含量比野生型对照下降约 13%, G/S 略有增加. 化学成分分析表明, 转基因杨树的灰分含量、冷水抽提物、热水抽提物、1% NaOH 抽提物、综纤维素、戊聚糖及纤维素含量与野生型对照没有明显差别, 但转基因杨树的苯醇抽提物含量略有增加. 纤维特征分析表明, 转基因杨树的纤维品质有所提高. 实验室小规模制浆实验表明, 降低木质素含量可以明显改善转基因杨树的制浆性能, 表现为木质素更易于去除、纸浆得率增加和纤维聚合度提高.

关键词
CCoAOMT
转基因杨树
木质素
制浆实验

木质素(lignin)在自然界中含量仅次于纤维素, 是维管植物细胞壁的重要组分, 具重要生物学功能. 对于植物本身很重要的木质素有时并不利于人类对某些资源植物的利用, 如制浆造纸的中心环节就是用强酸、强碱与高温等极端手段去除木质素, 保留纤维素用于造纸. 制浆过程消耗大量的化学品和能源, 并产生可污染环境的大量造纸废液. 通过木质素调控可以达到改良造纸材性的目的[1]. 木质素的存在还影响反刍动物对饲草营养的消化和吸收[2]. 利用木质纤维进行燃料酒精发酵的生物质能源生产中也需要通过预处理先脱除木质素, 后用于降解与发酵, 木质素的存在是限制木质纤维应用的主要屏障[3].

目前, 通过转基因手段改良植物木质素生物合成调控的途径主要有两方面: 一是降低木质素含量; 二是改变木质素的组成结构, 使木质素易于脱除. 研究表明, 抑制一些基因, 如 *C4H*, *4CL*, *CCoAOMT* 和 *HCT* 等编码基因的表达, 均可有效地大幅降低木质素含量; 而过表达 F5H 或抑制 *CAD* 编码基因的表达虽然不能有效大幅降低木质素含量, 但木质素组成与结构发生显著改变而易于去除[2]. 咖啡酰甲基转移酶(caffeoyl CoA O-methyltransferase, CCoAOMT)催化木质素单体合成中一个甲基化过程, 抑制烟草和杨树中 *CCoAOMT* 的表达可显著降低木质素含量[4,5], 且导致木质素结构上的致密性降低[5].

迄今为止, 仅有几篇文献报道了木质素生物合成调控的转基因植物的制浆实验结果. 例如, Lapiere 等人[6]报道了抑制 CAD 表达的、生长两年的转基因杨树的制浆实验. CAD 催化木质素单体合成的最后一步反应, 其表达被抑制后木质素含量降低的幅度不大, 但引起羟基肉桂醛等木质素单体的前体物质参与了木质素聚合, 造成木质素结构发生改变而利于在制浆过程中被脱除. Pilate 等人[7]报道了生长 4 年的抑制 CAD 表达的转基因杨树的制浆实验, 结果表明转基因杨树的纸浆产量增加、质量提高. Huntley 等人[8]对 F5H 过量表达的、种植于温室的转基因杨树进行制浆实验, 结果表明由于 S/G 比大幅增加而使木质素更易于去除, 纸浆产量显著增加. 这些研究中, 转基因植物制浆性能改良的主要原因是木质素组分与结构发生改变而易于脱除. 虽然已有木质素含量大幅下降(10%以上)的转基因植物报道, 但缺乏这些转基因植物的制浆实验研究.

我们在前期研究中用反义 RNA 技术抑制

CCoAOMT 的表达[9]，获得了木质素含量降低的转基因杨树，现已进入生物安全实验的环境释放阶段. 本文对生长 3 年的转基因杨树进行了制浆实验，结果表明，降低木质素含量可使木质素更易于去除，明显改善了转基因杨树的制浆性能，包括提高纸浆的产量和质量.

1 材料与方法

(ⅰ) 植物材料. 转基因株系 YAPCOA38 是我们几年前通过把反义 *CCoAOMT* 导入杨树(*Populus tremula* × *Populus alba*)中获得的转基因株系[9]，在田间已种植 3 年以上. 转基因株系与野生型对照均各取材 5 株，把茎杆的外皮剥掉，切成木片干燥后分别混在一起进行化学成分分析和制浆实验.

