

## 研究報告

轉殖外源顛楊*Cald5H*基因赤桉之性狀分析陳怡蓓<sup>1)</sup> 蔡佳彬<sup>2)</sup> 陳振榮<sup>1)</sup> 鍾振德<sup>1,3)</sup>

## 摘要

木質素的含量與組成為製漿生產的關鍵，本研究使用農桿菌將順義式顛楊松柏醛5-羥化酶基因 (coniferyl aldehyde 5-hydroxylase (*PtCald5H*) gene)轉殖到赤桉，探討轉基因赤桉木材製漿性質之變化。本研究共獲取7個轉殖順義式*PtCald5H*基因之赤桉轉殖系，並經由聚合酶連鎖反應及南方式雜交分析證實目標基因已經成功轉殖。H201~4與H206~7等6個品系木質素含量約在30%與對照組沒有顯著差異，而H205木質素含量32.4%，與對照組有顯著性差異。將木質素分成酸可溶與不可溶兩種形式，可發現H204~6等3個品系，其酸可溶木質素含量5.7~6.8%，極顯著( $p < 0.01$ )高於對照組之4.1%。赤桉木質素主要由紫丁香基(syringyl, S)與愈創木酚基(guaiacyl, G)木質素單元體聚合而成，其S/G比約為3，H204~6等3個品系之S/G分別為7.5, 7.5與7.3，其S木質素單元體含量顯著高於對照組。纖維素/木質素比率在轉基因品系中為2.0到2.2，而對照組為2.3。硫酸鹽法製漿分析，在活性鹼為17.0%製漿，H2O4和H2O6的得漿率提高了0.8~1.6%。

關鍵詞：赤桉、松柏醛 5-羥化酶基因、木質素單元體、紫丁香基與愈創木酚基木質素單元體、製漿。陳怡蓓、蔡佳彬、陳振榮、鍾振德。2022。轉殖外源顛楊*Cald5H*基因赤桉之性狀分析。台灣林業科學 37(1):61-76。

<sup>1)</sup>行政院農業委員會林業試驗所育林組，10066台北市南海路53號 Division of Silviculture, Taiwan Forestry Research Institute. 53 Nanhai Rd., Taipei 10066, Taiwan.

<sup>2)</sup>行政院農業委員會林業試驗所六龜研究中心，84443高雄市六龜區中興里198號 Liukuei Research Center, Taiwan Forestry Research Institute. 198 Chunghsin Village, Liukuei, Kaohsiung 84443, Taiwan.

<sup>3)</sup>通訊作者 Corresponding author, e-mail:chung@tfri.gov.tw

2021年10月送審 2022年6月通過 Received October 2021, Accepted June 2022.

## Research paper

## Characterization of Transgenic *Eucalyptus camaldulensis* Carrying the *Populus tremuloides* coniferyl aldehyde 5-hydroxylase gene

Yi-Chiann Chen<sup>1)</sup> Jia-Bin Tsai<sup>2)</sup> Zenn-Zong Chen<sup>1)</sup> Jeng-Der Chung<sup>1,3)</sup>

### [ Summary ]

The lignin quantity and monomeric composition play important roles in wood and pulp production. In this study, the gene encoding coniferyl aldehyde 5-hydroxylase gene (*Cald5H*) from *Populus tremuloides* was transferred in a sense orientation into *Eucalyptus camaldulensis* by *Agrobacterium*-mediated transformation to assess the change in pulping properties in transgenic *E. camaldulensis* trees. Seven transgenic lines (H201~7) were obtained, and transformation was verified by a genomic polymerase chain reaction (PCR) and Southern hybridization. Lignin contents of transgenic lines H201~4 and H206~7 did not significantly differ compared to the control line, but that of H205 (32.4%) was significantly greater than the control (30.0%). The total lignin content was determined as the sum of acid-insoluble (AIL) and acid-soluble lignin (ASL) contents. ASL contents significantly increased in the transgenic lines H204~6 (5.7~6.8%), compared to the control line (4.1%) ( $p < 0.01$ ). Lignin in *E. camaldulensis* is polymerized from the syringyl (S) and guaiacyl (G) monolignols with an S/G ratio of  $\approx 3$ . The S/G ratios of H204, H205, and H206 were 7.5, 7.6 and 7.3, respectively, and contents of the S monolignol were significantly higher than that of the control line. Cellulose/lignin ratios were 2.0~2.2 in the transgenic lines compared to 2.3 in the control. After Kraft pulping, results of pulp yields of H204 and H206 with 17.0% active alkali demonstrated yield increases of up to 0.8~1.6%.

**Key words:** *Eucalyptus camaldulensis*, coniferyl aldehyde 5-hydroxylase gene, lignin monomer, syringyl and guaiacyl monolignols, pulp yield.

**Chen YC, Tsai JB, Chen ZZ, Chung JD. 2022.** Characterization of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* carrying the *Populus tremuloides* coniferaldehyde 5-hydroxylase gene. *Taiwan J For Sci* 37(1):61-76.

### 緒言

台灣桉樹育種研究，從引種適應性栽植 (Kan et al. 1990, Chen et al. 1995)、扦插繁殖 (Yang et al. 1996, Chen and Yang 2002)、微體繁殖與組織培養 (Chang and Yang 1995, Tsay and Chen 1995, Chen et al. 1995, 1996, Yang et al. 1996, Chang et al. 2000)、基因選殖 (Ho et

al. 2002, Chen et al. 2006)、基因轉殖 (Ho et al. 1998, Chen et al. 2001)、促進開花 (Chung et al. 2007) 等等，已建立一完整的體系。全球的紙漿需求，針闊葉樹約各佔一半，而桉樹於闊葉樹製漿比率約50% (Magaton et al. 2009)，顯見桉樹在全球的紙漿市場的地位非常重要。目前

化學製漿廠的機械設備與產程設計已經非常精進，藉由工業產程的調整而獲得紙漿收率的提高，不僅投資金額大且效益非常有限，一般僅能提高得漿率0.2%，至多不超過0.5%。相對的，改良原料材性質的空間卻非常之大。

生物技術的快速發展，為木材性質之改良，提供了一條可行且便捷的途徑，藉由木質素生成基因之調控，使林木之木質素含量降低，相對的纖維素含量提高，或者是使木質素單體組成之比率改變，最終促成製漿之收率提高以及成本降低。近年間利用基因工程技術從事林木改良的研究成果相當顯著，例如：轉殖苯丙氨酸氨裂合酶(L-phenylalanine ammonia-lyase, *PAL*)、4-羥基肉桂酸酶(cinnamate 4-hydroxylase, *C4H*)、4-香豆酸輔酶A連接酶(4-coumarate: coenzyme A ligase, *4CL*)或咖啡酰輔酶A O-甲基轉移酶(caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase, *CCoAOMT*)等木質素生成基因，都會使轉殖植物呈現木質素含量下降之現象(Sewalt et al. 1997, Hu et al. 1999, Meyermans et al. 2000, Li et al. 2003, Poke et al. 2005)，其中以轉殖反義式(antisense) *4CL*基因之降低木質素含量效果最佳，經過轉殖antisense aspen *4CL*基因之赤桉，其隔離造林木之製漿檢測，已經可提高得漿率至1.3% (陳振榮未發表資料)。更進一步，我們已經從赤桉的發育木質部組織(developing xylem tissues)選殖出*Euc4CL1*基因(Chen et al. 2006, GenBank accession no., DQ147001)，並培育出轉基因桉樹苗木，其造林木之得漿率將可提高2至5%之多(陳振榮未發表資料)。

木質素的合成路徑大部分的輪廓已經清楚(Li et al. 2003, Chiang 2006)，有關*Cald5H*基因對於木材性質的影響已經清楚了解，目前大部分的證據顯示，闊葉樹種S木質素單體的合成路徑都由松柏醛開始，Osakabe et al. (1999)認為松柏醛5-羥化酶(coniferyl aldehyde 5-hydroxylase, *Cald5H*)，催化松柏醛(coniferyl aldehyde)苯環第5個位置的羥基化(-OH)，形成5-羥基松柏醛(5-hydroxyconiferyl aldehyde)，再經5-羥基松柏醛O-甲基轉移酶

(5-hydroxyconiferyl aldehyde O-methyltransferase, *AldOMT*)催化形成芥子醛(sinapyl aldehyde)。後經肉桂醇脫氫酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, *CAD*)催化芥子醛為芥子醇(sinapyl alcohol)，芥子醇生物合成紫丁香基木質素單元體(syringyl monolignol, S) (Li et al. 2001, Wang et al. 2012)。

