林业科学研究 2016,29(1):124～132
Forest Research

文章编号:1001-1498(2016)01-0124-09

杨树转基因研究进展及展望

丁莉萍, 王宏芝, 魏建华*

(北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心, 农业基因资源与生物技术北京市重点实验室, 北京 100097)

摘要:杨树是重要的栽培树种,也是研究林木基因工程的重要模式植物。杨树转基因研究可以打破种属限制,具有高效性和专一性的特点,是对杨树进行遗传改良的重要手段。为了更好的进行该方面的工作,本文介绍了杨树转基因涉及到的抗虫、抗除草剂、木材材性改良、抗逆、抗病、激素调控、开花调控和植物修复等应用领域的研究进展及现状,分析了影响杨树农杆菌转化效率的主要因素,并探讨了杨树转基因研究存在的问题及发展方向,希望能为后期从事林木基因工程研究的科研工作者提供依据。

关键词:杨树;转基因;农杆菌

中图分类号:S792.11 **文献标识码**:A

Progress and Prospect of Research in Transgenic Poplar

DING Li-ping, *WANG Hong-zhi*, *WEI Jian-hua*

(Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing Key Laboratory of Agricultural Genetic Resources and Biotechnology, Beijing 100097, China)

Abstract: To review the transgenic improvement of poplar, the progress and status of the poplar transgenic research relating to insect resistance, herbicide resistance, biomass traits, stress tolerance, disease resistance, hormone modification, flowering modification and phytoremediation were summarized. The factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of poplar were analyzed. Some problems existed in poplar transgenic research and developing direction were also explored.

Key words: poplar; transgenic; *Agrobacterium tumefaciens*

杨树是世界上广泛栽培的重要树种之一,又具有速生丰产、实用性强等特点,在城市绿化、生态建设和木材生产中发挥着不可替代的巨大作用。杨树基因组小,易于遗传操作;杨树有较为完善的遗传图谱,一些重要性状已被定位[1];杨树又是根癌农杆菌的天然寄主,便于利用根癌农杆菌介导法进行遗传转化[2],因此杨树被认为是林木基因工程研究的模式植物。现代植物基因工程技术定向性和预期性强,遗传稳定性好,已广泛应用于杨树品种改良和分子生物学研究[3]。

1 杨树转基因研究进展及现状

自1986年Parsons等[2]首次证实杨树可以进行遗传转化和表达外源基因以来,杨树转基因应用领域已涉及抗虫、抗除草剂、木材材性改良、抗逆、抗病、激素调控、开花调控和植物修复等方面,详情见表1。国外学者在杨树转基因研究中更多关注基因功能,主要体现在改良性状、转化树种和田间试验等方面;我国的杨树转基因研究起步较早,主要集中在具有经济和应用价值的基因研究上。

收稿日期: 2014-11-27

基金项目: 国家"863"计划"杨树抗虫关键基因的鉴定及分子育种技术研究"项目(2013AA102701-6)、北京市农林科学院青年科研基金项目(QNJJ201415)

作者简介: 丁莉萍,女,助理研究员,博士研究生,研究方向:林木基因工程;E-mial: dingluo2011@126.com

* 通讯作者:男,研究员,研究方向:植物基因工程;E-mial: weijianhua@baafs.net.cn

1.1　杨树抗虫转基因研究

杨树大规模种植,往往品种单一,致使虫害十分严重。化学药剂和生物杀虫剂不仅成本高,而且易造成严重的环境污染,因此培育抗虫品种,提高林木自身的抗虫能力成为培育杨树新品种的必然选择。

