

文章编号: 1001-1498(1999) 06-0563-09

树木木质素含量的遗传变异研究进展*

胡新生, 韩凡, 邱德有

(中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要: 针对木质素含量这一数量性状的遗传变异规律进行了综合评述。木质素含量在种、群体、个体等不同层次上均表现出复杂的变异模式, 环境因素有着不同程度的影响。木质素的合成途径有可能存在多条途径的替换或切换, 然而利用基因工程技术对某些酶如 PAL、4CL、C4H 和 CCR 等酶改造时, 在一定的程度上可以降低木质素含量, 而对其它酶如 OMT、CAD 和 F5H 等酶改造时, 并不降低木质素含量, 有些酶基因的反义转化可以改造木质素的组成和化学性质, 但这些研究仍需要田间的稳定评估试验加以肯定。鉴于此, 为进一步认识木质素含量遗传变异规律, 除了进行多酶转基因研究外, 作者认为采用谱系明确的材料进行控制木质素含量基因定位和分离研究, 并从分子水平上探讨环境对木质素含量变异的机理具有重要的意义。

关键词: 树木; 木质素含量; 遗传变异; 基因工程

中图分类号: S781.41; S718.46

文献标识码: A

木质素是由三种醇单体或单木质酚(对香豆醇、松柏醇、芥子醇)合成的一种复杂的酚类聚合物^[1]。在细胞壁的木质化过程中, 木质素渗入到细胞壁中, 填充于纤维素构架内, 如导管和管胞细胞的形成。由于木质素的渗入, 加大了细胞壁的硬度, 增强了细胞的机械支持力或抗压强度, 促进机械组织的形成, 以有利于巩固和支持植物体及水分输导等作用, 同时由于木质素的化学特性, 如不可溶性和复杂的酚类聚合物, 使得木质部具有细胞壁疏水性, 也增强了抗病能力。

然而, 木质素与人类生活有密切的关系, 如高含量木质素的木材对于能源获取有利。在利用木材为原料制浆过程中, 木质素的存在不利于生产纸浆, 必须采用其它途径进行木质素降解。之外, 木质素对生物降解的抗性也会影响地球碳循环的速率。因此, 从木质素对植物本身适应生存的影响和人们造纸需求关系上看, 存在着矛盾。为此研究木质素生物合成机制、木质素含量的遗传变异规律对于改造和利用木质素具有重要的意义。过去虽然对木材许多材性性状如解剖特征等的遗传变异进行过详细的研究, 但对木质素含量的遗传变异研究却很少^[2]。近几年来逐渐报道了一些通过调查选择适当造纸材料的研究^[3,4], 特别是报道通过转基因工程的研究等以期显著地改变木质素含量, 人们对木质素含量遗传变异有了深一步的认识, 以下将从表型变异到基因遗传操纵逐步深入地进行简要阐述。

收稿日期: 1998-11-09

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金。

* 本文写作过程中李明亮博士给予了热情的帮助, 在此表示感谢!

第一作者简介: 胡新生(1964-), 男, 江西乐平人, 副研究员, 遗传育种学博士, 生理生态学博士。

1 不同层次上木质素含量变异特点

1.1 种间变异

在木材的化学组成上,因树种不同木质素占干木材成分的18%~36%^[5]。木质素含量在树种间存在着变异,如裸子植物和被子植物木质素含量存在着明显变异,裸子植物的木质素含量要比被子植物高。鲍甫成等^[6]研究表明树种间木质素含量表现出明显的不同,且不同天然林和人工林及树木年龄有不同程度的变化,针叶树人工林的木质素含量要比阔叶树人工林的木质素含量高。在中野准三等^[1]书中也有类似的报道。

1.2 种内群体间变异

同一种内,木质素含量在群体间和群体内的变异规律为木质素的遗传改良提供了重要的信息。Veveris^[7]研究云杉(*Picea asperata* Mast.)的木材化学组成时发现木质素含量在群体间的变异很小。Pereira等^[8]研究含羞草科植物(*Mimosa scabrella*)3个种源的木质素含量变异时,也发现种源间木质素含量无显著差异。徐有明等^[9]对在中国栽培的10年生的10个火炬松(*Pinus taeda* L.)种源的木质素含量遗传变异测定表明,种源间的木质素含量差异不显著,且种源内的遗传变异要大于种源间的变异。进一步估算木质素含量的广义遗传力为0.003,并发现木质素含量变异与种源所处的纬度、经度、无霜期、年均温及年降雨量相关不密切,同时与胸径及年轮宽度无关。徐有明等^[9]认为火炬松引种、栽培和改良时,可以不考虑树木生长率和地理气象条件对木材化学组成的影响。从这3个例子似乎可以看出木质素含量变异主要分布在群体内,实际遗传改良时应重视群体内个体间的木质素含量遗传变异。