松柏醛經過松柏醛5-羥化酶(*Cald5H*)、和*CAD*催化。酵素動力學證實*Cald5H*比其他兩種酵素慢6到50倍，這也表示*Cald5H*酵素成為S木質素生物合成方面的關鍵作用酵素(Li et al. 2002, 2003)，因此調節*Cald5H*，將會影響木質素的S/G比率。木材紙漿的生產，木質素的化學性質為關鍵性的障礙，因為移除木質素整個程序都經過化學反應而完成，木質素殘留於紙漿中，就得經過多段的漂白流程去除殘餘的木質素。因此，現今側重於低木質素總量的林木生物技術必須延伸到含有較佳的木質素反應性質，甚至於最終達成具有低含量以及反應型組合之木質素特性。包括桉樹在內的闊葉樹，其木質素是由S木質素與愈創木基木質素單元體(guaiacyl monolignol, G)所聚合而成，其S/G比率大致為2~2.5，且S/G比率高低為預測木質素是否容易去除的指標(Chang and Sarkanen 1973, Chiang and Funaoka 1990)。木材製漿動力學的研究顯示，每提升S/G比率的一個間距，幾乎可以使移除木質素的速率加倍(Chang and Sarkanen 1973, Huntley et al. 2003, Li et al. 2003)，正好支持增加S/G比率可以和減少木質素含量形成一項生物技術的組合，促使木材紙漿的生產達到最大的效率。雖然轉殖sense *Cald5H*基因也曾在非桉樹的其他模式樹種進行過試驗，而且也證實增加S/G比率的真實性，以及*Cald5H*就是調控S與G木質素單元體的關鍵基因(Huntley et al. 2003, Li et al. 2003, Poke et al. 2005)，但是這些研究都在非商業性的模式樹種實施，也都未進入隔離造林試驗的階段。Huntley et al. (2003)研究雜交楊樹(*Populus tremula* x *Populus alba*)證實，*Cald5H*基因過度表達後，可以顯著的改善製漿效率，且效果顯著高於木質素生物合成途徑中的其他基因。

本研究將顫楊(*Populus tremuloides*)之sense *Cald5H*基因轉殖到優良赤桉的營養系，並培育出轉基因桉樹苗木，以及進入隔離造林試驗，最後分析轉殖顫楊sense *PtCald5H*基因對於轉殖赤桉品系木材性狀所造成的改變。

## 材料與方法

### 一、試驗營養系與組織培養

試驗用的營養系選自蓮華池研究中心之赤桉(*Eucalyptus camadulensis*)種源後裔試驗林，試驗林於1987年建立，7年生時選擇第6號種源優良單株，其中編號no. 48單株母樹入選，no. 48每年每公頃材積生長量為28.7 m<sup>3</sup>，取其萌芽建立無性繁殖與組織培養微體繁殖系統(Yang et al. 1996a, b)。

### 二、基因表達載體構築與赤桉基因轉殖

本試驗所使用的轉殖載體，其T-DNA區域的基因表達構築以及整個質體的限制酶圖譜如Fig. 1所示，使用由顫楊(*P. tremuloides*)選殖的木質部專一性(xylem-specific)表現的4*CLI*基因啟動子(promoter)，以順義方向(sense)來驅動*PtCald5H*基因，構築過程中以聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)和Sanger定序來確認構築的正確性。本載體同時帶有neomycin phosphotransferase II (*NPT II*)基因，可使用kanamycin進行後續篩選。轉殖載體構築完成後，使用電穿孔法(electroporation)將載體送入農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*) CIB5425中，以進行後續的轉殖試驗。首先參考Mersereau et al. (1990)的方法製備農桿菌CIB542的勝任細胞(competent cell)，然後將40 μL的勝任細胞與2 ng構築好的轉殖質體於冰水浴中混勻後放入2 mm 間隙電穿孔用管槽，使用電穿孔儀(BTX ECM 630, BTX, San Diego, CA, USA)依照儀器操作手冊建議的操作條件(2.5 kV/high voltage, 129 ohm阻抗設定)進行反應。反應完成後立即於管槽中加入1 mL SOC 液體培養基(內含20 mM glucose, 20 g L<sup>-1</sup> tryptone, 5 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>,

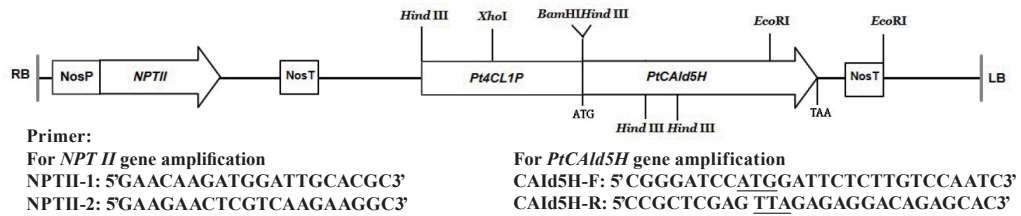
10 mM MgSO<sub>4</sub>, pH7.0)，將菌液於28°C，100 rpm培養1 h 後取200 μL菌液均勻塗佈於含有50 mg L<sup>-1</sup> kanamycin的LB固體培養基(10 g L<sup>-1</sup> tryptone, 5 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 5 g L<sup>-1</sup> NaCl, 15 g L<sup>-1</sup> agar, pH 7.0)上，於28°C培養箱中繼續培養2天。挑取數個單一菌落，以PCR確認載體順利轉入農桿菌後，將帶有*Pt4CLIP::PtCald5H*載體的CIB542農桿菌凍存於-80°C中備用。

以上述建立之no. 48號赤桉營養系微體繁殖植株為材料，依照Chen et al, 2001描述的方法進行赤桉基因轉殖。切取葉片大小約0.5×0.5 cm<sup>2</sup>，浸泡於前述帶有順義式*PtCald5H*農桿菌培養液內，培養液內含5 mg L<sup>-1</sup> kanamycin sulfate，浸泡5分鐘。葉片放入無菌濾紙將多餘的菌液移除，之後以500 mg L<sup>-1</sup> carbenicillin與500 mg L<sup>-1</sup> cefotaxime將農桿菌給去除，葉片組織培養於內含40 mg L<sup>-1</sup> kanamycin sulfate的固體培養基誘導癒傷組織。誘導之癒傷組織依照Chang et al. (2000)方法誘導芽體再生。芽體長至1.5 cm時，移至發根培養基生產基因轉殖苗木(Chang and Yang 1995, Chang et al. 2000)。發根後的基因轉殖苗木，培養於泥炭土：蛭石；珍珠石體積比為2:2:1培養土中。

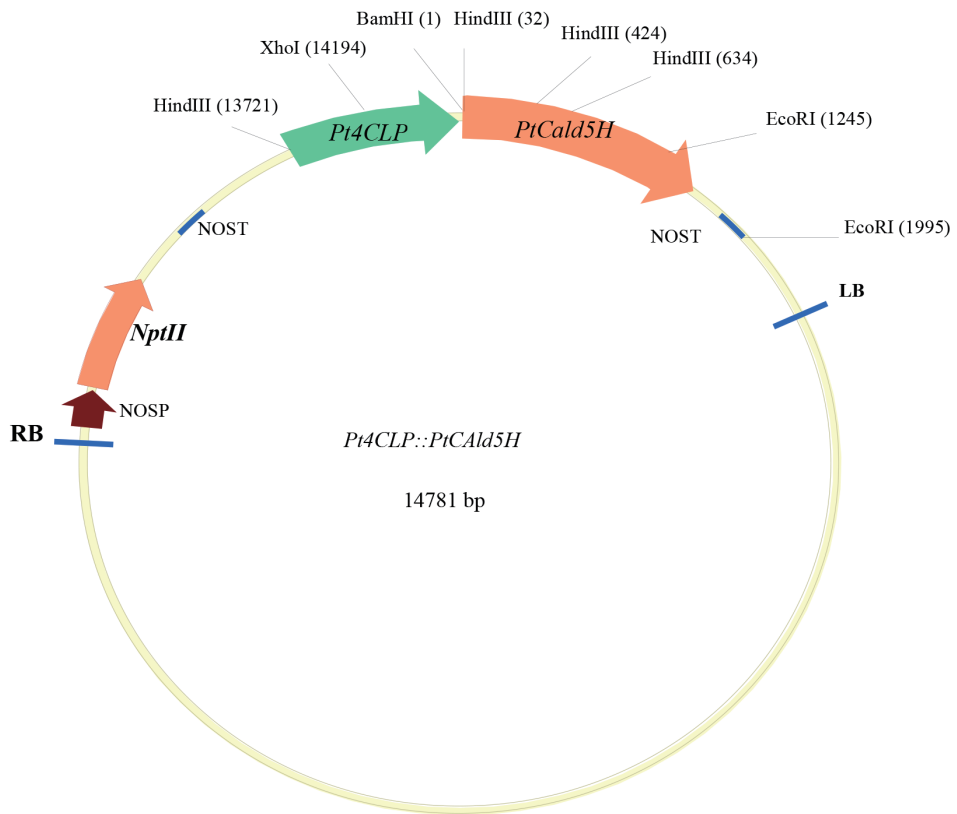
### 三、多重聚合酶連鎖反應(multiplex polymerase chain reaction; Multiplex PCR)與南方氏墨點法分析(Southern blot hybridization)