表 1　杨树转基因研究概况

性状	基因型	拉丁学名	转化受体	转化菌株	启动子/目的基因	启动子/筛选标记基因	文献
抗虫	欧洲黑杨	*P. nigra*	叶片或茎段	LBA4404	CaMV35S::*Cry1AC*	Pnos::*NPT*Ⅱ	[4]
	741 杨	*P. alba* × (*P. davidiana* + *P. simonii*) × *P. tomentosa*	叶片	LBA4404	CaMV35S::*Cry1Ac*; CaMV35S::*API*	*NPT*Ⅱ	[5]
	欧美杨	*P. euramericana*	叶片或茎段	pB48.214; pB482.15	CaMV35S::*Bt*	*NPT*Ⅱ	[6]
	美洲黑杨×小叶杨	*P. deltoides* × *P. simonii*	叶片或茎段	LBA4404	CaMV35S::*Bt*	Pnos::*NPT*Ⅱ	[7]
	毛白杨	*P. tomentosa* Carr.	叶片	LBA4404	CaMV35S::*Cry1Ac*; CaMV35S::*API*	*NPT*Ⅱ	[8]
	欧洲山杨×美洲山杨	*P. tremula* × *P. tremuloides*	茎段	C58/pMP90	Mas::*cry3Aa*	*HPT*	[11]
	美洲黑杨×欧洲黑杨; 毛果杨×美洲黑杨	*P. deltoides* × *P. nigra*; *P. trichocarpa* × *P. deltoides*	叶片	C58	CaMV35S::*cry3Aa*	*NPT*Ⅱ	[12]
	欧洲山杨×美洲山杨	*P. tremula* × *P. tremuIoides*	叶片或茎段	GV3101 (pMP90)	CaMV35S::*OCI*	Pnos::*NPT*Ⅱ	[13]
	美洲黑杨×小叶杨	*P. deltoides* × *P. simonii*	叶片或叶柄	LBA4404	CaMV35S::*AaIT*	Pnos::*NPT*Ⅱ	[14]
抗除草剂	银白杨×大齿杨	*P. alba* × *P. grandidentata*	叶片	C58; LBA4404	Mas::*aroA*	Ocs::*NPT*Ⅱ Mas::*NPT*Ⅱ	[15]
	银白杨×欧洲山杨;毛果杨×美洲黑杨	*P. alba* × *P. tremula*; *P. trichocarpa* × *P. deltoides*	茎段	C58C1	RbcS::*BAR*	Pnos::*NEO*	[16]
	欧洲山杨×银白杨	*P. tremula* × *P. alba*	茎段	C58pMP90; 82.139	PAt::*crsl-1*; P70::*crsl-1*	P70::*NEO*	[17]
	欧洲山杨×银白杨	*P. tremula* × *P. alba*	叶片	C58C1/pMP90	CaMV35S::*gsh* Ⅰ	Pnos::*NPT*Ⅱ	[18]
	毛果杨×美洲黑杨; 欧洲山杨×银白杨; 欧洲山杨×美洲山杨	*P. trichocarpa* × *P. deltoides*; *P. tremula* × *P. alba*; *P. tremula* × *P. tremuloides*	叶片	ABI; C58pMP90	FMV::*CP4/EPSPS*; FMV::*GOX*	CaMV35S::*NPT*Ⅱ	[19]
	欧洲山杨×美洲山杨;欧洲山杨×银白杨	*P. tremula* × *P. tremuloides*; *P. tremula* × *P. alba*	叶片或茎段	C58	pTA29::*BARNASE*; pSSUARA-TP::*BAR*	Pnos::*NEO*	[20]
材性调控	美洲山杨	*P. tremuloides*	叶片	C58	Pt4CL1P::*Pt4CL*; Pt4CL1P::*LsCAld5H*	Pnos::*NPT*Ⅱ	[22]
	欧洲山杨×银白杨	*P. tremula* × *P. alba*	叶或茎段	C58/pMP90	P70::*CCoAOMT*	*NEO*	[23]
	欧洲山杨×银白杨	*P. tremula* × *P. alba*	叶或茎段	C58/pMP90	C4H::*F5H*	CaMV35S::*NPT*Ⅱ	[24]
	欧洲山杨×银白杨	*P. tremula* × *P. alba*	叶片或茎段	C58/pMP90	CaMV35S::*CAD*; CaMV35S::*anti-CAD*	Pnos::*NPT*Ⅱ	[25]
	欧洲山杨×银白杨	*P. tremula* × *P. alba*	茎段	LBA4404	CaMV35S::*CCoAOMT*	CaMV35S::*NPT*Ⅱ	[26]
	缘毛杨	*P. ciliata* Wall.	叶柄	C58/pMP90	CaMV35S::*anti-CAD*	Pnos::*NPT*Ⅱ	[28]
	欧洲山杨×银白杨	*P. tremula* × *P. alba*	茎段	LBA4404	CaMV35S::*GS1a*	*NPT*Ⅱ	[29]
	抗逆银白杨×中东杨	*P. alba* × *P. berolinensis*	叶片	LBA4404	CaMV35S::*JERFs*	Pnos::*NPT*Ⅱ	[37]
	银白杨×欧洲山杨	*P. alba* × *P. tremula* var. grandulosa	叶片	LBA4404; C58	CaMV35s::*AtGSk1*	Pnos::*NPT*Ⅱ	[39]
	毛果杨;银白杨×中东杨;山杨×新疆杨	*P. trichocarpa*; *P. alba* × *P. berolinensis*; *P. davidiana* × *P. bolleana*	叶片	EHA105	*PtCBL10A*; *PtCBL10B*	*HPT*	[40]