1.3 个体间变异

群体内基因型间木质素含量变异模式较为复杂,且因树种而异。Donaldson等^[10]研究辐射松(*P. radiata* D. Don)10个无性系间的中部片状木质素浓度的遗传变异时,发现木质素含量存在显著的变异,无性系重复力为0.70,变异系数为0.09,表现出一定的稳定性。Osta等^[11]在分析5株细枝木麻黄(*Casuarina cunninghamiana* Miq.)防风林树种时,发现木质素含量在个体间和个体内(随伐根以上的高度)均存在变异,其中总变异的48.1%分布于个体间,14.8%的变异分布于随树干高度变化的树木个体内。Miyata等^[12]分析了日本赤松(*P. densiflora* Sieb. et Zucc.)和日本黑松(*P. thunbergii* Parl.)未成熟和成熟木材化学组成的无性系变异,认为日本赤松的无性系间木质素含量有显著差异,其重复力为0.59(成熟)和0.33(未成熟),而日本黑松则差异不显著,重复力为0.42(成熟)和0.12(未成熟)。Molotkov等^[13]调查了一个65年生桦树林分内的3个径级(8~12、14~18、20~24 cm),每个径级分析10株个体,每株分析3段(径干高度的0.25、0.5、0.75处)样木的木材化学组成,结果显示处理间木质素含量无显著差异。由这些例子和根据遗传力(或重复力)值可以看出木质素含量的遗传变异因树种变化较大。

1.4 个体内变异

在植物不同的生长发育阶段,木质素填充于细胞壁内的纤维框架内的过程有可能导致个体内非均匀分布。Kawachi^[14]做了以100年生的日本柳杉(*Cryptomeria japonica* D. Don)为材料的分析,取1.2 m到25.2 m的树干,每隔2 m分析树干5个年轮的圆盘样品,结果显示木质素含量随着树干高度变化而逐渐地减少。个体内木质素含量除了在垂直分布上的变异外,还在径向分布上也表现出变异,如在心材和边材、春材和秋材的分布。大多数针叶树心材木质素比边材

少,而在阔叶树中则无明显差异,秋材的木质素含量比春材少^[1]。

1.5 木质素与其它性状相关变异

由于基因连锁或一因多效作用,控制木质素含量基因可能会与其它性状的基因关联,这为通过相关性选择来改良木质素含量变化提供了重要的信息,然而木质素含量与其它性状的相关性也因树种而异。Vital等^[15]在研究用于生产木炭的赤桉(*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh)的生长性状和木材性状的遗传变异时,发现木质素含量与木炭产量呈正相关,而与木材其它提取物呈负相关。在分析美国东北部和加拿大扭叶松(*P. contorta* Loud.)地理分布区域的两个变种的木材化学组成变异时,Campbell等^[16]观测到其心材和边材木质素含量并无差异,而与树干高度呈正相关。Khurana等^[17]分析了缘毛场(*Populus ciliata* Wall ex. Royle)的18个种源(平均树龄为21~59 a)木材化学成分变异,这些种源划分为2组:一组是散生在有针叶树和阔叶树的温带林内(13个),另一组为河流沿岸的纯林(5个)。每个种源分析雌雄株各5株,在胸径处取1.1 cm × 10 cm 髓条样品,分析显示出木质素含量与胸径呈显著的正相关,与纤维长呈显著的负相关,并观测到木质素含量随生长性状(高度、胸径)的变异在雌株中要比在雄株中更大。同样,Manville等^[18]分析来自内陆和海岸干湿地20个点的花旗松(*Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco)的枝和茎干中木材提取物随地理位置变异时,观测到木质素含量与胸径呈正相关。Pugach^[19]研究发现欧洲赤松(*P. sylvestris* L.)叶片、树干及根部中的木质素含量与-10 的天数呈正相关,表现出一定的地理变异。然而,徐有明等^[9]的研究结果却显示,火炬松的木质素含量与生长性状无关。这些实例说明木质素含量与其它变量有着复杂的关联性。总之,木质素含量遗传变异模式在不同层次上及与其它变量的关系上有十分复杂的表现,因树种而表现不全一致,环境因子有不同程度的影响。