採集對照組(no. 48 赤桉)及轉基因植株的葉片，以Aitchitt et al. (1993)方法萃取基因組(genomic) DNA，萃取出的DNA樣本保存於-20°C備用。以超微量分光光度計(NanoDrop2000, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts USA)測定DNA濃度及純度，並以0.8%瓊脂糖凝膠電泳分析DNA品質。使用ABI 2720聚合酶連鎖反應儀(Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts USA)進行多重聚合酶連鎖反應，檢測植株是否有插入*PtCald5H*及*NPT II*基因。Multiplex PCR的反應條件如下：在總體積為25 μL的反應溶液中，含有50 ng樣本DNA，400 μM dNTPs，

A.



B.



**Fig. 1A.** The T-DNA region of the binary vector used for eucalyptus transformation. RB and LB, border sequences of T-DNA; NosP, nopaline synthase promoter; *NPTII*, neomycin phosphotransferase II gene; NosT, nopaline synthase terminator; *Pt4CL1P*, xylem-specific promoter from the aspen *Pt4CL1* gene; *PtCald5H*, coniferyl aldehyde 5-hydroxylase cDNA from aspen; *HindIII*, *XhoI*, *BamHI*, and *EcoRI*, restriction enzyme sites. ATG, start codon of *PtCald5H* cDNA; TAA, stop codon of *PtCald5H* cDNA. **B.** Vector map of the *Pt4CLP::PtCald5H* plasmid.

2 mM MgCl<sub>2</sub> , 2.5 U Taq聚合酶(Prime Taq DNA polymerase, Genetbio, Daejeon , Korea) , 同時使用NPTII-1/NPTII-2以及CA1d5H-F/CA1d5H-R

兩對引子, 引子的序列如Fig. 1所示, 每一單一引子的濃度為0.25 μM, 在同一反應中分別進行*NPTII*以及*PtCald5H*基因片段的擴增。反



應溫度條件為：95°C 5分鐘，緊接著以94°C 30 s，60°C 30 s，72°C 1.5 min的循環進行35個循環；最後於72°C反應10分鐘。PCR反應完成後的產物以1%瓊脂糖凝膠，於1×TAE (40 mM Tris, 20 mM acetate, and 1 mM EDTA, pH 8.0) 緩衝液中進行電泳分析。

在南方氏墨點法分析的部分，每一植物樣本取10 µg genomic DNA，以XhoI酵素於37°C進行16小時的酶切，酶切完成後，以0.8%瓊脂糖凝膠於0.5×TBE (40 mM Tris-Cl, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.0) 緩衝液中進行電泳分離。電泳完成後，利用毛細孔轉移法(capillary transfer) (Southern, 1975)以10×SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate, pH 7.0) 緩衝液將DNA片段轉印到nylon膜上 (Amersham Hybond N, GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA)，轉印完成的nylon膜以UV Stratilinker 1800 (Stratagene, La Jolla, California, USA) 固定後乾儲於4°C中備用。利用PCR合成長度約800 bp的digoxigenin (DIG) 標定的專一性探針，於50 µL PCR反應溶液中以上述的*Pt4CLP::PtCalD5H*質體(plasmid)為模板，加入2 mM MgCl<sub>2</sub>，2.5 U Taq聚合酶(Prime Taq DNA polymerase, Genetbio, Daejeon, Korea)以及專一性引子CALD5H-F2 (5'-GAGATGAGGTGGACTCAATGC3')及CALD5H-R3 (5'-CAGGATCTTCCCATGAATTC3')各0.25 µM，加入5 µL PCR DiG labeling Mix (Roche Applied Science, Penzberg, Upper Bavaria, Germany)取代一般的dTPs，反應溫度條件為：95°C 5分鐘，緊接著以94°C 30 s，60°C 30 s，72°C 1 min的循環進行35個循環；最後於72°C反應10分鐘。使用合成好的DIG-labeled DNA探針，於42°C中使用DIG easy hyb (Roche Applied Science)進行雜交反應，反應完成後nylon膜以Wash I buffer (2×SSC, 0.1% sodium dodecylsulfate (SDS)) 於室溫中清洗2次，每次10 min，隨後再以於68°C中預熱的Wash II buffer (0.5×SSC, 0.1% SDS)於68°C水浴中清洗2次，每次15 min。雜交訊號偵測則參考McCabe et al. (1997)以及

DIG Application Manual for filter hybridization. (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, 2000) 的方法採用CDP-star系統搭配X光片曝光來進行訊號的偵測。

#### 四、木質素與纖維素分析

樣本取樣首先將原木剝皮，再鋸切成圓盤，後切成木削片，去除死節與樹瘤等組織，樣本為能與化學藥品均勻反應，取樣之木削片以磨粉機磨成木粉，後以孔目40~60 mesh篩網篩選，篩選出的木粉經氣乾24~48小時，貯存於封口袋中備用。

##### (一)醇苯萃取

依照CNS 4713方法，取前述之氣乾木粉約5克置入圓筒濾紙(先秤量其絕乾重)放置在索氏脂肪萃取器(Soxxhlet extractor)中加入200 ml 醇苯混合液(甲苯與乙醇比例為2:1)放置在平底燒瓶中萃取器與燒瓶結合後，放置在平底加熱爐加熱萃取5至6小時，使溶液急速沸騰，產生約6次的虹吸。反應結束後，將萃取瓶中之溶劑完全蒸發後，將含有萃取物的萃取瓶置於105±3°C的烘箱烘乾至恆重。

##### (二)木質素含量

木質素含量測定分成酸不可溶與酸可溶兩種木質素進行分析，兩者總量為木質素含量。

##### 1. 酸不可溶木質素之定量

依照CNS 14097方法，取醇苯萃取的樣本木粉絕乾重約2 g，置入125 ml三角錐瓶，加入72%硫酸15 ml置於20°C的水浴中，時時攪拌使混合物充份膠化，反應約4小時後，以560 ml蒸餾水將膠化之混合物洗入1000 ml的三角瓶中，經高溫(121°C)高壓蒸煮30分鐘後，以1 G<sub>4</sub>的濾杯過濾，收集過濾之濾液作為木質素酸可溶的測定樣本，再用熱蒸餾水洗滌殘留物不成酸性為止後置於105±3°C烘箱烘至恆重，酸不可溶木質素含量為：(殘留之絕乾重/木粉之絕乾重)\*100\* (1-醇苯抽出物%)。

## 2. 酸可溶木質素之定量

依照CNS 12108方法，取上述經硫酸水解後的木質素澄清溶液以分光光度儀(Biowave S2100, WPA, Cambridge, UK)在205 nm的波長測量其吸光度，並以3%濃硫酸進行空白實驗，若吸光度超過0.7，應以3%濃硫酸等比稀釋使吸光度介於0.2至0.7之間，樣本溶液酸性木質素之濃度： $(\text{吸光度} \times \text{稀釋倍數}) / 110$ 。