续表 1

性状	基因型	拉丁学名	转化受体	转化菌株	启动子/目的基因	启动子/筛选标记基因	文献
抗病菌	银灰杨	*P. canescens*	叶片或茎段	C58C1/pMP90	CaMV35S::*PcISPS*; CaMV35S::*PcISPS-RNAi*	CaMV35S::*NPT*Ⅱ	[42]
	毛白杨	*P. tomentosa*	叶片	LBA4404	CaMV35S::*NP-1*	Pnos::NPTⅡ	[43]
	欧美杨;欧洲黑杨×马氏杨	*P. euramericana*; *P. nigra*×*P. maximowizii*	叶片	LBA4404	Win3.12::*ESF*12/*Ac-AMP*1.2	CaMV35S::*NPT*Ⅱ	[44]
	美洲黑杨	*P. deltoids*	叶片	EHA105	CaMV35S::*CH5B*	*HPT*	[45]
	毛白杨	*P. tomentosa* Carr.	叶片	EHA105; LBA4404	CaMV35S::*Bbchit*1; pBIN::*LJAMP*2	*HPT*;*NPT*Ⅱ	[46]
	欧洲山杨×银白杨;欧洲黑杨×马氏杨	*P. tremula*×*P. alba*; *P. nigra*×*P. maximowizii*	叶片	C58/pMP90	Ubi::*PtWRKY*23	*HPT*	[48]
激素调控	欧洲山杨×美洲山杨	*P. tremula L.*×*P. tremuloides* Michx.	茎段	GV3101	P1'2'::*iaaM*; CaMV35S::*iaaH*	Pnos::*HPT*; Pnos::*NPT*Ⅱ	[49]
	欧洲山杨×美洲山杨	*P. tremula*×*P. tremuloides*	茎段	GV3101	CaMV35S::*rolC*	*NPT*Ⅱ	[50]
	欧洲山杨×银白杨	*P. tremula x P. alba*	叶片或茎段	AGL1	*PtGA*20*ox*7; *PtGA*2*ox*2; *PtRGL*1_1; *PtRGL*1_2; *PtGAI*1	Pnos::*BAR*	[51]
	欧洲山杨×美洲山杨	*P. tremula L.*×*P. tremuloides* Michx.	叶片或茎段	GV3101	CaMV35S::*AtGA*20*ox*1	*NPT*Ⅱ	[52]
	欧洲山杨×银白杨	*P. tremula*×*P. alba*	叶片或茎段	EHA105	CaMV35S::*PcGA*2*ox*1	CaMV35S::*NPT*Ⅱ	[53]
开花调控	欧洲山杨×银白杨;欧洲山杨×美洲山杨	*P. tremula*×*P. alba*; *P. tremula*×*P. tremuloides*	茎段	C58/pMP90	CaMV35S::*PTLF*	*NPT*Ⅱ	[54]
	欧洲山杨×美洲山杨	*P. tremula*×*P. tremuloides*	茎段	GV3103	CaMV35S::*PtFT*1	Pnos::*NPT*Ⅱ	[55]
	欧洲山杨×美洲山杨	*P. tremula*×*P. tremuloides*	叶片	EHA105	CaMV35S::*PsFT*1; CaMV35S::*PsFT*2	*HPT*	[56]
	欧洲山杨×美洲山杨	*P. tremula*×*P. tremuloides*	茎段或叶片	GV3101	TA29::*BARNASE*	NPTⅡ;*BAR*	[57]
植物修复	欧洲山杨×银白杨	*P. tremula*×*P. alba*	叶片或茎段	C58C1	CaMV35S::*CYP*2*E*1	CaMV35S::*NPT*Ⅱ	[58]
	美洲黑杨	*P. deltoides* Bartr. e × Marsh.	叶片	C58	ACT2::*merB*	Pnos::*HPT*	[59]
	欧洲山杨;银白杨	*P. tremula*; *P. alba*	叶片	C58C1/pMP90	CaMV35S::*gsh*1	Pnos::*NPT*Ⅱ	[60]

我国对杨树苏云金芽孢杆菌(*Bt*)抗虫转基因的研究处于国际前列。1993 年,田颖川、韩一凡等首次将对鳞翅目昆虫有毒性的特异性 *Bt* 基因成功转入欧洲黑杨[4]。1994 年,田间试验表明转 *Bt* 基因的欧洲黑杨表现出了明显的抗虫效果。2002 年,该转基因杨树的一个株系(世纪杨)获得国家林业局良种审定和商品化许可,成为世界上第一个商品化栽培的转基因林木树种。同年年底,转双抗虫基因的 741 杨也通过了商品化许可[5]。在此期间,抗虫转基因欧美杨[6]、美洲黑杨[7]、毛白杨[8]等陆续培育成功,为不断推出杨树抗虫新品种储备了资源。近几年来,研究者们进行了大量的田间抗虫试验和生态安全监测。张冰玉等[9]系统地测定了抗虫转基因株系 BGA-5 产生的 Cry3A 蛋白对靶标昆虫、非靶标昆虫以及节肢动物群落的毒害作用,获得了大量数据。转基因杨树表现出对靶标昆虫有较高的抗虫性,对非靶标昆虫没有毒杀作用,对节肢动物群落不产生明显的负面影响;张雁等[10]分析了转 *Bt* 基因南林 895 杨株系对土壤微生物的影响,为转基因杨树安全性评估提供参考。与此同时,国外杨树 *Bt* 抗虫转基因研究也在不断发展[11]。2014 年,Klocko 等[12]通过对 *Bt-Cry3Aa* 转基因植株 14 年跟踪调查,发现 *Bt-Cry3Aa* 基因能够有效地降低虫害,从而提高杨树人工林的收益。

蛋白酶抑制剂基因和昆虫毒素基因具有高效性、抗虫谱广,安全性好等优点,已广泛应用于杨树抗虫转基因研究中[13-14]。双价或多价抗虫基因能够避免单个抗虫基因产生的耐受性,增强转基因植株的抗虫效果,成为培育杨树优良抗虫品种的重要手段[5,8]。