2 木质素合成途径

2.1 合成途径

综合文献[1, 20, 21]进行分析和推测,木质素合成可以简要概括为两大步骤(图1):木质素前体即单木质酚生成,即从二氧化碳至对香豆醇、松柏醇及芥子醇;单木质酚脱氢聚合生成木质素。单木质酚的合成途径主要是通过大量的离体试验推测而得的^[1, 19, 20]。而单木质酚是如何聚合生成木质素的机制,木质素大分子的空间结构(有序或无序)等还远非清楚^[5, 20],整个过程涉及到许多酶系,木质素前体的合成及聚合生成木质素的过程十分复杂,至今仍未明确其准确的合成途径^[20, 21]。图1(下页)仅提供了一合成过程的参考图。

图1提供了研究木质素含量的遗传变异部分重要信息,如何控制和改良树木木质素含量及解释木质素异质性形成的原因。至今已有许多试验证明一些酶系控制着木质素含量变化。例如利用细胞培养方法来研究PAL、4CL、OMT等酶对木质素前体的诱导合成试验^[22, 23],证明这些酶的活性与木质素前体浓度的关系。有关详细内容和讨论见参考文献[20]。

2.2 多样化合成途径的可能性

一些植物如苜蓿(*Medicago sativa* L.)等编码其木质素合成过程的一些酶(PAL、4CL、CAD)基因存在多基因族^[20]。Butland等^[24]发现班克松(*P. banksiana* Lamb.)PAL基因族的多个成员(PAL 1~5)。基因家族的存在意味着可能存在有别于图1的其它合成途径。

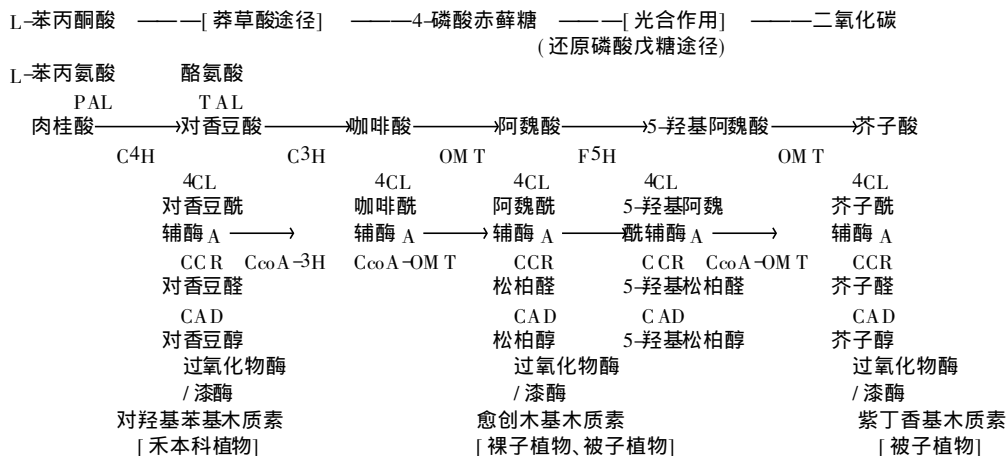


图1 木质素合成的可能途径(根据中野准三等^[1]、Campbell等^[20]、Whetten等^[21]的工作综合绘制而成)

(酶系——PAL: 苯丙氨酸解氨酶; TAL: 酪氨酸氨裂解酶; C4H: 肉桂酸4-羟基化酶; C3H: 对香豆酸3-羟基化酶; OMT: 咖啡酸/5-羟基阿魏酸O-甲基转移酶(COMT/ OMT); F5H: 阿魏酸5-羟基化酶; 4CL: 羟基肉桂酸: 辅酶 A 连接酶; CCR: 羟基肉桂酰辅酶 A 还原酶; CAD: 羟基肉桂醇脱氢酶; CcoA-3H: 4-羟基肉桂酰辅酶 A 3-羟基化酶; CcoA-OMT: 5-腺苷-甲硫氨酸: 咖啡酰辅酶 A/ 5-羟基阿魏酰辅酶 A-O-甲基转移酶)