## (三) 木質素組成單元分析

以冷凍研磨機(6770 Freezer/Mill, SPEX SamplePrep, Metuchen, New Jersey, USA)將樣品均質化，再經索氏萃取(Soxhlet extraction)處理，流程為乙醇-苯(1:2, v/v) 6 h, 95%乙醇 4 h, 最後以蒸餾水處理2 h。樣品於室溫下乾燥24 h後，秤取約100  $\mu\text{g}$ ，於熱裂解氣相層析質譜儀分析。熱裂解儀(Py 2010D, Frontier Lab, Fukushima, Japan)，溫度設定為450 $^{\circ}\text{C}$ ，氣相層析質譜儀(6890N/5973 MSD, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)，氮氣為移動相流速為每分鐘1 mL，分析管柱為DB-5MS (30 m  $\times$  0.25 mm (i.d.), 0.25- $\mu\text{m}$  film, Agilent Technologies)，注射口溫度230 $^{\circ}\text{C}$ ，分流比為50:1，溫度以每分鐘5 $^{\circ}\text{C}$ ，從50 $^{\circ}\text{C}$ 上升到280 $^{\circ}\text{C}$ ，再於280 $^{\circ}\text{C}$ 維持5分鐘(Yokoi et al. 1999, Ho and Su 2001)。GC與MS間的interface溫度設定280 $^{\circ}\text{C}$ ，離子化電壓(electron energy) 70 eV，以m/z 80~650之間進行full scan。分析前以標準品確認波峰位置，之後再分析樣品，Fig. 2為本研究之控制組品系C48，木質素單體syringyl (S)與guaiacyl (G)各取7個化合物，再以兩類型單體所占比率相比，得到S/G，每個樣品重複分析3~5次。木質素單體guaiacyl (G) 7個化合物的標準品，分別為：G1:Guaiacol (Kanto Chemical), G2:4-methyl-Guaiacol (Tokyo Chemical Industry), G3: 4-vinyl-Guaiacol (Aldrich), G4: 4-allyl-Guaiacol (Eugenol) (Kanto Chemical), G5: Vanillin (Kanto Chemical), G6: trans-Isoeugenol (Kanto Chemical), G7: trans-Coniferyl alcohol (Acros Organics)。木質素單體syringyl (S) 7個化合物的標準品，分別為：S1:Syringol (Acros Organics), S2: 4-methyl-Syringol (Aldrich), S3:

4-vinyl-Syringol (Apin Chemicals), S4: 4-allyl-Syringol (Apin Chemicals), S5: Syringaldehyde (Tokyo Chemical Industry), S6: trans-4-propenyl-Syringol (Apin Chemicals), S7:trans-Sinapyl alcohol (Apin Chemicals)。

## (四) 全纖維素分析

依照CNS 6948方法，試驗方法採亞氯酸鹽法，取經醇萃取的樣本木粉絕乾重約2 g，置入250 ml三角錐瓶，依序加入150 ml蒸餾水、0.2 ml的冰醋酸與1 g的亞氯酸鈉，置於70~80 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴槽中，每隔一小時依序加入0.2 ml的冰醋酸與1 g的亞氯酸鈉，共加熱約4~6小時，反應過程中不時震盪攪拌以促進反應進行。當反應時間結束，將燒瓶製於冷水中冷卻至10 $^{\circ}\text{C}$ 以下，以1 G<sub>3</sub>的濾杯過濾，再用500 ml的蒸餾水洗滌殘留物後置於105  $\pm$  3 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘至恆重，全纖維素含量為： $(\text{全纖維素之絕乾重} / \text{樣本之絕乾重}) \times 100 \times (1 - \text{醇萃抽出物} \%)$ 。

## (五) 纖維長度分析

試材使用Franklin's method進行解纖，以過氧化氫：冰醋酸：蒸餾水= 1:5:4之解離溶液進行解纖，解纖完成後於洗漿網內以清水洗淨並分散，此時纖維呈現透明白色，取出部分於載玻片上，以剛果紅(Congo red)染色後，於投影機下量測纖維長度，每一樣品量取200根，以其平均值為該樣品之纖維長度。

## 五、製漿試驗分析

本試驗以硫酸鹽製漿法(Kraft pulping)，蒸解利用蒸煮鍋容量為5 L之不銹鋼蒸煮罐中進行硫酸鹽法製漿試驗。蒸煮條件為以4倍液比(liquor/wood ratio)，活性減添加量固定為17.0%，硫化度固定為25%，蒸煮溫度為160 $^{\circ}\text{C}$ ，以每分鐘1.88 $^{\circ}\text{C}$ 加熱，加熱90分鐘達到最高溫度。蒸解完成後，減壓降溫後取出漿料，以清水洗去殘餘藥液後，用手擠乾漿料，放入150網目之濾水袋中，經脫水至相當程度後，取少許漿料在105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱測漿料之含水率，算出紙漿之收率。卡巴值(Kappa number)之測

定，依照CNS 5470方法測定。

## 結果

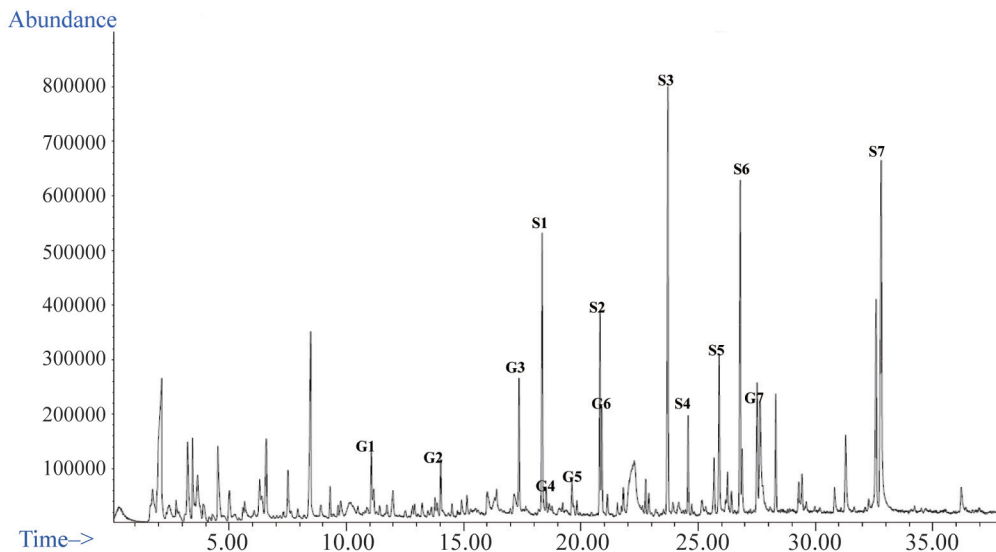
### 一、轉基因枝條與植物之驗證

本研究採用木質部專一性的啟動子，讓轉殖的*PtCAld5H*基因僅於桉樹基因體木質部表達，防止造成誘發基因多樣性效應。為了確認*PtCAld5H*基因是否順利轉入桉樹的再生芽體，於芽體和植物再生階段，定期取樣抽取total DNA，以多重聚合酶連鎖反應進行檢測。使用專一性引子NPTII-1/NPTII-2及CAld5H-F/CAld5H-R針對對照組(no. 48, negative control)及赤桉轉殖品系H201~H207進行multiplex PCR的結果顯示，所有轉殖品系和轉殖質體(positive control)都可擴增出符合預期大小的*PtCAld5H* (1544 bp)以及NPTII (785 bp)基因片段，在對照組中則沒有相對應的DNA片段被擴增出來(Fig. 3A)，這些結果證實外源*PtCAld5H*基因以及篩選基因NPTII確實已被轉殖到赤桉中。

源自7個獨立赤桉轉殖品系(H201~207)的轉基因植物的生根插條的葉片基因組DNA南方雜交分析結果如Fig. 3B，結果顯示7個轉殖*PtCAld5H*基因品系，經過酶切分離並與DIG-labeled DNA探針進行雜交反應後各自得到數目不等的訊號條帶，然而沒有一個單株的條帶一條條帶顯示出與質體條帶(約15 kb，數據未顯示)相同的大小，此結果進一步證實轉殖的外源*PtCAld5H*基因成功插入赤桉染色體基因組中。7個轉殖系中，H204~6三個品系顯示相同的插入模式，與其他4個轉殖品系(H201~3, H207)的插入模式均不相同(Fig. 3B)。