1.2 杨树抗除草剂转基因研究

在转基因杨树的所有性状中,抗除草剂性状是

杨树抗性基因工程研究取得成功的首要范例。抗除草剂基因主要包括抗草甘膦的 *aroA* 基因[15],抗草丁膦的 *bar* 基因[16]和抗绿磺隆的 *csr1* 基因[17]。2001 年,Gullner 等[18]报道了转谷氨酰半胱氨酸合成酶基因(γ-ECS)的杨树表现出对除草剂的抗性。该转基因杨树谷氨酰半胱氨酸和谷胱甘肽含量较高,这两种物质可以降解酰胺类除草剂,也能作为植物修复剂减少对土壤的污染。这些降解酶类抗除草剂基因的应用也许是未来抗除草剂发展的重要方向。多重除草剂抗性可使不同除草模式的新型除草剂基因混合使用成为可能。2002 年,Meilan 等[19]将 *CP4* 和 *GOX* 基因导入 3 个不同杂交杨中,转基因杨树表现出对草甘膦较高的耐受性。将抗除草剂基因和雄性不育基因结合育成不育系,为实现高产、优质、抗除草剂杨树杂种的育种目标奠定基础。2008 年,Li 等[20]将 *BAR* 基因和雄性不育基因 BARNASE 结合共同转化杨树无性系 INRA 353 – 38 和 717 – 1B4,转基因杨树在 8 年内均表现出稳定的除草剂抗性。

1.3　杨树木材材性改良转基因研究

纤维素和木质素含量是影响木材材质的两个主要因素。木质素含量低的木材在制浆加工过程中需要的化学试剂少,因此能够降低成本,改善环境。杨树木材材性改良可通过基因工程技术将木质素合成途径中的关键酶基因导入杨树来实现。研究表明,编码肉桂酸-4-羟化酶(C4H)[21]、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)[22]、咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶(CcCoAOMT)[23]、阿魏酸-5-羟基化酶(F5H)[24]和肉桂醇脱氢酶(CAD)[25]的基因是较为理想的用于造纸原料植物品质改良的目标基因。近年来,利用 *4CL* 与 *CcCoAOMT* 基因调节杨树木质素合成的研究取得很好的进展。抑制 *CCoAOMT* 表达的转基因杨树中,木质素含量明显下降,紫丁香基木质素/愈创木基木质素(S/G)比值增加,结构疏松,利于脱木质素[23, 26]。2011 年,Roque-Rivera 等[27]发现导入反义 *4CL* 和正义 *CAld5H* 基因的转基因美洲山杨木质素含量下降 35%,S/G 比增加 100 ～ 150%。2012 年,Thakur 等[28]报道反义表达 *CAD* 基因的缘毛杨转基因植株与非转基因植株相比,木质素含量下降 3 ～ 4%。

随着研究的不断深入,一些新的木质素调控途径被发现。2012 年,Coleman 等[29]报道在杨树中表达松树胞液谷氨酰胺合成酶基因(*GS1a*)后,木材的制浆性能得到了极大地改善。2013 年,Lu 等[30]研究发现在毛果杨中过量表达小 RNA 分子 Ptr-miR397a(这种小 RNA 分子可以下调其靶向漆酶基因的表达水平,抑制漆酶的活性),木质素的含量会明显降低。另外,利用 MYB 类、NAC 类转录因子在转录水平上调控关键基因[31]、寻找来源于微生物的关键酶来调节碳代谢流向等[32]都是很有效的途径。

生长速度与生物量积累也是树木基因工程改良的重要目标性状。2012 年,Ko 等[33]利用木质部特异性启动子增加木材生物量。Wang 等[34]发现反义表达 *4CL* 和 *CCoAOMT* 基因的毛白杨转基因株系木质素含量在 5 年内均有降低,并且 *CCoAOMT* 基因的抑制表达能够提高糖化作用,有利于杨树生物量的积累。Stout 等[35]系统地测定了美国东南部 3 个不同地理环境下种植的毛果杨转基因株系(As4CL,CH 和 PT)的木质素含量、S/G 比值、生长差异和生物量变化,指出较高的总木素含量和 S/G 比值与杨树地上生物量呈正相关性,评估了转基因杨树用来作为纤维素生物燃料的潜力。

1.4　杨树抗逆转基因研究

土壤的盐渍化和沙漠化、低温、高温是限制树木生存生长的重要环境因子。甜菜碱可作为渗透调节剂提高植物的耐盐性。近些年,甜菜碱在杨树上也有一些研究,但进展缓慢[36]。在调控杨树对逆境胁迫的应答工程中,与抗逆相关的转录因子[37]、脱水应答元件 *DREB* 类基因[38]等也发挥一定的作用。另外,参与环境胁迫信号传递的蛋白激酶,在植物抗逆过程中也起到重要作用。2013,Han 等[39]将拟南芥糖原合成酶激酶基因 *AtGSK1* 导入银白杨和欧洲山杨的杂交杨中。转基因杨树在盐胁迫处理后,氯离子浓度和相对电导率明显降低,抗旱耐盐性有所增强。2014 年,Tang 等[40]将钙调磷酸酶 B 类似蛋白家族的 *PtCBL10A* 或 *PtCBL10B* 基因导入到杨树中,来提高杨树抗盐性。杨树抗寒、耐热的转基因研究仍处于发展探索阶段。2006 年,Benedict 等[41]证明将拟南芥 *CBF1* 基因转化到杨树基因组中可以提高杨树的抗寒性。2007 年,Behnke 等[42]在杨树中过量表达或抑制异戊二烯合成酶基因 *ISPS*。当抑制 *ISPS* 基因表达时,异戊二烯的排放受到阻遏,转基因植株表现出一定的耐热性。