木质素合成过程中存在许多非常规的亚单位和代谢的可塑性^[21]。当一种牵涉到单木质酚合成有关的酶受到抑制时, 植株个体的木质素含量仍保持在相对稳定水平上, 且会出现非常规的木质素亚单位, 这一现象意味着存在一种补偿性木质素合成机制以防止木质素含量的衰减, 且存在一些未知酶的合成^[21], 因此木质素的合成途径有可能不同于图1所描述的过程或存在切换途径。

3 裸子植物和被子植物木质素差异原因探讨

裸子植物和被子植物间木质素组成不同。裸子植物的木质素主要为愈创木基木质素, 而被子植物同时含有愈创木基木质素和紫丁香基木质素。根据已有的报道^[1, 5, 20], 这些差异的原因可归纳为以下两点: (1) 针叶树缺乏 F5H 酶, 使得阿魏酸 5-羟基阿魏酸 芥子酸不可能实现; (2) 合成途径中的一些酶系 OMT、4CL、CCR 及 CAD 对反应底物的专一性。在针叶树中, 4CL 对阿魏酸底物较专一, 而对芥子酸的作用弱, 然而在有些被子植物中, 4CL 也存在类似的情况, 这一种酶有待进一步研究。OMT 酶有双重活性, 可以对咖啡酸和5-羟基阿魏酸两种底物起作用, 然而其活性在被子植物和裸子植物中却有显著的差异, 裸子植物的 OMT 对5-羟基阿魏酸作用很弱。裸子植物的 CCR 对阿魏酰辅酶 A 和 CAD 对松柏醛都有高度的专一性。引起酶活性差异的原因还有待研究。

为了进一步认识裸子植物和被子植物木质素合成之间的差异, 从基因库中找到了编码咖啡酸O-甲基转移酶(OMT) (E. C. 2. 1. 1. 6) 两种植物的 DNA 碱基序列, 一种是裸子植物火炬松, 编码的 DNA 碱基数量为1 146 bp, 而另一种是被子植物百日草(*Zinnia elegans* Jacq.), 其编码同源 OMT 和 DNA 碱基数量为1 065 bp。然而, 从合成的酶蛋白的氨基酸序列中, 可以发现有一些相同的短氨基酸序列, 如 HVGGDM(组-缬-甘-甘-天-蛋氨酸) 和 DAIFMKWI(天-丙-异

亮-苯丙-赖-色-异亮氨酸)等,表现出一定的保守性,可能与酶的活性中心有关。

一些表现例外的树种可参见 Whetten 等^[21]评述。之外,从两个单木质酚分子聚合方式上看,被子植物木质素的特点是含有高比例的“非凝缩”连接方式,而裸子植物主要为“凝缩”连接方式^[5]。“非凝缩”连接方式的木质素降解要比“凝缩”连接方式的木质素更容易些,因此这一差异在纸浆生产上有重要的意义。

4 木质素含量控制途径的设想

图1为如何控制木质素含量提供了重要的设计路线,但从策略上说,可以从多个方面进行木质素含量控制:(1)控制木质素合成途径中的各种酶系的合成是一个重要途径,如对从 PAL 酶到过氧化物酶/漆酶等进行反义基因转化有可能达到目的;(2)改变木质素的结构组成和化学性质。由于研究木质素含量遗传变异的重要目的之一就是为工业造纸服务,在难以直接降低木质素含量情况下,改变木质素的结构组成有可能间接地达到同样的效果;(3)必须认识到木质素的前体是在细胞质内合成的,然而转移到细胞壁并进行脱氢聚合形成木质素,因此木质素的合成调控也需注意涉及到一些非酶化学分子的作用^[20],即传递运输过程的控制,但这方面的研究至今却很少见报道。

5 木质素含量变异遗传操纵的研究现状

5.1 已知合成酶基因的大小

研究单个酶的作用及多个酶间的相互作用对于探索木质素的合成机理有重要意义,因此木质素合成酶的分子生物学特性及作用机理研究日益受重视。由图1看到有十几种较为清楚的酶参与木质素的合成,而在这些酶中有些酶基因的 DNA 序列已被测定出来。根据基因库内查询的信息,所研究的植物种类和酶种类还很少。在树木上只做过7个种的分析:班克松^[24]、火炬松^[25,26]、美洲黑杨(*Populus deltoides* Marsh.)^[27]、美洲山杨(*P. tremuloides* Michx.)^[28]、冈尼桉(*Eucalyptus gunnii* Hook. F.)^[29]、葡萄桉(*E. botryoides* Smith)^[30]、蓝桉(*E. globulus* Labill.)^[31,32]、欧亚槭(*Acer pseudoplatanus* L.)^[33,34]及其它农作物。从实际编码的 DNA 大小看,编码同一个酶 DNA 碱基数在不同的种间还是较为接近的。酶 CAD、COMT、OMT、CCR 及过氧化物酶基因大小基本上在1 000 bp 以上,LAC 和4CL 酶的基因稍大些,在1 500 bp 以上,而 CcoAOMT 基因大小为700~750 bp。其它一些酶如 C4H、C3H、F5H 等基因序列研究未见报道。这些已报道的酶系的实际编码碱基数量并不很大,这为基因转化研究提供了可能。

