

## 研究报告

### A Letter

# 抑制 *COMT* 基因表达对转基因烟草木质素合成的影响

李雪平<sup>1</sup>, 彭镇华<sup>2</sup>, 高志民<sup>1</sup>, 胡陶<sup>1</sup>

1. 国际竹藤网络中心, 北京, 100102

2. 中国林业科学研究院, 北京, 100091

✉ 通讯作者: pengzh@icbr.ac.cn   ✉ 作者

分子植物育种, 2012年, 第10卷, 第67篇   doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0067

收稿日期: 2012年07月02日

接受日期: 2012年08月17日

发表日期: 2012年12月18日

本文首次发表在《分子植物育种》(2012年第10卷第6期689-692页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

李雪平等, 2012, 抑制 *COMT* 基因表达对转基因烟草木质素合成的影响, 分子植物育种(online) Vol.10 No.67 pp.1493-1496 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0067)

引用格式(英文):

Li et al., 2012, The Effects of Depressing Expression of *COMT* on Lignin Synthesis of Transgenic Tobacco, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.67 pp.1493-1496 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0067)

**摘要** 将绿竹 *COMT* (咖啡酸-O-甲基转移酶)基因(*BoCOMT1*)反向连接到植物表达载体 PBI121 上, 通过农杆菌介导法导入烟草。PCR 检测表明, *BoCOMT1* 基因已反向整合到烟草的基因组中。转基因茎秆在剥皮后呈现淡红色, 而对照为白色。与对照相比, 转基因烟草的木质素含量都有或多或少的下降, 其中下降程度最大的达到了 28.7%。部分转基因植株出现生长矮小现象。

**关键词** 绿竹; *COMT*; 木质素; 转基因

## The Effects of Depressing Expression of *COMT* on Lignin Synthesis of Transgenic Tobacco

Li Xueping<sup>1</sup>, Peng Zhenhua<sup>2</sup>, Gao Zhimin<sup>1</sup>, Hu Tao<sup>1</sup>

1. International Center for Bamboo and Rattan, Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, State Forestry Administration, Beijing, 100102, P.R. China

2. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing, 100091, P.R. China

✉ Corresponding author, pengzh@icbr.ac.cn;   ✉ Authors

**Abstract** The *COMT* (caffeic acid-O-methyltransferase) gene from green bamboo (*Bambusa oldhamii*), *BoCOMT1*, which was aligned reversely in the plant expression vector PBI121, was transformed into tobacco through Agrobacterium-mediated technique. PCR assay showed that *BoCOMT1* gene has been integrated into the genome of tobacco. The peeled stems of transgenic lines appeared in pink, while the control appeared in white. Compared to control, lignin contents of transgenic lines were declined at different degree, of which the biggest decline reached 28.7%. Some transgenic plants were growing slowly and appearing dwarfing.

**Keywords** Green bamboo; *COMT*; Lignin; Transgene

### 研究背景

木质素是植物体中一种重要的组成成份。木质素的存在一方面增强了植物体的支撑能力, 但另一方面也给一些工业加工过程带来不便。尤其是在造纸工业中, 除去木质素所用的化学试剂是造成环境污染的主要因素。因此, 一直以来, 研究人员致力于木质素代谢调控的研究, 希望培育出满足不同利用要求的植物新品种。在植物木质素的生物合成过程中有一系列的合成酶在发挥着重要作用, *COMT* 就是其中之一。研究人员从不同植物中分离到多个 *COMT* 基因。将 *COMT* 基因反向转入杨树中, 导致

了转基因杨树木质素含量的下降和成分的改变 (Lapierre et al., 1999; Jouanin et al., 2000; 赵华燕等, 2002, 科学通报, 47(6): 604-607)。在转反义 *COMT* 基因的烟草 (Ni et al., 1994)、苜蓿 (Guo et al., 2001) 和杨树 (Dwivedi et al., 1994) 中都发现, S型木质素含量下降较多, 而G型木质素含量下降较少, 而Klason木质素含量的变化趋势则不完全一致, 有的基本没什么变化, 有的却降低, 对这种现象目前还没有确切的解释。Doorselaere等(1995)指出这种情况与检测木质素含量的方法有关, Atanassova等(1995)则认为可能与 *COMT* 活性被抑制的程度有关。