1.5　杨树抗病菌转基因研究

杨树受病菌侵害时,自身生长将受到严重影响。各种外源基因如防御素[43]、抗菌肽[44]和几丁质酶基因[45]等已被应用于林木的抗病菌改良中,这些研

究对提高杨树抗病能力和减轻病害起到了积极作用。研究发现,多个基因共转化时产生的复合产物对真菌的抵抗能力更强[46]。2012 年,Huang 等[46]将白僵菌几丁质酶基因(*Bbchit1*)和益母草脂质转运蛋白基因(*LJAMP2*)导入中国白杨基因组中,并获得稳定表达。转基因白杨的叶片能够抵御链格孢菌的侵袭。

近年来,研究者们对参与植物防御反应的转录因子如 WRKY、AP2/EREBP(Ethylene-responsive element binding factors)、MYB、bZIP [Basic (region-leucine) Zipper]等家族的调控机制的研究,为从根本上提高植物的抗病能力开辟了新的途径[47]。2009 年,Levee 等[48]从欧洲山杨 × 银白杨中克隆了 *PtWRKY23* 基因并将它导入到杂种杨树中,并系统分析了转基因植株中 *PtWRKY23* 基因的表达和功能,揭示了 *WRKY23* 基因参与抗杨叶锈病的调控机理,为杨树抗病研究提供了更多典范。

1.6 杨树激素调控转基因研究

激素对植物生长发育的调控一般是通过调控细胞的分裂、分化、伸长和死亡等方式来实现的。1995 年,Tuominen 等[49]将吲哚乙酸(IAA)合成基因 iaaM 和 iaaH 导入白杨杂种中,其中四个转基因株系的生长高度、茎干直径、茎节生长,叶片扩展和顶端优势的程度受到影响;另两个株系的导管变小,木材密度增大。1996 年,Nilsson 等[50]将发根农杆菌 *rolC* 基因导入杂交白杨,通过光谱定量分析发现转基因植株中吲哚乙酸、细胞分裂素,赤霉素(GA)的含量发生变化,从而诱导出植物表型的改变。

GA 是一类重要的植物激素,调控种子的发芽、茎秆的伸长、叶片的延展。2010 年,Han 等[51]研究了与 GA 新陈代谢相关的负调控因子 RGL、GAI 和 GA2ox 和正调控因子 GA20ox 对杨树生长发育的影响。将毛果杨的 *PtRGL1-1*、*PtGAI1* 和 *PtGA2ox2* 基因导入杂交杨 *INRA717 - 1B4* 中,转基因植株生长速度减缓,树干直径和体积增大;而 *PtGA20ox7* 基因的表达能够提高植株的增长速率,表达量与增长速率呈一定的相关性。这些研究与先前的报道一致[52-53]。激素调控能够改变植物的表型,获得更多的突变体,为育种工作者提供了丰富的育种材料。

1.7 杨树开花调控转基因研究

杨树开花之前需要经历一个较长的童期,因此会减缓育种进程。通过基因工程技术可以缩短童期,改变开花时间。FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1(FT/TFL1)基因家族的某些基因对植物开花调控起重要作用[54]。2006 年,Bohlenius 等[55]通过大量实验证明毛果杨 FT 同源基因除调控开花时间外,在秋季短日照条件下,还控制毛果杨停滞生长、春季休眠芽启动以及花芽分化等一系列发育过程。2012 年,Shen 等[56]将两个小叶杨中 FT 同源基因 *PsFT1* 和 *PsFT2* 导入幼年雄性杨树 T89 中,转基因杨树在 40 天内诱导开花,花分生组织出现在腋生的花序芽的侧翼。此外,一些实验室正在进行杨树雄性不育转基因方面的研究。2014,Elorriaga 等[57]将花药绒毡层特异性表达启动子 TA29 与雄性不育基因 *BARNASE* 嵌合得到 TA29-BARNASE,以 Ti 质粒为载体转化杂交杨(欧洲山杨 × 美洲山杨)获得雄性不育转基因植株。转基因植株的绒毡层发育被破坏,花药内不产生花粉。