(ⅱ) Western blot 分析. 将茎杆的树皮剥掉，刮取次生木质部，搜集起来进行蛋白提取，经 SDS-PAGE 电泳后，根据文献报道进行 Western blot 分析[10].

(ⅲ) 化学成分分析. 灰分分析(GB2677.3-1998)、冷/热水抽提(GB2677.4-1998)、1% NaOH 抽提(GB2677.5-1998)、苯醇抽提(GB2677.6-1998)、综纤维素含量分析(GB2677.10-1998)、戊聚糖含量分析(GB2677.9-1998)及 Klason 木质素含量分析(GB2677.8-1998)参照中国造纸工业技术协会制定的相关标准进行.

(ⅳ) 纤维特征检测. 先用沸水处理木屑 1 h，待冷却后加入 H_2O_2∶HAc (2∶8，体积比)混合液 60℃水浴直至纤维分解，用自来水冲洗后在自动纤维分析仪(Kajaani FS-100)上分析纤维长度，在显微镜下测量纤维宽度、壁腔比和胞腔壁厚度.

(ⅴ) 硫酸解法测定木质素组分. 采用硫酸解法处理后用气相色谱(GC)分析木质素中丁香醇残基(S)和松柏醇残基(G)的比率，即 S/G. 具体方法见文献[11]. 气像色谱仪为 Agilent 6890N，色谱柱为 DB-1EI(70ev)，载气为氦气.

(ⅵ) 制浆实验. 采用硫酸盐法蒸煮，取约 500 g 木屑作为材料，用碱量采用 3 个水平，分别为 18%，20%和 22% (以 Na_2O 计)，硫化度为 18%，液固比 1∶5. 其他条件为：升温时间 2 h，最高温度 170℃，保温 1 h. 蒸煮后的浆料经过洗涤、湿浆解离后，在筛孔为 0.25 mm 的平板振动筛中筛选，收集细浆，压榨、平衡水分后备用. 有关分析测定按《造纸工业化学分析》中的方法进行. 在实验室用 Jokyo Mill (德国)离心磨打浆，后在 Rapid Köthen 手抄片机上抄纸，定量控制在 60 g/m^2 左右，测定纸张的物理强度和白度.

2 结果分析与讨论

2.1 转基因杨树中 CCoAOMT 的表达水平

以前的检测表明，转基因株系中可能含有两个拷贝的反义 *CCoAOMT* 基因[9]. 本文用 Western blot 检测了生长 3 年的茎秆次生木质部中 CCoAOMT 的表达水平，结果见图 1，可见转基因杨树中 CCoAOMT 的表达在生长第 3 年仍维持着显著的抑制水平.

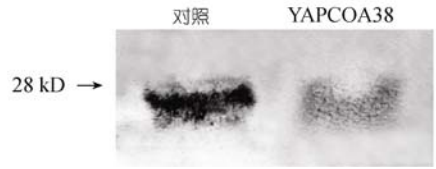


图 1 CCoAOMT 表达水平的 Western blot 分析

2.2 Klason 木质素含量测定与 S/G 比分析

本文测定了生长 3 年的转基因杨树与对照茎秆的 Klason 木质素含量(表 1)，YAPCOA38 的木质素含量为 15.97%，野生型对照为 18.41%. 转基因株系比对照木质素含量下降约 13.25%.

表 1 木质素含量与 S/G 比分析

	木质素含量 (%)	S/G 比
APCOA38	15.97±0.64	2.14±0.02
对照	18.41±0.27	2.10±0.02
t 检验 a)	*	*

a) *, *t* 检验显著水平, $P < 0.05$

采用硫酸解法分析木质素的组分，结果表明(表 1)，转基因杨树的 S/G 比为 2.14，野生型对照为 2.10. YAPCOA38 与野生照对照相比，S/G 比略有增加(约 2%). 硫酸解法主要是打断木质素中的β-O-4 连接键. β-O-4 不仅是木质素中一种主要的连接键型，也是造纸过程中脱除木质素时裂解的主要连接键. 硫酸解法主要释放通过β-O-4 连接在一起的 G 或 S 型木质素，因此硫酸解法可以反映木质素中β-O-4 的含量以及木材对制浆化学品的耐受程度[6]. 转基因株系中 S/G 比略高是有利于制浆造纸的.