5.2 单酶对木质素合成的影响

自然界中已发现一些植物中存在与木质素合成有关的基因突变体,如玉米(*Zea mays* L.)、高粱(*Sorghum vulgare* Pers.)等有棕色叶片中脉的突变体,其木质素含量下降^[20]; MacKay 等^[35]发现火炬松酶系 CAD 的突变体。突变个体的 CAD 活性及 cad RNA 转录水平很低,CAD 酶作用底物累积水平很高,木材呈棕色(野生型呈白色),突变体的木质素含量下降。

目前直接应用基因工程的方法来改变木质素含量的研究已有报道。Piquemal 等^[36]从冈尼桉分离出来的 CCR(EC1.2.1.44)酶的 cDNA 的反义构件,通过农杆菌(*Agrobacterium conn*)载体转化到烟草(*Nicotiana tabacum* L.)上,结果显示在稳态时 CCRmRNA 含量和 CCR 活性下降,且含量下降的植株木质部细胞壁呈橙棕色,紫丁香基与愈创木基的比率提高,且出现不

正常细胞壁酚类物质。然而 CCR 活性严重下降的植物除了表现出木质素下降外,还表现出形体小、叶形异常和缢缩导管等特征。

通常认为 CAD 是催化木质素前体合成的最后一步的酶(图1),因此降低 CAD 活性有可能减少木质素前体的合成。Baucher 等^[37]研究将从毛果杨 × 美洲黑杨(*P. trichocarpa* Torr. et Groy × *P. deltoides* Marsh.) 分离出来的 CAD 酶的 cDNA 通过农杆菌进行有正义和反义转化到欧洲山杨 × 银白杨(*P. tremula* L. × *P. alba* L.) 中,结果表明3个反义转化和2个共抑制的品系的木质部组织 CAD 活性下降70%,在 CAD 活性少于60%的品系中,可检测到红色的木质部,但木质素含量和组成与对照品系相似,并未下降。细胞壁的化学特性不同,应用间苯三酚染色后,正常品系的木质部呈典型的淡红色,而 CAD 活性下降的品系染色后呈棕红色。用 NaOH 处理后,通过将细胞壁中具有碱溶性的部分进行酸化处理后,具有红色木质部的品系的木质素可沉淀,而白色木质部的品系的木质素不沉淀。光谱分析显示出红色木质部的杨树香兰素和紫丁香基醛含量提高。纸浆试验证明 CAD 活性下降的品系只有少量的木质素存于纸浆中。类似的报道还有 Higuchi 等^[38], CAD 反义转化的植株木质素含量并不下降,但木质素的组成和化学性质发生了改变。CAD 反义转化后木质素含量不下降,这与自然界中火炬松 CAD 突变体的结果不一致。

OMT 是重要的控制木质素合成酶, Dwivedi 等^[39]将美洲山杨中编码 bi-OMT (EC2. 1. 1. 68) 酶的反义序列与 CaMV 35S 基因的增强子、启动子和终止子组装后转化到烟草基因组内后,转基因植株表现出正常的表现型。在4个转基因植株的茎部中, bi-OMT 酶的活性平均下降29%。茎部木材化学分析结果显示出紫丁香基单位含量下降,木质素含量下降水平与 bi-OMT 酶活性程度相关。Doorselaere 等^[27]应用反义 COMT 转化欧洲山杨 × 银白杨后, COMT 活性下降为正常的5%,但木质素含量并不下降。

根据应用转化单酶基因方法改造烟草木质素含量的研究报道,降低单个酶 OMT、CAD、POD(过氧化物酶)、COMT 和 F5H 等酶活性,并不影响木质素含量变化,而降低酶系 PAL、C4H、4CL 和 CCR 等酶活性,则可以降低木质素含量^[5,21],然而以树木为材料改造单酶 PAL、C4H、4CL 和 CCR 的研究却很少有报道。