竹子在人们的生产和生活中应用非常广泛, 其木质素含量及组成成分直接关系到竹产品的品质。目前从竹子中克隆到与木质素生物合成相关的基因还比较少, 只有毛竹的C3H、CCR、CAD、F5H-like (杨学文等, 2009; 杨学文, 2009)、黄古竹的PAL (杨学文等, 2009)、慈竹的4CL (周建英等, 2010)等有限几个。绿竹属丛生竹类, 在我国华东和华南分布较多, 是笋材两用竹种。竹笋中的木质素含量对口感影响很大, 而竹材中木质素含量也直接影响到竹材的机械强度。本文将从绿竹叶片中克隆到的*BoCOMT1*基因反向导入烟草中, 进行了相关分析并对基因功能进行了初步验证。

## 1 结果与分析

### 1.1 转基因烟草的PCR检测

经抗性培养基筛选获得的转基因烟草, 经过PCR检测进一步筛选阳性植株(图1), 共获得7个阳性转基因株系。

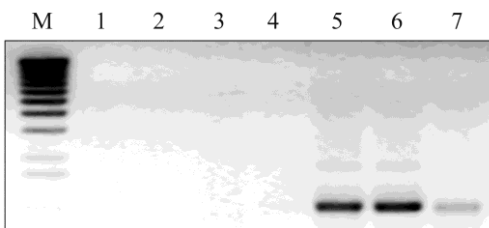


图1 转基因烟草的PCR检测

注: M: DNA marker; 1: 空白对照(水); 2: 野生型对照; 3: 转PBI121空载体对照; 4~7: 转目的基因烟草

Figure 1 The PCR identification of transgenic tobacco

Note: M: DNA marker; 1: Blank control (water); 2: Wild type control; 3: Control of transformed line with PBI121 vector ; 4~7: Transgenic tobacco with target gene

### 1.2 转基因烟草的表型分析

在经过筛选获得的7个转基因株系中, 表型上存在较大差异, 其中4个株系与对照没有明显差异, 基本与对照同时开花, 而另外3个株系则生长比较矮小, 高度仅为对照的一半, 且茎秆也明显较对照细弱, 幼苗期呈倒伏状, 没有开花现象。

### 1.3 转基因烟草与对照茎秆颜色的比较

将转基因烟草与对照在相同的环境条件下进行培养, 成熟后将基部茎段切下, 去皮, 比较两者之间的颜色差异。结果如图2所示, 与对照相比, 转基因烟草茎秆下部呈现淡红色, 而对照基本为白色。将两种茎段在空气中自然干燥, 转基因烟草茎



图2 对照与转基因烟草茎秆颜色的比较

注: A: 转基因株系; B: 对照

Figure 2 Comparison of stem color between control and transgenic tobacco

Note: A: Transgenic line; B: Control

段的颜色越来越淡, 而对照没什么明显变化, 完全风干之后, 两种茎段的颜色都不再发生改变。

### 1.4 Klason法测定转基因烟草中木质素的含量

利用Klason法测定转基因烟草木质素的含量, 结果显示, 在所有7个株系的转基因烟草中Klason木质素含量较对照都有下降, 但程度各有不同。总的来说, 与对照表型接近的4个株系木质素含量下降较少, 而生长矮小的3个株系下降较多, 其中下降最多的达到了28.7%。

## 2 讨论

木质素是植物细胞壁的重要组成成分, 构成纤维支架, 具有增强植物体机械强度的作用, 也有利于提高细胞的运输能力。通过转基因抑制木质素生物合成酶的活性可以达到降低木质素含量的目的, 但有时也会对植物的生长发育带来不良影响, 造成植株生长矮小, 细胞壁变薄等。在转反义PAL基因的烟草中, 当PAL活性下降到1/3以下时, 转基因植株就表现出矮化现象(Boerjan et al., 2003)。Wagner等(2009)也报道当辐射松中4CL酶活性受到严重抑制时, 会导致它象盆景一样矮小。本文的研究中也出现了转基因植株矮化的情况, 推测应该是木质素含量的降低影响了细胞壁的合成, 继而营养成分的运输减少, 从而使生长受到抑制。

转基因烟草与对照相比, 在茎秆基部的颜色上存在比较明显的差异。去掉外皮后, 转基因烟草的茎秆基部呈淡红色, 而对照基本为白色。这种现象在其他转木质素合成调控酶基因的植物中也有发现。例如杨树在转入反义COMT基因(Doorsselaere et al., 1995)或4CL基因(贾彩虹等, 2004)后, 茎秆也都显现出或深或浅的淡红色, 而且颜色的深浅与木质

素含量下降的多少有一定的关系, 木质素含量下降越显著, 淡红色就越深。这种现象在其他一些人的研究也有报道(Zhong et al., 2000; Piquemal et al., 1998; Halpin et al., 1994)。