抑制 CCoAOMT 的表达可以显著降低转基因植株，如烟草[12,13]、苜蓿[14,15]和杨树[4,5]中的木质素含量，且在转基因烟草与杨树中，木质素含量下降幅度在

12%~50%之间. 本文的结果与已有的研究类似, 但 Meyermans 等人[4]获得的转基因杨树 S/G 比增加了 11%, 而本文仅略有增加. 考虑不同转基因植株间的固有差异、树龄及生长条件的不同, 本文与上述文献的研究结果具有可比性.

2.3 化学成分分析结果

对转基因杨树与野生型对照进行化学成分分析(表 2), 结果表明, APCOA38 与对照的灰分含量、冷水抽提物、热水抽提物、1% NaOH 抽提物、综纤维素含量、戊聚糖含量、纤维素含量没有明显差别, 仅转基因株系的苯醇抽提物比对照显著降低. 苯醇抽提物主要包含蜡质、脂类、树脂、固醇、非挥发性碳氢化合物、低分子量糖及少部分盐类和其他水溶性物. 木材中的苯醇抽提物并不有利于制浆造纸, 转基因杨树中较低含量的苯醇抽提物对制浆过程是有利的. 戊聚糖反映半纤维素含量, 综纤维素是半纤维素与纤维素含量的总和. 可以看出, 转基因杨树木质素含量下降, 纤维素含量没有受到显著影响.

表 2 化学成分分析

	对照(%)	YAPCOA38 (%)	*t* 检验 a)
灰分	0.51 ± 0.03	0.58 ± 0.01	–
冷水抽提物	2.08 ± 0.19	2.23 ± 0.03	–
热水抽提物	3.38 ± 0.03	3.57 ± 0.08	–
1% NaOH 抽提物	20.34 ± 0.21	21.60 ± 0.61	–
苯醇抽提物	3.43 ± 0.10	2.79 ± 0.03	*
综纤维素	89.76 ± 2.32	90.31 ± 0.07	–
戊聚糖	25.33 ± 2.28	25.05 ± 0.40	–
纤维素	64.43 ± 1.06	65.26 ± 0.51	–

a) *, *t* 检验显著水平, $P < 0.05$; –, *t* 检验未达到显著水平, $P > 0.05$

2.4 转基因杨树与对照的纤维质量分析

对纤维特征进行分析的数据是至少 100 个统计值的平均值, 所以没有进行统计分析. 对生长 3 年的转基因株系 YAPCOA38 及野生型对照的木材比重和纤维宽度、纤维胞腔壁厚、壁腔比及纤维长度进行测定(表 3), 表明 YAPCOA38 的比重略有增加, 且纤维宽度、纤维壁厚和壁腔比较对照株系均有所提高. 纤维长度测量结果(表 4)表明, 转基因株系的纤维长度比对照略高, 并与纤维长度在 0.61 mm 以上分布频率(图 2)较高相吻合, 因此可以认为转基因杨树中的纤维长度比对照有所增加. 木材比重、纤维壁腔比及纤维长度增加对制浆造纸是有利的.

表 3 木材比重和纤维特性

指标	对照	YAPCOA38
比重/g · cm^{-3}	0.45	0.48
纤维宽度/μm	10.97	11.37
细胞腔径/μm	6.51	6.35
细胞壁厚/μm	2.23	2.51
壁腔比	0.69	0.79
纤维长度/mm	0.70	0.71
>0.61 mm 纤维的频率(%)	69.55	73.17

表 4 纤维长度

	对照	APCOA38
重均纤维长度/mm	0.56	0.58
二重重均纤维长度/mm	0.70	0.71
数均纤维长度/mm	0.41	0.44

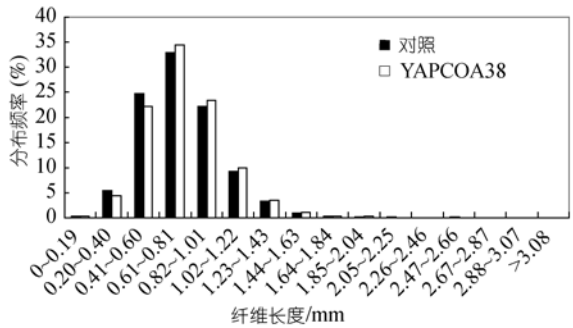


图 2 纤维长度分布模式

尚没有文献报道抑制木质素的合成可以改善纤维的品质, 本文中转基因杨树的纤维品质改善的原因尚需深入研究.