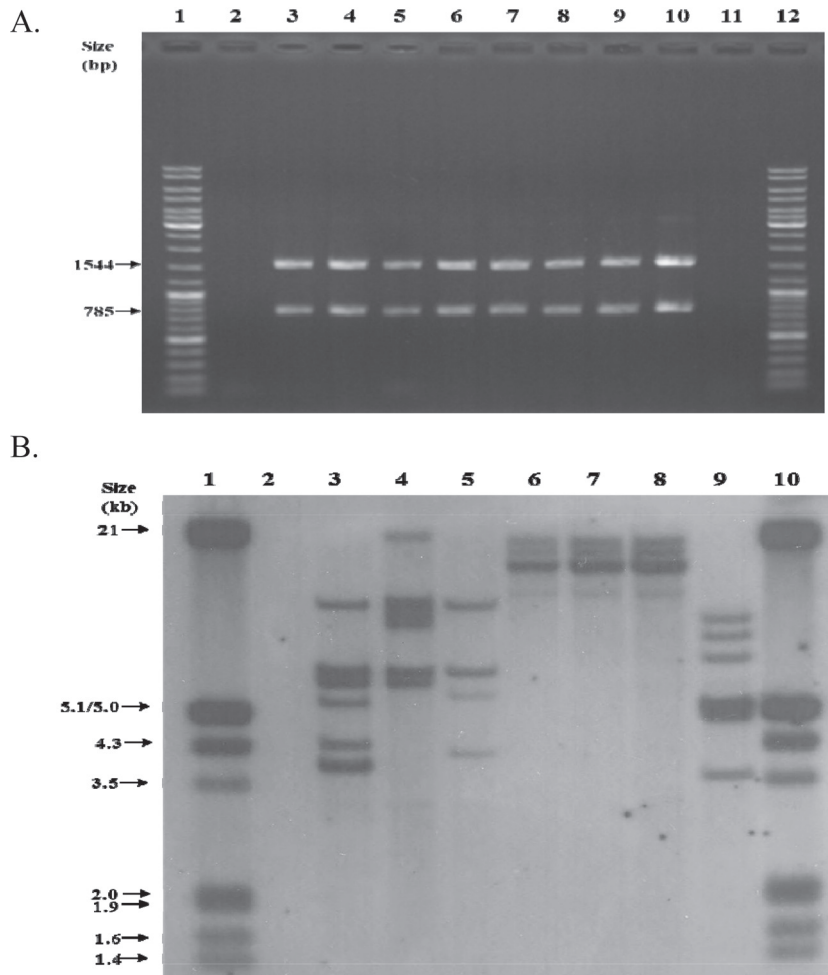
### 二、轉殖*PtCAld5H*基因赤桉之木質素含量、酸不可溶與酸可溶木質素變化

比較7個轉殖*PtCAld5H*基因赤桉品系與對照組(48號)的木材樣本之間木質素含量的差異，由Table 1結果可知，H205木質素含量 $32.4 \pm 0.5\%$ 顯著高於對照組與其他品系，H205之外的轉殖品系，木質素含量在 $29.3 \pm 0.1 \sim 30.9 \pm 0.6\%$ ，與對照組( $30.2 \pm 0.5\%$ )



**Fig. 2. Determination of syringyl (S)/guaiacyl (G) ratio of lignin monomers in the control line (48C) by Py-GC-MS. G1, guaiacol; G2, 4-methyl-guaiacol; G3, 4-vinyl-guaiacol; G4, 4-allyl-guaiacol (eugenol); G5, vanillin; G6, trans-isoeugenol; G7, trans-coniferyl alcohol; S1, syringol; S2, 4-methyl-syringol; S3, 4-vinyl-syringol; S4, 4-allyl-syringol; S5, syringaldehyde; S6, trans-4-propenyl-syringol; S7, trans-sinapyl alcohol.**





**Fig. 3.** Analysis of transgene integration using PCR amplification and a Southern blot analysis. (A) Integration of the *PtCald5H* and *NPTII* genes into the host plant genome was confirmed by a PCR. Estimated sizes of the *PtCald5H* and *NPTII* gene fragments were 1544 and 785 bp, respectively. Lanes 1 and 12, DNA ladder (Fermantas GeneRuler™ DNA ladder mix, Thermo Fisher Scientific); lane 2, a non-transgenic plant (48, negative control); lanes 3~9, transgenic plants carrying transgenes (H201, H202, H203, H204, H205, H206, and H207); lane 10, *Pt4CL1P::PtCald5H* plasmid (positive control); lane 11, blank (reaction without a DNA template). (B) Southern analysis of 7 transgenic eucalyptus plants. Lanes 1 and 10, DIG-labeled DNA ladder (DNA molecular weight marker III, Roche Applied Science); lane 2, a non-transgenic plant (48C, negative control); lanes 3~9: transgenic eucalyptus plants H201, H202, H203, H204, H205, H206, and H207.

則沒有顯著性差異。以對照組的木質素含量為100%，比較7個轉殖赤桉品系，可見最高的H205雖然顯著高於對照組與其他品系，但也僅高於對照組約7.3%，其他轉殖品系之木質素含

量則與對照組相差不多(Fig. 4A)。

木質素可以區分成酸不可溶與酸可溶木質素2類，7個轉殖品系中，酸不可溶木質素含量最高者為H205與H202，酸可溶木質素含量

**Table 1. Chemical compositions in stem wood of control and transgenic *Eucalyptus camaldulensis* plants**

	48C	H201	H202	H203	H204	H205	H206	H207
Lignin content (%)	30.2 <sup>bc</sup> (0.5)	29.8 <sup>c</sup> (0.2)	30.8 <sup>b</sup> (0.5)	30.5 <sup>bc</sup> (0.6)	30.9 <sup>b</sup> (0.6)	32.4 <sup>a</sup> (0.5)	30.5 <sup>b</sup> (0.7)	29.3 <sup>c</sup> (0.1)
Acid-insoluble lignin (%)	26.0 <sup>b</sup> (1.1)	25.3 <sup>bc</sup> (0.2)	26.3 <sup>a</sup> (0.5)	25.7 <sup>bc</sup> (0.7)	24.6 <sup>d</sup> (0.3)	26.7 <sup>a</sup> (0.1)	23.7 <sup>c</sup> (0.5)	24.7 <sup>cd</sup> (0.1)
Acid-soluble lignin (%)	4.1 <sup>c</sup> (0.6)	4.5 <sup>c</sup> (0.2)	4.5 <sup>c</sup> (0.2)	4.8 <sup>c</sup> (0.2)	6.4 <sup>ab</sup> (0.3)	5.7 <sup>b</sup> (0.4)	6.8 <sup>a</sup> (0.6)	4.6 <sup>c</sup> (0.2)
Syringyl (S) content (%)	75.1 <sup>b</sup> (1.1)	73.2 <sup>b</sup> (0.9)	74.2 <sup>b</sup> (2.0)	75.2 <sup>b</sup> (0.9)	88.1 <sup>a</sup> (1.6)	87.9 <sup>a</sup> (2.3)	87.9 <sup>a</sup> (1.2)	73.0 <sup>b</sup> (0.3)
Guaiacyl (G) content (%)	24.9 <sup>a</sup> (1.1)	26.8 <sup>a</sup> (0.9)	25.8 <sup>a</sup> (2.0)	24.8 <sup>a</sup> (0.9)	11.9 <sup>b</sup> (1.6)	12.1 <sup>b</sup> (2.3)	12.1 <sup>b</sup> (1.2)	27.0 <sup>a</sup> (0.3)
Lignin S/G ratio	3.0 <sup>b</sup> (0.2)	2.7 <sup>b</sup> (0.1)	2.9 <sup>b</sup> (0.3)	3.0 <sup>b</sup> (0.2)	7.5 <sup>a</sup> (1.1)	7.5 <sup>a</sup> (1.6)	7.3 <sup>a</sup> (0.8)	2.7 <sup>b</sup> (0.1)
Cellulose content (%)	67.9 <sup>a</sup> (1.5)	66.5 <sup>b</sup> (0.7)	65.8 <sup>b</sup> (0.9)	66.5 <sup>b</sup> (0.3)	68.8 <sup>a</sup> (0.6)	65.9 <sup>b</sup> (0.8)	66.0 <sup>b</sup> (1.0)	65.7 <sup>b</sup> (0.3)
Cellulose length (mm)	0.92 (0.12)	0.88 (0.07)	0.87 (0.1)	0.93 (0.09)	0.99 (0.08)	ND	0.95 (0.08)	ND
Cellulose/lignin ratio	2.3	2.2	2.1	2.2	2.2	2.0	2.2	2.2
Kraft pulp yield (%)	48.7 (0.9)	48.4 (1.2)	48.5 (1.9)	48.7 (0.1)	49.5 (0.9)	ND	49.1 (2.9)	46.9 -
Kappa number	24.3 (1.9)	24.1 (0.1)	25.6 (1.4)	24.6 (1.8)	18.0 (0.5)	ND	21.0 (2.4)	36.4 -

Values are the mean and SE in parentheses of two to three assays of different samples from each line. ND, not determined. Non-transgenic plant (48C), transgenic *Eucalyptus* plants (H201~7). Lignin, cellulose, syringyl, guaiacyl, and Kraft pulp yield contents are percentages of dry wood weight. The lignin S/G ratio is the syringyl content divided by the guaiacyl content. The cellulose/lignin ratio is the cellulose content divided by the lignin content.