5.3 多酶基因反义转化研究设想

虽然已有很多单个酶系调整木质素含量研究的报道,但单个酶系的作用到底有多大仍然不清楚,且因不同植物种而表现不同,离体试验结果和体内表现不一致^[21],这主要是由于在考虑一个因子作用时,还不知道是否存在其它替代途径,因而无法控制背景误差,因此弄清单个酶的作用还需大量研究。但同时也必须认识到木质素合成途径的复杂性,有可能存在多条途径的替换或切换,这反映了木质素合成在植物从水生到陆生长期演化过程中的进化意义,也是植物为适应环境变化而形成木质素合成复杂的原因之一。若是如此,那么在改良木质素含量方面,研究单个酶的意义不大。这样就提出同时研究和改造多个酶系的必要性,以有助于进一步认识木质素合成的途径。

从图1和有关试验报道^[21]可以推测,改变单个酶 PAL、C4H、4CL 及 CCR 等酶系活性可以降低木质素含量,若同时改变 PAL 与 C4H,或 PAL 与 4CL,或其它组合是否会进一步降低木质素含量?Whetten 等^[21]曾设想同时降低 COMT 和 4CL 两个酶系的活性来监测5-羟基松柏醇的存在性,同时也可以监测 CcoAOMT 酶在合成芥子醇过程中作为一种甲基化替代途径的作

用。然而至今同时研究改变多个酶系的活性,酶间的交互作用等对于改造木质素含量的效果还未见报道。

6 小结与今后重点研究领域

从木质素分子水平上的合成到个体内、个体间、种内群体间及种间遗传变异极为复杂,遗传变异特点可初步概括出以下几点:

(1) 木质素含量遗传变异显然受多基因控制,对于同一个种而言,遗传和环境因素对木质素含量变异有不同程度的影响。

(2) 裸子植物和被子植物木质素含量和组成有明显的差异,且降解的难易程度不一。这一差异的进化意义仍然不清楚。

(3) 木质素的合成途径有可能存在多条途径的替换或切换,然而利用基因工程技术对某些酶系如 PAL, C4H, 4CL 和 CCR 等进行改造,在一定的程度上可以降低木质素含量,而对其它酶系如 OMT, CAD 和 F5H 等改造,并不降低木质素含量,有些可以改变木质素的组成和化学性质,至今,所有有关木质素基因工程植株研究都没有进行田间的稳定性评估。

(4) 由于木质素含量变异在维管植物的进化过程中有重要意义,是长期适应和自然选择的结果,改变木质素含量只是为了工业造纸的经济需要,这对于植物本身而言,有可能降低其适应性,同时这一观点也启发通过基因转化的方法来改造裸子植物的木质素组成和化学性质以此作为替代途径,可提高木质素降解能力,这可能更具有重要的实际意义。

根据木质素含量遗传变异特点,为进一步研究和认识木质素含量遗传变异规律,作者认为利用遗传谱系明确的群体材料开展以下几方面的研究具有重要意义:(1) 建立分子标记遗传图谱,对控制木质素含量变异 QTLs 进行定位和分析,筛选出有关可能的主效基因,若可能的话,进一步测序和功能鉴定;(2) 同时对已知的木质素合成酶系进行同功酶分析和定位;(3) 利用 QTL 分析,研究一些环境因子对木质素含量及有关合成酶系的影响,即探索环境影响木质素含量等变异原因的分子机理;(4) 在数量和种类上开展不同合成酶组合反义转化研究,探索木质素含量变化和推测木质素合成代谢的可塑性,并与 QTL 研究结果进行综合分析。

参考文献:

- [1] 中野准三, 通口隆昌, 住本昌之, 等. 木材化学[M]. 鲍禾, 李忠正译. 北京: 中国林业出版社, 1989.
- [2] Zobel B J, Buijtenen V J P. Wood Variation: Its Causes and Control[M]. Springer-Verlag, Heidelberg Germany, 1989.
- [3] Toruna M N, Suhendi D. Potential of *Leucaena diversifolia* as a raw material for pulp and paper[J]. *Leucaena Research Reports*, 1992, 13: 53 ~ 55.
- [4] Werf H M G, Veen J E H, Bouma A T M, et al. Quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) stems as a raw material for paper[J]. *Industrial Crops and Products*, 1994, 2(3): 219 ~ 227.
- [5] Baucher M, Monties B, Montagu M V, et al. Biosynthesis and genetic engineering of lignin[J]. *Critical Reviews in Plant Science*, 1998, 17(2): 125 ~ 197.
- [6] 鲍甫成, 江泽慧, 姜笑梅, 等. 中国主要人工树种幼龄材与成熟材及人工林与天然林木材性质比较研究[J]. *林业科学*, 1998, 34(2): 63 ~ 76.
- [7] Veveřis A L. Studies of the properties of the wood in spruce[J]. *Genet. issled. dřevěsn. v LartvSSR*, 1975, 64 ~ 67(In Russian).
- [8] Pereira J C D, Lavoranti O J. Comparison of wood quality of three provenances of *Mimosa scabrella* for energy purposes[J]. *Boletim de Pesquisa Florestal, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, EMBRAPA, Brazil*, 1986, 12: 30 ~ 34(In

Portuguese).

- [9] 徐有明, 涂可高, 等. 火炬松种源木材成份的变异[J]. 林产化学与工业, 1997, 17(1): 73 ~ 78.
- [10] Donaldson L A, Croucher M, et al. Clonal variation of wood chemistry variables in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.) wood. *Holzforschung*, 1997, 51(6): 537 ~ 542.
- [11] Osta E M L M, Hassan A. A extractives and lignin content variation in young *Casuarina* trees grown in Riyadh and their importance to utilization[J]. *Journal of Colloid Science*, King Saud University, 1983, 14(1): 95 ~ 109.
- [12] Miyata M, Ubukata M, Eiga S. Clonal differences of the chemical constituents contents of grafted plus-tree woods of Japanese red pine and Japanese black pine[J]. *Journal of the Japanese Forestry Society*, 1991, 73(2): 151 ~ 153.
- [13] Molotov L K, Arakina G A, Potapova N P. Variability of the wood properties of birch within a stand[J]. *Khimiya Drevesiny*, 1983, 1: 28 ~ 32 (In Russian).
- [14] Kawachi S. Variation in the chemical composition within an obiki tree (*Cryptomeria japonica* D. Don.) [J]. *Bulletin of the Faculty of Agriculture*, Miyazaki University, 1988, 35(2): 187 ~ 194.
- [15] Vital B R, Almeida J, Valente O F, et al. Growth characteristics and wood quality of *Eucalyptus camaldulensis* for charcoal production[J]. *Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais*, 1994, 47: 22 ~ 28 (In Portuguese).
- [16] Campbell A G, Kim W J, Koch P. Chemical variation in lodgepole pine with sapwood/heartwood, stem height and variety [J]. *Wood and Fiber Science*, 1990, 22(1): 22 ~ 30.
- [17] Khurana D K, Kaushal A N, Khosla P K. Studies in *Populus ciliata* Wall. Ex. Royle. Variation in wood chemical analysis in relation to sex and ecological factors[J]. *Journal of Tree Science*, 1983, 2(1): 63 ~ 73.
- [18] Manville J F, Rogers I H. Insect juvenile hormone analogs in conifers. Variability of Douglas-fir wood extractives with geographical location[J]. *Canadian Journal of Forest Research*, 1977, 7(2): 429 ~ 434.
- [19] Pugach E A. Evaluation of geographical variation in *Pinus sylvestris* by biochemical methods[M]. *3-й Съезд-Семинар генетиков-селекционеров им. Н. И. Вавилова*, 1977, 427 (In Russian).
- [20] Campbell M M, Sederoff R R. Variation in Lignin Content and Composition. Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants[J]. *Plant physiology*, 1996, 110(1): 3 ~ 13.
- [21] Whetten R W, Mackay J J, Sederoff R R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, 49: 585 ~ 609.
- [22] Fukuda H, Komamine A. Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary element differentiation in single cell isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*[J]. *Planta*, 1982, 155(5): 423 ~ 430.
- [23] Campbell M M, Ellis B E. Fungal elicitor-mediated response in pine cell cultures. Cell wall-bound phenolics[J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(3): 734 ~ 742.
- [24] Butland S L, Chow M L, Ellis B E. A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in pine trees and cell cultures[J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 37(1): 15 ~ 24.
- [25] Zhang X H, Chiang V L. Molecular cloning of 4-coumarate: coenzyme A ligase in loblolly pine and the roles of this enzyme in the biosynthesis of lignin in compression wood[J]. *Plant Physiology*, 1997, 113(1): 65 ~ 74.
- [26] Li L, Popko J L, Zhang X H, et al. A novel multifunctional O-methyltransferase implicated in a dual methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 1997, 94(10): 5461 ~ 5466.
- [27] Doorselaere V J, Baucher M, Chognot E, et al. A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity[J]. *Plant Journal*, 1995, 8(6): 855 ~ 864.
- [28] Bugos R C, Chiang V L, Campbell W H. cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase of aspen[J]. *Plant Molecular Biology*, 1991, 17(6): 1203 ~ 1215.
- [29] Lacombe E, Hawkins S, Doorselaere V J, et al. Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships[J]. *Plant Journal*, 1977, 11(3): 429 ~ 441.
- [30] Hibino T, Chen J Q, Shibata D, et al. Nucleotide sequence of a *Eucalyptus botryoides* gene encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase[J]. *Plant Physiology*, 1994, 104(1): 305 ~ 306.
- [31] Melis L D E, Brugliera F, Pongracic S, et al. Nucleotide sequence of a *Eucalyptus globulus* cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase (Accession No. AF038561) (PCR98-032) [J]. *Plant Physiology*, 1998, 116(3): 1191.