1.8 杨树植物修复转基因研究

植物修复是指利用植物转移、隔绝和解除重金属,杀虫剂等污染物。目前,通过基因工程技术已经获得能够吸收汞、镉、铜、砷等重金属的转基因白杨。这些转基因白杨对杀虫剂和一些挥发性的碳氢化合物也具有一定的解毒作用。细胞色素 P450 2E1 是卤化物代谢过程的关键酶。通过转基因技术在白杨杂种体内过表达细胞色素 P450 2E1,转基因白杨对卤化物的代谢效率明显提高[58]。2007 年,Lyyra 等[59]发现导入了汞离子还原酶基因 *MerA* 和有机汞裂解酶基因 *MerB* 的转基因杨树能够耐受醋酸苯汞,并可以解毒有机汞。谷胱甘肽能够与重金属结合从而提高植物对重金属的耐受性。2011 年,Ivanova 等[60]报道了在胞液中过量表达 γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ-ECS)基因 *gsh1* 的转基因杨树增强了重金属耐受性。此外,植物络合素(PC)和离子转运蛋白基因在重金属修复方面的研究也取得了一定的进展[61]。当前环境污染日益严重,随着越来越多的修复性蛋白基因被开发利用,人类可以利用转基因杨树来解除重金属污染、净化空气、清洁土壤来修复日益恶化的环境。

2 影响根癌农杆菌介导杨树遗传转化效率的主要因素

目前,根癌农杆菌介导法是杨树遗传转化中应用最多,成功率最高的转化方法(表 1)。该方法具有的优点是操作简便、外源基因拷贝数低、转移片段

大,可选择的植物组织种类多等[62]。尽管如此,优化影响农杆菌转化的关键因子,提高转化效率,特别是建立栽培品种的高效的遗传转化体系仍然是杨树遗传转化所面临的问题。

2.1　基因型

基因型是影响农杆菌转化效率的决定因素,不同基因型外植体的分化率差别很大[63]。农杆菌转化成功的基因型大多是欧洲山杨,银白杨,黑杨以及他们的杂交种(表 1)。在我国华北地区,欧美杨和美洲黑杨的一些优良无性系是主栽品种,但其遗传转化体系还有待完善。

2.2　转化受体

转化受体的取材时期和生理状态对于转化能否成功至关重要。幼小的、代谢活力强的外植体由于组织或细胞分裂旺盛,DNA 大量合成,有利于 T-DNA 的摄入和整合,最易作为转化受体[62]。杨树通常采用从成年大树上直接选取幼嫩的部分或者先复幼后再取外植体来获得理想的转化受体。Han 等[64]研究表明从组培苗得到的受体材料比直接从温室或大田种植的材料更易诱导愈伤组织和分化芽苗。从表 1 可以看出,杨树的遗传转化中常选用叶片和茎段作为转化受体。呈现油绿、平展、水嫩状态的叶片,一般经农杆菌侵染后 7 天内,可以正常膨胀扩展,且叶片的分化率较高[64]。

2.3　外源激素

选择合适的外源生长素和细胞分裂素的种类及浓度可以提高植株的分化率,这是优化遗传转化体系的关键。杨树遗传转化研究中,常选用的细胞分裂素是 6-BA、IBA、ZT、TDZ 等,生长素为 NAA,IAA[65]。6-BA 在杨树芽苗的分化方面应用很广。此外,低浓度的类细胞分裂素 TDZ 也常用于诱导杨树不定芽的生成[66]。NAA 和 IAA 广泛用于杨树再生植株的诱导生根过程中,能与细胞分裂素互作,促进芽的增殖[62]。Yevtushenko 等[67]分析了不同激素 TDZ,2iP,BA,Zeatin,NAA,IAA 对黑杨 × 辽杨杂交杨不定芽分化和转化效率的影响。结果显示,0.1 ～ 1 μM TDZ 分化出不定芽最多,但是芽苗矮小,当放入生根培养基即被筛选剂杀死;含有 Zeatin 的分化培养基分化的芽苗鲜绿,非转基因植株逃逸少,转化效率最高。

2.4　农杆菌菌株

EHA105、C58、GV3103 三种农杆菌菌株使用频率较高(表 1)。章鱼碱型菌株 LBA4404 也广泛应用于毛白杨、欧洲山杨、银白杨等杨树的遗传转化中[7,26,37]。显然,农杆菌菌株对不同杨树基因型的敏感度和侵染能力不同。Howe 等[68]研究了 5 种不同农杆菌菌株 C58(pTiC58)、A281、C58(pTiC58-Z707)、EHA101、NT1 对银白杨 × 大齿杨的侵染情况,其中 C58(pTiC58)侵染效果最好。Han 等[64]研究表明对于一些顽抗的毛白杨杂交种的转化,EHA105 菌株优于 C58 和 LBA4404。

2.5　侵染和共培养条件

农杆菌的侵染和共培养条件包括农杆菌菌液浓度、浸染和共培养基、共培养时间、pH 值等。处于生长对数期的农杆菌对植物的侵染能力最强,一般 *OD* 值在 0.6 ～ 0.8 侵染效果好[64-65]。侵染和共培养基通常采用 MS 基本培养基,添加酚类化合物可诱导农杆菌 Vir 区基因的激活和表达,且酚类物质的诱导效果与 pH 值有很大关系[69]。另外,许多中性糖也可增强 Vir 区基因的诱导,如 Wu 等[70]在侵染和共培养基中均加入 1% 的葡萄糖,GUS 瞬时表达率提高;在侵染时添加表面活性剂可以促使菌液和转化受体充分接触,增加菌液附着几率。合适的共培养时间既能保证 T-DNA 的有效侵入,又能抑制农杆菌的过多生长,因此一般控制在农杆菌覆盖受体材料切口面为宜。