许多研究结果已经表明, *COMT*基因的表达被抑制后, 木质素的生物合成受到影响, 导致木质素的含量或组成发生改变, 本文的研究结果也证实了这一点。但木质素组份与含量的变化与*COMT*被抑制的程度是否存在相关性还不是很清楚, 这方面的研究结果并不是一致的。在Sewalt等(1997)和Ni等(1994)的研究中, *COMT*活性被抑制越高, 转基因植株木质素含量下降越多。但也有一些人的研究不支持这种变化趋势, Doorselaere等(1995)、Lapierre等(1999)和Tsai等(1998)都发现, 转基因植株的木质素含量与*COMT*活性被抑制程度没有关系, 即使*COMT*活性被抑制达到70%时, 木质素含量却没有明显变化。

### 3 材料与方法

#### 3.1 转化材料

烟草组培苗, 品种为红花大金元。

#### 3.2 反义表达载体的构建

通过PCR扩增在*BoCOMT1*基因两端分别加上*Xba* I 和*Kpn* I 识别位点, 然后反向插入同样带有这两个识别位点的植物表达载体PBI121中(图3), 经过酶切验证后, 利用电击法将质粒转入农杆菌中。

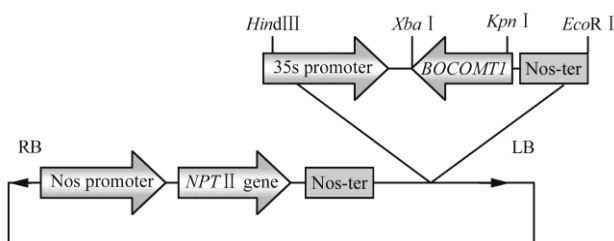


图3 *BOCOMT1*基因插入植物表达载体PBI121的示意图

Figure 3 A diagram of *BOCOMT1* gene inserting into plant expression vector PBI121

#### 3.3 烟草的叶盘法转化及转基因植株的培养

先将烟草在25℃培养室中进行无菌培养, 然后挑选生长状态良好的叶片, 剪成1 cm<sup>2</sup>的小块, 在农杆菌液中浸染3~5 min。取出后用滤纸吸干, 在分化培养基上使其分化出烟草幼苗。然后转到生根培养基上进行生根诱导, 形成一个完整的转基因植株。当

转化的烟草幼苗长到2~3 cm时, 将其转移到培养钵中继续培养。

#### 3.4 转基因烟草的PCR检测

以CTAB法提取对照及转基因烟草的基因组DNA, 然后利用PCR方法检测目的基因是否已经转入烟草的基因组中。

#### 3.5 转基因烟草木质素含量的测定

按照国标GB/T 2677.8-1994测定木粉中酸不溶木质素的含量。

#### 作者贡献

李雪平是本研究的试验设计和实验研究的执行人, 完成数据分析及论文初稿写作; 彭镇华指导试验设计, 数据分析, 论文写作与修改; 高志民、胡陶参与部分试验结果分析。全体作者都阅读并同意最终的文本。