2.5 制浆实验结果

本文对转基因杨树和对照进行了实验室小规模的制浆实验, 分别设置 18%, 20%和 22% 共 3 个活性碱水平, 测定纸浆得率、纤维聚合度及 Kappa 值 3 个指标, 结果(表 5)表明, 转基因株系 YAPCOA38 的纸浆得率和纤维聚合度均显著高于野生型对照. 纤维聚合度反映纤维素链的平均长度, 为纸浆质量的重要指标, 值越高表明纸浆质量越好. 纸浆的 Kappa 值虽然只在 18%碱水平下呈现显著差异, 但总体趋势可以看出转基因植株的纸浆 Kappa 值均比对照低. Kappa 值反映残留在纸浆中的木质素含量水平, Kappa 值越低表明木质素残留越少, 纸浆的质量越高.

蒸煮后的纸浆样品不经过漂白直接在 Jokro Mill (德国)离心磨上进行打浆处理, 然后在 Rapid Köthen 手抄片机上抄纸. 对纸张物理性能进行检测, 结果

表 5　制浆实验结果

碱水平	18%		20%		22%	
	对照	YAPCOA38	对照	YAPCOA38	对照	YAPCOA38
纸浆得率 (%)	50.09 ± 0.52	53.91 ± 0.28	44.50 ± 1.64	48.41 ± 1.81	45.11 ± 1.52	45.62 ± 1.61
t 检验 a)	*		*		*	
Kappa 值	13.6 ± 0.3	13.0 ± 0.4	9.8 ± 0.4	9.6 ± 0.3	9.0 ± 0.3	8.7 ± 0.1
t 检验 a)	*		–		–	
纤维聚合度	1345 ± 31	1416 ± 21	953 ± 20	990 ± 26	785 ± 6	792 ± 7
t 检验 a)	*		*		*	

a) *, *t* 检验显著水平, $P < 0.05$; –, *t* 检验未达到显著水平, $P > 0.05$

(表 6)表明, 转基因株系成纸白度、裂断长、撕裂指数较对照都有所提高, 成纸质量得到改善. 成纸裂断长与纸浆纤维间的结合强度成正相关, 纸张的撕裂指数与纤维长度成正相关, 本文中转基因杨树抄纸物理强度的增强可能源于纤维品质的提高.

表 6　转基因杨树抄纸与对照纸张物理性能检测

指标	对照	YAPCOA38
打浆度/SR	42.5	45.0
白度(% ISO)	28.6	30.1
定量/g·cm^{-2}	62.9	62.7
裂断长/km	7.95	8.12
撕裂指数/mN·m^2·g^{-1}	7.10	7.90

制浆实验的目的在于检测生长 3 年的转基因杨树的制浆性能. 目前还未见到其他有关大幅降低木质素含量的转基因杨树的制浆实验文献. 在现有报道中, 制浆实验使用的是抑制 CAD 表达或 F5H 过表达的转基因杨树, 木质素含量下降幅度较小, 制浆性能的改良主要是由于木质素组成结构的改变. 木质素含量大幅下降后对制浆性能的影响尚未见到公开的文献报道.