分別為 $26.7 \pm 0.1$ 與 $26.3 \pm 0.5\%$ ，顯著高於對照組( $26.0 \pm 1.1\%$ )與其他品系，酸不可溶木質素含量最低者為H206、H204與H207，酸不可溶木質素含量分別為 $23.7 \pm 0.5$ 、 $24.6 \pm 0.3$ 與 $24.7 \pm 0.1\%$  (Table 1)。酸可溶木質素含量最高者卻為H206、H204與H205，酸可溶木質素含量分別為 $6.8 \pm 0.6$ 、 $6.4 \pm 0.3$ 與 $5.7 \pm 0.4\%$  (Table 1)。

以對照組的酸不可溶與酸可溶木質素之含量百分比為100%，可看到除了H202與H207酸不可溶木質素含量高於對照組外，其他轉殖品系與對照組相比較，都有2.7~8.9%的下降，在酸可溶木質素含量的部分，H201~7的酸可溶木質素都比對照組高，其中H206、H204與H205

比對照組高65.9、56.1與39% (Fig. 4B)，其中H206與H204兩個品系與對照組相比較，在酸不可溶木質素顯著低於對照組，而酸可溶木質素則顯著高於對照組。而H205則在酸不可溶與酸可溶木質素都顯著高於對照組。

### 三、轉殖*PtCald5H*基因赤桉之木質素單元組成之變化

比較轉殖赤桉品系與對照組木材syringyl (S)與guaiacyl(G)兩種木質素單體含量的差異，Table 1顯示，轉殖系H204~H206的S木質素單體含量百分比分別為 $88.1 \pm 1.6$ 、 $87.9 \pm 2.3$ 與 $87.9 \pm 1.2\%$ ，顯著高於其他品系( $73.0 \pm 0.3$ ~ $75.2 \pm 0.9\%$ )

與對照組( $75.1 \pm 1.1\%$ )；G木質素單體含量百分比則與S木質素單體含量百分比相反，H204~H206分別為 $11.9 \pm 1.6$ 、 $12.1 \pm 2.3$ 與 $12.1 \pm 1.2\%$ ，顯著低於其他品系與對照組的 $24.8 \pm 0.9 \sim 27.0 \pm 0.3\%$ 。由Fig. 4A 可看見H201~3與H207的S/G比率與對照組相當，而H204~6的S/G比率顯著比對照組高約2.5倍(Fig. 4A)，對照組的S/G比率為 $3.0 \pm 0.2$ ，而H204~6的S/G比率則分別為 $7.5 \pm 1.1$ 、 $7.5 \pm 1.6$ 與 $7.3 \pm 0.8$  (Table 1)。

#### 四、轉殖*PtCald5H*基因赤桉之全纖維素與得漿率之變化

轉殖*PtCald5H*基因赤桉木材的全纖維素含量與對照組沒有顯著差異，對照組的全纖維素含量為 $67.9 \pm 1.5\%$ ，而轉殖系H201~H207的全纖維素含量則在 $65.7 \pm 0.3 \sim 68.8 \pm 0.6\%$ 之間(Table 1)。在纖維長度部分，對照組的平均纖維長度為 $0.92 \pm 0.12$  mm，而H201~H207的纖維平均長度則在 $0.87 \pm 0.1 \sim 0.99 \pm 0.08$  mm之間，顯示轉殖*PtCald5H*基因赤桉木材的纖維長度並沒有改變(Table 1)。纖維素與木質素的含量比對照組為2.3，H205沒有測量之外，H201~H207則在2.1~2.5之間(Table 1)。得漿率對照組為 $48.7 \pm 0.9\%$ ，轉殖*PtCald5H*基因赤桉H201~H203的得漿率在 $48.4 \pm 1.2 \sim 48.7 \pm 0.1\%$ 之間，與對照組沒有差異，但H204與H206則比對照組高，分別為 $49.5 \pm 0.9$ 與 $49.1 \pm 2.9\%$ ，兩者的卡巴值也比對照組低，分別為 $18.0 \pm 0.5$ 與 $21.0 \pm 2.4$  (Table 1)。

## 討論

### 一、轉殖*PtCald5H*基因於赤桉

Chen et al. (2001)使用農桿菌(*A. tumefaciens*) CIB542將顫楊的*C4H*基因轉殖到赤桉48C品系，轉殖比率大約為35.8%，本研究採用Chen et al. (2001)相同的方法，使用相同的農桿菌CIB542將*PtCald5H*基因轉殖到相同的赤桉48C品系，所獲得的轉殖比率相近，並沒有因為轉殖基因不同而影響到轉殖比率。

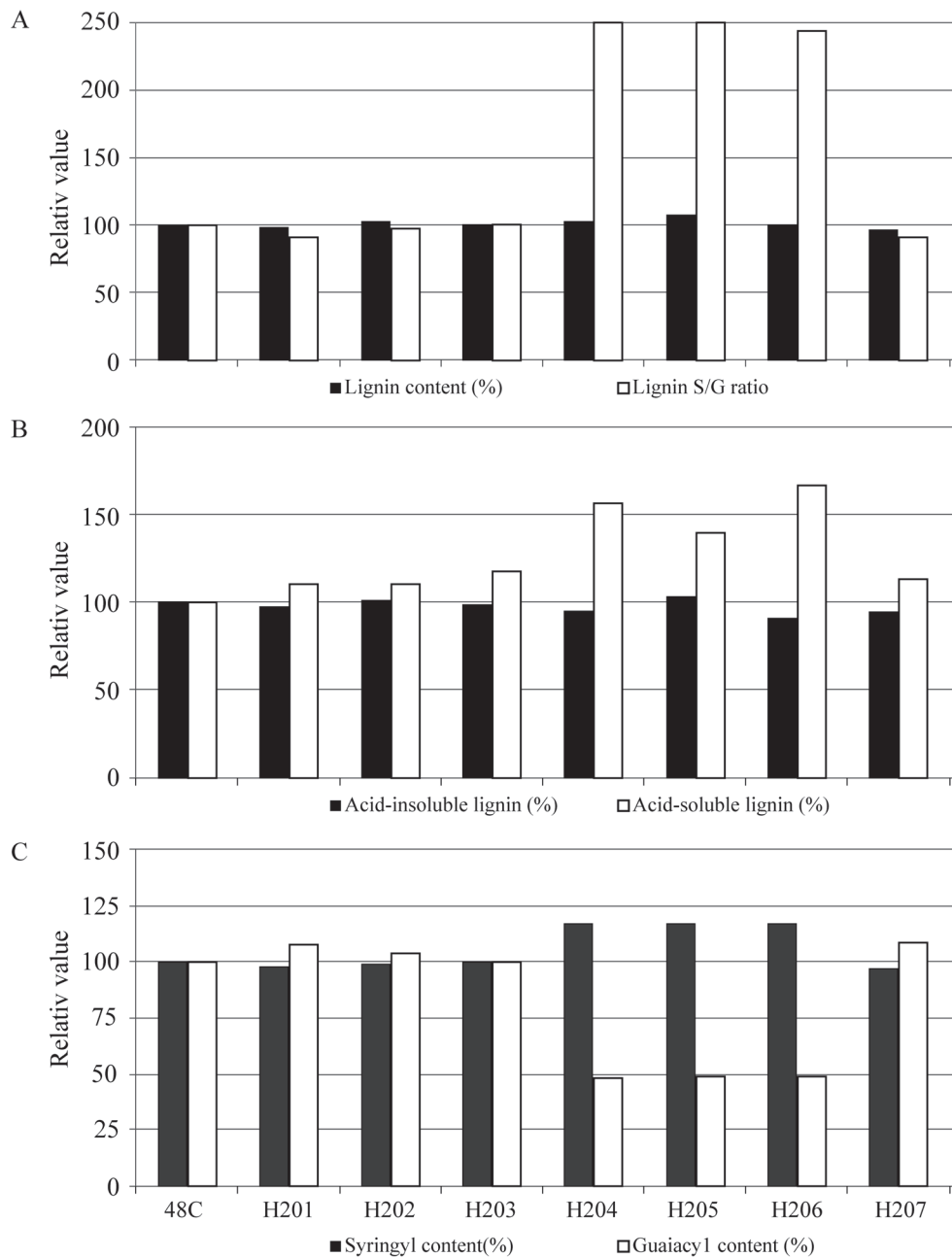
Li et al. (2003)以相同的轉殖系統轉殖*Pt4CL*與*PtCald5H*基因到顫楊(*Populus tremuloides*)，轉殖比率大約在50~60%之間，本研究赤桉轉殖比率與顫楊相比較低。