3　问题与展望

自 1987 年首次培育杨树转基因植株至今,通过基因工程技术将同源或异源的优良基因导入杨树基因组中进行遗传改良,取得了显著的进展,但也面临着许多挑战。

3.1　挖掘具有实用价值的功能基因

转基因技术成功应用的前提是必须拥有大量功能明确、具有实用价值和自主知识产权的关键基因。Bt 抗虫基因和抗除草剂基因已经成功应用在杨树转基因育种中,并显示出广阔的应用前景。杨树全基因组序列的测定,为功能基因组学(转录组学、蛋白组学、代谢组学)提供了条件,为杨树的遗传改良奠定了基础。

3.2　克隆组织特异性启动子

CAMV 35S 组成型启动子在杨树转基因中应用最广泛(表 1),但它容易积累大量异源蛋白质或代谢产物而产生毒害作用。虽然我们已在杨树中克隆了维管组织、花器官发育相关基因、抗逆基因的一些特异性启动子[71],而且对其结构和功能有了一定的

认识,但这些特异性启动子在转基因和育种的实际应用方面,还有许多问题有待解决。

3.3 发展多基因转化策略

杨树转基因研究多是利用单个目的基因改良个别性状,我们的目标是期望得到集高产、优质、多抗性为一体的超级杨树品种。实现多基因转化必须发展新型载体系统,如使用大容量的 YAC,BAC 人工染色体载体系统、利用叶绿体转化来进行多基因表达、使用独立表达框组合法、发展不依赖于限制性内切酶的 Gateway 特异位点重组系统等。

3.4 提高外源基因在转基因植株体内的表达

转基因成功的关键在于外源基因能否在转化体内稳定的遗传与表达,这反映了基因与性状间的关系。近年来关于 MAR(核质附着区)研究常有报道[72],利用生物信息学在杨树中克隆出 MAR 序列,可用于提高转基因杨树外源基因的表达效率。

3.5 重视合理解决标记基因生物安全问题

杨树转基因中常用新霉素磷酸转移酶基因(*NPT*Ⅱ)和潮霉素磷酸转移酶基因(*HPT*)为标记基因(表1),这些抗生素基因涉及到转基因安全问题。利用标记基因删除技术如共转化法、转座子法、位点特异性重组系统法等,有助于解决这些问题。我们也可发展安全标记基因的转化系统来筛选转化植株,如用 *pmi* 基因(6-磷酸甘露糖异构酶基因)作为标记基因,转化植株只能在以甘露糖为唯一碳源的培养基上生长[63]。

3.6 利用基因组定点编辑技术产生杨树突变体材料

近年来兴起的 *CRISPR/Cas* 基因组编辑技术可以在多种细胞的特定基因组位点上实现定点插入、缺失、突变或修饰,已成功应用于多种动植物物种中[73]。该技术的特点是操作简单、成本低、效率高。基于杨树全基因组测序已经完成,对于序列明确但功能未知的基因,我们可以通过 CRISPR/Cas 系统研究缺失相应基因的突变体,可为基因的功能验证提供直接证据。通过基因组编辑技术来分析与杨树抗虫、抗病、抗逆等相关的调控基因、转录因子和下游功能基因,这项技术的应用为杨树基因工程的发展呈现了更加美好的前景,有助于加快培育更优质、高产、多抗性的优良品种。

本文分析了近年来杨树转基因研究取得的进展和存在的问题,提出应积极开发具有实用价值和自主知识产权的新型基因,发展转基因新方法,希望能为后期从事林木基因工程的科研工作者们提供一些依据和参考。总之,杨树转基因研究还有许多问题有待深入地研究,随着新的理论和技术的不断发展,杨树转基因工作将会取得新的突破。

参考文献:

[1] 苏晓华, 张绮纹, 郑先武, 等. 美洲黑杨(*Populus deltoids* Marsh)×青杨(*P. cathayana* Rehd.)分子连锁图谱的构建[J]. 林业科学,1998,34(6):29-37.

[2] Parsons T J, Sinkar V P, Stettler R F, *et al*. Transformation of poplar by Agrobacterium tumefaciens[J]. Bio/Technology, 1986, 4: 533-536.

[3] Bradshwa H, Stettler R. Molecular genetics of growth and development in Populus[J]. Hereditas, 1940, 26: 367-378.

[4] 田颖川, 李太元, 莽克强, 等. 抗虫转基因欧州黑杨的培育[J]. 生物工程学报,1993,9(4):291-297.

[5] 田颖川, 郑均宝, 虞红梅, 等. 转双抗虫基因杂种741毛白杨的研究[J]. 植物学报,2000,42(3):263-268.

[6] 王学聘, 韩一凡, 戴莲韵, 等. 抗虫转基因欧美杨的培育[J]. 林业科学,1997,33(1): 69-74.