本研究基因杨树的木质素含量比对照下降约 13%, 而 S/G 比变化很小, 因此可以认为, 本文中转基因杨树制浆性能的改善主要是由于木质素含量降低引起的. 在 18%, 0%和 22%的碱水平下, 转基因杨树的纸浆得率比对照分别提高 4.41%, 204%和 3.3%, 而 Kappa 值降低 4.41%, 2.04%和 3.3%. 低 Kappa 值表明转基因杨树中的木质素更易于脱除. Pilate 等人[7]报道了抑制 CAD 表达的 4 龄转基因杨树的制浆实验, 虽然可提高纸浆得率、降低 Kappa 值, 但纤维聚合度没有明显的改变. 本文的制浆实验结果表明, 大幅降低木质素含量的转基因株系纸浆的纤维聚合度也有所增加, 在 3 个碱水平下分别提高 5.28%, 3.88%和 0.89%. 综上, 制浆实验结果表明, 降低转基因杨树中的木质素含量可以显著改善杨树的制浆性能, 包括提高纸浆得率和质量、容易脱除木质素和增加纤维聚合度. 成纸的物理性能检测结果表明转基因植株抄纸的白度和撕裂指数均高于对照, 表明转基因杨树的成纸质量有所提高.

抑制 *CCoAOMT* 的表达, 转基因植物除了解剖结构表现出部分维管细胞壁发生变形或塌陷外, 植株整体一般呈正常生长发育特征[5,13]. 杨树是多年生林木植物, 低木质素转基因杨树全生育期的生长发育特征、木质素随树龄的变化规律及高树龄杨树的制浆性能还需进行多年的观察和实验. 近年来, 生物质能源的研究与应用越来越受到全球的瞩目, 其中未来发展的一个重要方向是用木质纤维生产燃料酒精. 这项技术中木质素也是阻碍纤维素水解的重要因素之一, 需要通过预处理进行脱除. 抑制植物木质素生物合成, 降低木质素含量非常有利于木质纤维酒精发酵的生物质能源利用[16]. 本文中的转基因杨树的木质素含量下降 13%, 在制浆实验中表现出易于脱除的特征. 虽然制浆与酒精发酵的预处理条件不同, 但可以推断本文中的转基因杨树也同样有利于酒精发酵中木质素的脱除.

致谢　感谢中国制浆研究院冯文英博士在制浆实验中提供的大力帮助.

参考文献

1　Baucher M, Halpin C, Petit-Conil M, et al. Lignin: Genetic engineering and impact on pulping. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2003,

38(4): 305—350[doi]
2 Vanholme R, Morreel K, Ralph J, et al. Lignin engineering. Curr Opin Plant Biol, 2008, 11(3): 278—285[doi]
3 Yang B, Wyman C E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. Biotechnol Bioeng, 2004, 86(1): 88—95[doi]
4 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[doi]
5 Zhong R, Morrison W H, Himmelsbach D S, et al. Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. Plant Physiol, 2000, 124(2): 563—578[doi]
6 Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M, et al. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. Plant Physiol, 1999, 119(1): 153—164[doi]
7 Pilate G, Guiney E, Holt K, et al. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. Nat Biotechnol, 2002, 20(6): 607—612[doi]
8 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 Agric Food Chem, 2003, 51(21): 6178—6183[doi]
9 Wei J H, Zhao H Y, Zhang J Y, et al. Cloning of cDNA encoding CCoAOMT from *Populus tomentosa* and down-regulation of lignin content in transgenic plant expressing antisense gene. Acta Bot Sin, 2001, 43(11): 1179—1183
10 Francoise M, Stephane M, Gaelle P, et al. cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-CoA 3-O-methyltrnaferase, a lignin biosynthetic enzyme. Plant Mol Biol, 1998, 36: 427—437[doi]
11 Lapierre C, Pollet B, Rolando C. New insight into the molecular architechture of hardwood lignin by chemical degradative methods. Res Chem Intermediates, 1995, 21: 397—412
12 Zhong R, Morrison W H, Negrel J, et al. Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. Plant Cell, 1998, 10: 2033—2045[doi]
13 Pincon G, Maury S, Hoffmann L, et al. Repression of O-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. Phytochemistry, 2001, 57(7): 1167—1176[doi]
14 Guo D, 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. Plant Cell, 2001, 13(1): 73—88[doi]
15 Marita J M, Ralph J, Hatfield R D, et al. Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. Phytochemistry, 2003, 62(1): 53—65[doi]
16 Chen F, Dixon RA. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. Nat Biotechnol, 2007, 25(7): 746—748