農桿菌基因轉殖為目前桉樹基因轉殖之主要方法Girijashankar (2011)，由於轉殖基因是以逢機的方式插入染色體，因此會產生不同的基因轉殖品系。本研究轉殖成功之癒傷組織陸續誘導成植株，共獲得轉殖*PtCald5H*基因赤桉植株H201~H207共7個轉殖品系，轉殖品系是陸續誘導產生，並非在相近時間獲取，此為目前桉樹基因轉殖的最大問題，Girijashankar (2011)認為桉樹基因轉殖成功與否有幾個先決條件，轉殖後培植體的再生系統為其中的關鍵，因此本研究轉殖系統後續需要再優化整個流程。

### 二、轉殖*PtCald5H*基因赤桉製漿性質之變化

轉殖順義式*PtCald5H*基因是否增加木質素含量？Table 1顯示木質素的總量除了H205與對照組相較，有顯著性差異，其他品系木質素含量都與對照組沒有顯著性的差異，H205木質素含量32.4%也僅高於對照組7.3%。為甚麼轉殖順義式*PtCald5H*基因沒有增加木質素的含量，Li et al. (2003)也在顫楊發現相同的結果，推測*Cald5H*酵素調節的是松柏醛(conifer aldehyde)的下游，因此沒有影響到木質素的含量。

木質素可分成酸可溶與不可溶木質素，酸可溶木質素是可溶於72%硫酸的木質素部分，含量相對較少(Yasuda et al. 2001)，本研究酸可溶木質素含量約為4.1~6.8%之間(Table 1)。木質素的含量在各品系與對照組相差不多，但是H204~6等3個品系，其酸可溶木質素顯著高於對照組，且增加最多達65.9%，因此轉殖順義式*PtCald5H*基因雖然沒有影響到木質素含量，但對於木質素的內在本質帶來了改變。S木質素含量較多的木材，其酸可溶木質素含量更高，紫丁香基核對硫酸的反應性高於癒創木酰基核，因為S木質素與72%硫酸的作用中，碳水化合物縮合反應期間具有更高的反應性，產生具有碳碳鍵的糖苷。這說明酸可溶性木質素與S木質素之間存在重要關係(Yasuda et al. 2001)。轉



**Fig. 4. Level of lignin reduction and lignin syringyl (S)/guaiacyl (G) ratio increase in stem wood of transgenic lines (H201~7) compared to the control line (48C).**

殖順義式*PtCald5H*基因增加了酸可溶木質素比率，而酸可溶性木質素與S木質素之間呈現正向關係(Novaes et al. 2009, 2010)，本研究顯示S木質素單元體含量百分比，H204~H206分別為

88.1±1.6, 87.9±2.3與87.9±1.2%，顯著高於其他品系與對照組的73.0~75.2%，因此酸可溶性木質素增加，是因為轉殖正義式*Cald5H*基因造成S木質素單元體的改變。木質素的生合成路徑

松柏醛經過*Cald5H*酵素，影響S木質素單體體的合成，*Cald5H*比其他兩種酵素慢6到50倍，這也表示*Cald5H*酵素成為S木質素單體生物合成方面的關鍵酵素(Li et al. 2000, 2003)。在闊葉樹林木，S木質素在次生木質部堆積，也表示木質化的過程逐漸完成。在細胞的分化的過程中，*Cald5H*基因造成S木質素在次生木質部堆積，因此加速了細胞的成熟過程，這個現象推測S聚合體的形成可能是次生細胞壁加厚的重要訊號(Li et al. 2003)。Tsai et al. (2020)利用CRISPR關掉雜交楊樹(*Populus tremula* × *alba*) *4CL1*基因，結果顯示S木質素單體下降，但對於其生物量影響卻很小，這與*Cald5H*酵素的減量調降(downregulation)效果相同。

闊葉樹木質素的單元組成主要為S與G木質素單體，由於*Cald5H*基因調節木質素往S木質素單體合成，將使S木質素單體增加，本研究H204~6等3個品系，其S木質素單體含量顯著高於對照組，且增加最多達17.3% (Table 1)。本研究顯示H204~6等3個品系其G木質素單體含量顯著低於對照組，其中H204的G木質素單體含量比對照組降低了52.2%，因此3個品系之S/G比率在7.3~7.5 (Fig. 4A)。在眾多桉樹品種中，赤桉的S/G比率大約在2~2.5 (Yokoi et al. 1999)，而藍桉(*E. globulus*)為桉樹屬裡S/G比最高的，最高可達6.4 (del Rio et al. 2005)，本研究H204~6等3個品系增加多達2.5倍(Fig. 4A)，也遠高於藍桉。因此本研究轉殖順義式*PtCald5H*基因，確認只有改變木質素單體體的合成方向，而未影響到木質素的含量。Novaes et al. (2009, 2010)，在毛果楊×楊樹雜交種的研究得到類似的結果，S木質素與總木質素含量之間呈正相關。Huntley et al. (2003)研究楊樹(*P. tremula* × *P. alba*)雜交種探討*Cald5H*基因的過度表達，觀察到S木質素單體增加，但總木質素含量沒有變化。

轉殖順義式*Cald5H*基因6個赤桉品系，H204~6等3個品系的S/G比率可達7以上，而另外4個轉殖品系與對照組僅為2.7~3 (Table 1)，Negishi et al. (2011)認為*Cald5H*基因表達高低影響藍桉(*E. globulus*)的木質素組成。因此S/G ratio

增加，與*Cald5H*酵素的活力程度緊密相關，本研究經由qPCR分析H204~6的*Cald5H*基因表達量顯著高於其他4個轉殖品系1~2倍。Rencoret et al. (2007)在製漿生產過程，S木質素單元比G木質素單元較容易移除，而*Cald5H*酵素扮演是木質素組成的重要決定因子，Negishi et al. (2011)認為*Cald5H*基因表達影響了木質素組成，也影響了最終的得漿率，我們的結果在H204與H206之得漿率比對照組高(Table 1)，也證實如此。

在樹木中，AldOMT酵素的下游調節造成S/G比降低，然而，同時增加了松柏醛(coniferaldehyde)和直接源自5-羥基松柏醇(5-hydroxyconiferaldehyde)之5-羥基松柏醇(5-hydroxyconiferyl alcohol)的結合，產生部分的環狀苯並二噁烷5-羥基癒創木酰基(cyclic benzodioxan 5-hydroxyguaiacyl)。這推測是木質素單體的生合成過程中的某種代謝之機動性的變化流動。下游調節肉桂醇脫氫酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)刺激了延遲coniferaldehyde轉變為lignin，因此減少了coniferaldehyde轉變為S與G木質素單體，導致改變了S/G比率。最重要的是，在樹木的這些與*Cald5H*酵素的調節是松柏醛的下游，並不會影響木質素的含量的改變。相反的，他影響了所有的木質素的結構。因此，這些結果推測了木質素單體代謝流動變化的模式，這個代謝流動對松柏醛之下游起了作用，而且是木質素單體生合成路徑的主要分支點。

越來越多的證據顯示，路徑彼此互相影響，酵素與物質通道化(substrate channeling)，使酵素代謝過程直接傳導給另一個酵素，這樣的運作非常具決定性的調節了木質素單體體的生理重要過程，而且調節過程代謝的機動性很高。未來多基因共同轉殖方法或許可以讓互相作用的酵素可以在植物體內一起作用，讓我們了解木質素生合成的生理機制。

## 結論

桉樹在全球的紙漿市場佔約四分之一，化學移除木質素獲取紙漿為目前主要的生產方



式，木質素的含量與組成若能夠改變與調控，將影響製漿生產流程及減低環境污染效益。本研究將顫楊順義式*CaId5H*基因轉殖到優良赤桉營養系，桉樹木質素的單元組成主要為S與G木質素單體，而*CaId5H*基因調節木質素組成，往S木質素單體合成，本研究H204~6等3個品系，其S木質素單體含量顯著高於對照組，且增加最多達17.3%，3個品系木質素單體S/G比率也比對照組高約2.5倍，製漿分析H204與H206品系，發現得漿率比對照組高，卡巴值也比對照組低。因此藉由基因轉殖方式可以了解木質素合成基因扮演的功能，未來研究將能夠對桉樹木質素進行改變與調控。

## 謝誌

本研究為公務預算補助計畫「林木遺傳特性與生物安全檢定檢測技術研發」執行成果。本研究感謝美國北卡州立大學姜立泉教授提供顫楊*Pt4CL1*基因啟動子以及*PtCaId5H*基因，中華紙漿公司協助製漿分析，研究過程感謝育林組林世鴻與吳濟琛協助試驗生長調查，廖侶智與廖珍平協助基因轉殖苗木生產，魏濟均、石鳳嬌、謝佩蓉與林巖等人協助樣品採集、處理與分析。