#### 致谢

感谢河北农业大学陈段芬教授在实验过程中的帮助。

#### 参考文献

- Atanassova R., Favet N., Martz F., Chabbert B., Tollier M., Monties B., Fritig B., and Legrand M., 1995, Altered lignin composition in transgenic tobacco expression O-methyltransferase sequence in sense and antisense of itation, *Plant Journal*, 8(4): 465-477 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.8040465.x>
- Boerjan W., Ralph J., and Baucher M., 2003, Lignin biosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54: 519-546 <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938> PMID:14503002
- Doorselaere J.V., Baucher M., Chognot E., Chabbert B., Tollier M., Petit-Conil M., Lepié J., Pilate G., Cornu D., Monties B., Montagu M.V., Inzé D., Boerjan W., and Jouanin L., 1995, A novel lignin on poplar trees with a reduced caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity, *Plant Journal*, 8(6): 855-864 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.8060855.x>
- Dwivedi U.N., Campbell W.H., Yu J., Datla R.S., Bugos R.C., Chiang V.L., and Podila G.K., 1994, Modification of lignin biosynthesis in transgenic *Nicotiana* through expression of an antisense O-methyltransferase gene from populus, *Plant Mol. Biol.*, 26(1): 61-71 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00039520> PMID:7948906
- Guo D.J., Chen F., Inoue K., Blount J.W., and Dixon R.A., 2001, Down-regulation 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*, 13(1): 73-88
- Halpin C., Knight M.E., Foxon G.A., Campbell M.M., Boudet A.M., Boon J.J., Chabbert B., Tollier M., and Schuch W., 1994, Manipulation of lignin quality by down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase, *Plant Journal*, 6(3): 339-350 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1994.06-030339.x>
- Jia C.H., Wang H.Z., Du K.J., Song Y.R., and Wei J.H., 2004, Relationship of lignin content with the stem color in the transgenic poplar with depressed expression of *4CL* gene, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 12(6): 621-624 (贾彩虹, 王宏芝, 杜克久, 宋艳茹, 魏建华, 2004, 抑制*4CL*基因表达的转基因毛白杨中木质素含量与茎杆颜色的关系, *农业生物技术学报*, 12(6): 621-624)
- Jouanin L., Goujon T., De Nada iV., Martin M.T., Mila I., Vallet C., Pollet B., Yoshinaga A., Chabbert B., Petit-Conil M., and Lapierre C., 2000, Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity, *Plant Physiol.*, 123(4): 1363-1374 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.123.4.1363> PMID:10938354 PMCID:59094
- Lapierre C., Pollet B., Petit-Conil M., Toval G., Romero J., Pilate G., Leplé J.C., Boerjan W., Ferret V., De Nadai V., and Jouanin L., 1999, Structural alteration of lignin 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.*, 119(1): 153-164 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.119.1.153> PMID:9880356 PMCID:32214
- Ni W., Paiva N.L., and Dixon R.A., 1994, Reduced lignin in transgenic plants containing a caffeic acid O-methyltransferase antisense gene, *Transgenic Res.*, 3(2): 120-126 <http://dx.doi.org/10.1007/BF01974090>
- Piquemal J., Lapierre C., Myton K., O'Connell A., Schuch W., Grima-Pettenati J., and Boudet A.M., 1998, Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants, *Plant Journal*, 13(1): 71-83
- Sewalt V.J.H., Ni W., Blount J.W., Jung H.C., Masoud S.A., Howles P.A., Lamb C., and Dixon R.A., 1997, Reduced lignin content and altered lignin core position in transgenic tobacco down-regulated in expression of phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase, *Plant Physiol.*, 115: 41-50 PMID:12223790 PMCID:158458
- Tsai C.J., Popko J.L., Mielke M.R., Hu W.J., Podila G.K., and Chiang V.L., 1998, Suppression of O-methyltransferase gene by homologous sense transgene in quaking aspen cause red-brown wood phenotype, *Plant Physiol.*, 117(1): 101-112 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.117.1.101> PMID:9576779 PMCID:34993
- Wagner A., Donaldson L., Kim H., Phillips L., Flint H., Steward D., Torr K., Koch G., Schmitt U., and Ralph J., 2009, Suppression of 4-coumarate-CoA ligase in the coniferous gymnosperm *Pinus radiata*, *Plant Physiol.*, 149(1): 370-383 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.125765> PMID:18971431 PMCID:2613735
- Yang X.W., 2009, Isolation, expression and functional identification of monolignol biosynthesis-related genes from Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*), Dissertation for Ph.D., Chinese Academy of Forestry Sciences, Supervisor: Peng Z.H., pp.26-137 (杨学文, 2009, 毛竹木质素单体生物合成相关基因的分离、表达与功能初步鉴定, 博士学位论文, 中国林业科学研究院, 导师: 彭镇华, pp.26-137)
- Yang X.W., Peng Z.H., Gao Z.M., and Li X.P., 2009, Study on the cloning and expression of a p-coumarate 3-hydroxylase gene in *Phyllostachys edulis*, *Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agricultural Sciences)*, 37(29): 14051-14053, 14197 (杨学文, 彭镇华, 高志民, 李雪平, 2009, 毛竹香豆酸-3-羟基化酶基因的克隆与表达研究, *安徽农业科学*, 37(29): 14051-14053, 14197)
- Zhong R.Q., Morrison W.H., Himmelsbach D.S., Poole F.L., and Ye Z.H., 2000, Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants, *Plant Physiol.*, 124(2): 563-578 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.124.2.563> PMID:11027707 PMCID:59163
- Zhou J.Y., Cao Y., Sun X., Chen K., Lu X.Q., and Hu S.L., 2010, Construction of RNAi carrier of *4CL* gene of *Neosinocalamus affinis* and its transformation into tobacco, *Fujian Linye Keji (Journal of Fujian Forestry Science and Technology)*, 37(2): 28-32 (周建英, 曹颖, 孙霞, 陈珂, 卢学琴, 胡尚连, 2010, 慈竹木质素合成酶基因*4CL* RNAi载体构建与烟草转化, *福建林业科技*, 37(2): 28-32)