- [32] Melis L D E, Brugliera F, Pongracic S, et al. Isolation of a *Eucalyptus globulus* cDNA encoding caffeoyl CoA³-O-methyltransferase (Accession No. AF046122) (PGR98-098)[J]. *Plant Physiology*, 1998, 117(2): 718.
- [33] Sterjiades R, Dean J F D, Eriksson K L. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols[J]. *Plant Physiology*, 1992, 99(3): 1162 ~ 1168.
- [34] LaFayette P R, Eriksson K E, Dean J F. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding an acidic laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus* L.)[J]. *Plant Physiology*, 1995, 107(2): 667 ~ 668.
- [35] MacKay J J, O Malley D M, Presnell T, et al. Inheritance, gene expression, and lignin characterization in a mutant pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 1997, 94(15): 8255 ~ 8260.
- [36] Piquemal J, Lapierre C, Myton K, et al. Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants[J]. *Plant Journal*, 1998, 13(1): 71 ~ 83.
- [37] Baucher M, Chabbert B, Doorselaere V J, et al. Higher extractability of lignin in poplar (*Populus tremula* × *P. alba*) by reducing cinnamyl alcohol dehydrogenase activity[A]. In: *Somatic cell genetics and molecular genetics of trees*[M]. M R Ahujia, W Boerjan, D B Neale. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1996, 153 ~ 158.
- [38] Higuchi T, Ito T, Umezawa T, et al. Red-brown color of lignified tissues of transgenic plants with antisense CAD gene: wine-red lignin from coniferyl aldehyde[J]. *Journal of Biotechnology*, 1994, 37(2): 151 ~ 158.
- [39] Dwivedi U N, Campbell W H, Yu J, et al. Modification of lignin biosynthesis in transgenic *Nicotiana* through expression of an antisense O-methyltransferase gene from *Populus*[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 26(1): 61 ~ 71.

Advance in Studies on Genetic Variation of Lignin Content in Tree Species

HU Xin-sheng, HAN Yi-fan, QIU De-you

(The Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: Genetic variation of the quantitative trait-lignin content was remarked in detail. According to many reports, it can be seen that lignin content possesses very complicate patterns of variation at levels of species, population and individual. Impacts of environmental factors on variation of lignin content can not be ignored. The lignin biosynthetic process has not been elucidated yet, and there are probably several alternative pathways. However, application of antisense transformation of genes of some enzymes such as PAL, C₄H, 4CL and CCR, can reduce level of lignin content to a certain extent; while transformation of other genes of enzymes like OMT, CAD and F₅H has no effect on lignin content but lignin composition. These results remain to be confirmed in the field performance. Based on these progresses, study on multiple transformation of genes of some enzymes is required so as to detect the roles of some enzymes in lignin content and metabolic plasticity. In order to further study genetic variation of lignin content, it is necessary to conduct a study on genetic mapping, location determination and isolation of genes responsible for variation of lignin content, using pedigree materials planted under different environments. This may also help us to elucidate the impacts of environmental factors on variation of lignin content at molecular level.

Key words: trees; lignin content; genetic variation; genetic engineering