## 引用文獻

- Aitchitt M, Ainsworth CC, Thangavelu M. 1993.** A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Plant Mol Biol Rep* 11:317-9.
- Brewbacker JL, Kwack BH. 1963.** The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am J Bot* 50:859-65.
- Chan Y-L, Lin K-H, Sanjaya, Liao LJ, Chen WH, Chan MT. 2005.** Gene stacking in *Phalaenopsis* orchid enhances dual tolerance to pathogen attack. *Transgen Res* 14:279-88.
- Chang HM, Sarkanen KV. 1973.** Species variation in lignin effects of species on the rate of Kraft delignification. *TAPPI J* 56:132-4.
- Chang SH, Ho CK, Tsai JY, Chen ZZ. 2000.** Thidiazuron enhancement of plant regeneration from leaf calli of superior clones of *Eucalyptus camaldulensis*. *Taiwan J For Sci* 15(1):81-90.
- Chang SH, Yang JC. 1995.** Callus culture and regeneration of *Eucalyptus camaldulensis*. *Bull Taiwan For Res Inst New Ser* 10(1):15-24.
- Chen CF, Yang JC. 2002.** Vegetative propagation of *Eucalyptus grandis* × *urophylla* plus trees by stem cuttings. *Taiwan J For Sci* 17(3):301-9.
- Chen CF, Yang JC, Chang TY, Horng FW. 1995.** Results of the adaptability test of twenty *Eucalyptus* species grown in Taiwan. *Bull Taiwan For Res Inst New Series*. 10(3):283-92.
- Chen ZZ, Chang SH, Ho CK, Chen YC, Tsai JB, Chiang VL. 2001.** Plant production of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* carrying the *Populus tremuloides* cinnamate 4-hydroxylase gene. *Taiwan J For Sci* 16(4):249-58.
- Chen ZZ, Chen YC, Cho YH, Lin Y. 2006.** cDNA cloning and recombinant enzyme analysis of 4-coumarate: coenzyme A ligase from *Eucalyptus camaldulensis*. *Taiwan J For Sci* 21(1):87-100.
- Chen ZZ, Tsay JY, Chung JD. 1995.** Shoot regeneration from internode and petiole of plantlets multiplied from mature *Eucalyptus grandis* × *urophylla*. *Bull Taiwan For Res Inst New Ser* 10(1):1-7.
- Chen ZZ, Tsay JY, Chung JD. 1996.** Callus culture of *Eucalyptus grandis* × *urophylla* and preliminary studies on organogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation. *Taiwan J For Sci* 11(1):43-52.
- Chiang VL, Funaoka M. 1990.** The dissolution and condensation reactions of guaiacyl and syringyl units in residual lignin during Kraft delignification of sweetgum. *Holzforschung* 44:147-55.

- Chung JD, Chen ZZ, Tsai JB, Hsieh CJ, Li YJ. 2007.** Promotion of flower induction in transgenic *Eucalyptus camadulensis* trees by paclobutrazol. *Taiwan J For Sci* 22(4):455-67.
- del Rio JC, Gutierrez A, Hernando M, Landin P, Romero J, Martinez AT. 2005.** Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS. *J Anal Appl Pyrol* 74:110-5.
- Girijashankar V. 2011.** Genetic transformation of eucalyptus. *Physiol Mol Biol Plants* 17(1):9-23.
- Halpin C. 2005.** Gene stacking in transgenic plants-the challenge for 21st century plant biotechnology *Plant Biotech J* 3:141-55.
- Ho CK, Chang SH, Tsay JY, Tsai CJ, Chiang VL, Chen ZZ. 1998.** Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. *Plant Cell Rep* 17(9):675-80.
- Ho CK, Chen YC, Chen ZZ. 2002.** cDNA cloning and sequence analysis of 5-hydroxyconiferaldehyde O-methyltransferase from *Eucalyptus camaldulensis*. *Taiwan J For Sci* 17(4):429-38.
- Ho CL, Su YC 2007.** Analysis of S/G ratio of lignin monomers by Py-GC-MS. *Taiwan For Res Newsletter* 14(4):40 [in Chinese].
- Hu WJ, Harding SA, Lung J, Popko JL, Ralph J, Stokke DD, et al. 1999.** Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nat Biotech* 17:808-12.
- Huntley SK, Ellis D, Gilbert M, Chapple C, Mansfield SD. 2003.** Significant increases in pulping efficiency in C4H-F5H-transformed poplars: improved chemical savings and reduced environmental toxins. *J Agric Food Chem* 51:6178-83.
- Kan WH, Hu TW, Yang JC. 1990.** Preliminary results of adaptability of five eucalypt species planted in eastern Taiwan. *Bull Taiwan For Res Inst New Ser* 5(2):99-109.
- Li L, Zhou Y, Cheng X, Sun J, Marita JM, Ralph J, Chiang VL. 2003.** Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4939-44.
- Li L, Popko JL, Umezawa T, Chiang VL. 2000.** 5-Hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *J Biol Chem* 275(9):6537-45.
- Lu S, Shi R, Tsao C-C, Yi X, Li L, Chiang VL. 2004.** RNA silencing in plants by the expression of siRNA duplexes. *Nucl Acids Res* 32:e171: doi:10.1093/nar/gnh170.
- Magaton ADS, Colodette JL, Gouvea ADFG, Gomide JL, Muguet MCDS, Pedrazzi C. 2009.** Eucalyptus wood quality and its impact on Kraft pulp production and use. *TAPPI J Aug*:32-9.
- McCabe MS, Power JB, deLaat AM, Davey MR. 1997.** Detection of single-copy genes in DNA from transgenic plants by non-radioactive Southern blot analysis. *Mol Biotech* 7:79-84.
- Mersereau M, Pazour GJ, Das A. 1990.** Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene* 90:149-51.
- Meyermans H, Morreel K, Lapierre C, Pollet B, De Bruyn A, Busson R, et al. 2000.** Modification 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* 275:36899-909.
- Negishi N, Nanto K, Hayashi K, Onogi S, Kawaoka A. 2011.** Transcript abundances of LIM transcription factor, 4CL, CALD5H and CesAs affect wood properties in *Eucalyptus globulus*. *Silvae Genet* 60(6):288-96.
- Novaes E, Kirst M, Chiang V, Winter-Seder-**

- off H, Sederoff R. 2010. Lignin and biomass: a negative correlation for wood formation and lignin content in trees. *Plant Physiol* 154:1-7.
- Novaes E, Osorio L, Drost D, Miles B, Boaventura-Novaes C, Benedict C, et al. 2009. Quantitative genetic analysis of biomass and wood chemistry of *Populus* under different nitrogen levels. *New Phytol* 182:878-90.
- Poke FS, Vaillancourt RE, Potts BM, Reid JB. 2005. Genomic research in *Eucalyptus*. *Genetica* 125:79-101.
- Ranik M, Myburg AA. 2006. Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis. *Tree Physiol* 26:545-56.
- Sewalt VJH, Ni W, Blount JW, Jung HG, Masound SA, Howles PA, et al. 1997. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco downregulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol* 115:41-50.
- Somerville C. 2006. Cellulose synthesis in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:53-78.
- Southern EM. 1975. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-17.
- Tsai CJ, Xu P, Xue LJ, Hu H, Nyamdari B, Naran R, et al. 2020. Compensatory guaiacyl lignin biosynthesis at the expense of syringyl lignin in 4CL1-knockout poplar. *Plant Physiol* 183:123-36.
- Tsay JY, Chen, ZZ. 1995. Advancement on *in vitro* shoot elongation of *Eucalyptus grandis* × *urophylla*. *Bull Taiwan For Res Inst New Ser* 10(4):465-70.
- Yang JC, Ho CK, Chang SH, Chen ZZ. 1996a. Micropropagation of mature trees of *Eucalyptus camaldulensis* with fast-growing phenotype. *Taiwan J For Sci* 11(4):421-31.
- Yang JC, Ho CK, Chen ZZ, Chen CF. 1996b. Comparison of different methods of vegetative propagation of *Eucalyptus camaldulensis* plus trees. *Taiwan J For Sci* 11(4):433-43.
- Yasuda S, Fukushima K, Kakehi A. 2001. Formation and chemical structures of acid-soluble lignin I: sulfuric acid treatment time and acid-soluble lignin content of hardwood. *J Wood Sci* 47:69-72.
- Yokoi H, Ishida Y, Ohtani H, Tsuge S, Sonoda T, Ona T. 1999. Characterization of within-tree variation of lignin components in *Eucalyptus camaldulensis* by pyrolysis-gas chromatography. *Analyst* 124(5):669-74.