[7] 饶红宇, 陈 英, 黄敏仁, 等. 杨树 NL-80106 转 *Bt* 基因植株的获得及抗虫性[J]. 植物资源与环境学报,2000,9(2):1-5.

[8] 李科友, 樊军锋, 赵 忠, 等. 转双价抗虫基因毛白杨无性系85号抗虫性研究[J]. 西北植物学报,2007,27(8):1537-1543.

[9] Zhang B, Chen M, Zhang X, *et al*. Laboratory and field evaluation of the transgenic *Populus alba* × *Populus glandulosa* expressing double coleopteran-resistance genes[J]. Tree Physiology, 2011, 31: 567-573.

[10] 张 雁, 郭同斌, 潘惠新, 等. 转 *Bt* 基因南林895杨抗虫性及对土壤微生物影响分析[J]. 林业科学研究,2012,25(3):346-350.

[11] Genissel A, Leple J C, Millet N, *et al*. High tolerance against *Chrysomela tremulae* of transgenic poplar plants expressing a synthetic *cry3Aa* gene from Bacillus thuringiensis ssp tenebrionis[J]. Molecular Breeding, 2003, 11: 103-110.

[12] Klocko A L, Meilan R, James R R, *et al*. *Bt-Cry3Aa* transgene expression reduces insect damage and improves growth in field-grown hybrid poplar[J]. Can J For Res, 2014, 44: 28-35.

[13] Leple J C, Bottino B M, Augustin S, *et al*. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor[J]. Molecular Breeding, 1995, 1: 319-328.

[14] 伍宁丰, 孙 芹, 姚 斌, 等. 抗虫的转 *AaIT* 基因杨树的获得[J]. 生物工程学报,2000, 16(2):129-133.

[15] Fillatti J J, Kiser J, Rose R, *et al*. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector [J]. Nature Biotechnol, 1987, 5: 726-730.

[16] DeBlock M. Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones [J]. Plant Physiol, 1990, 93: 1110-1116.

[17] Brasileiro A, Tourneur C, Leple J C, *et al*. Expression of the mutant *Arabidopsis thaliana* acetolactate synthase gene confers chlorsulfuron resistance to transgenic poplar plants [J]. Trans Research, 1992, 1: 133 – 141.

[18] Gullner G, Komives T, Rennenberg H. Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides [J]. J Exp Bot, 2001, 52: 971 – 979.

[19] Meilan R, Han K, Ma C, *et al*. The *CP*4 transgene provides high levels of tolerance to Roundup herbicide in field-grown hybrid poplars [J]. Can J Forest Research, 2002, 32: 967 – 976.

[20] Li J, Meilan R, Ma C, *et al*. Stability of herbicide resistance over 8 years of coppice in field-grown, genetically engineered poplars [J]. Western Journal of Applied Forestry, 2008, 23(2): 89 – 93.

[21] Sewalt VJH, Ni W T, Blount JW, *et al*. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco downregulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase [J]. Plant Physiol, 1997, 115: 41 – 50.

[22] Li L, Zhou Y, Cheng X, *et al*. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 4939 – 4944.

[23] Meyermans H, Morreel K, Lapierre C. Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon downegulation of caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 36899 – 36909.

[24] Franke R, McMichael CM, Meyer K, *et al*. Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the Arabidopsis gene encoding ferulate 5-hydroxylase [J]. Plant J, 2000, 22: 223 – 234.

[25] Baucher M, Chabbert B, Pilate G, *et al*. Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar [J]. Plant Physiol, 1996, 112 (4): 1479 – 1490.

[26] Zhong R, Morrison III W H, Himmelsbach D S, *et al*. Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants [J]. Plant Physiol, 2000, 124: 563 – 577.

[27] Rouque-Rivera R, Talhelm A F, Johnson D W, *et al*. Effects of lignin-modified Populus tremuloides on soil organic carbon [J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2011, 174: 818 – 826.

[28] Thakur A K, Aggarwal G, Sribastaba D K. Genetic modification of lignin biosynthetic pathway in Populus ciliata Wall. via Agrobacterium-mediated antisense CAD gene transfer for quality paper production [J]. Natl Acad Sci Lett, 2012, 35(2): 79 – 84.

[29] Coleman H D, Canovas F M, Man H, *et al*. Enhanced expression of glutamine synthetase (*GS1a*) confers altered fibre and wood chemistry in field grown hybrid poplar (*Populus tremula* × *alba*) (717 – 1B4) [J]. Plant Biotechnology Journal, 2012, 10: 883 – 889.

[30] Lu S, Li Q, Wei H, *et al*. Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110: 10848 – 10853.

[31] Li C, Wang X, Lu W, *et al*. A poplar R2R3-MYB transcription factor, PtrMYB152, is involved in regulation of lignin biosynthesis during secondary cell wall formation [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2014, 119(3): 553 – 563.

[32] Payyavula R S, Tschaplinski T J, Jawdy S S, *et al*. Metabolic profiling reveals altered sugar and secondary metabolism in response to UGPase overexpression in Populus [J]. BMC Plant Biol, 2014, 14 (1): 265 – 278.

[33] Ko J H, Kim H T, Hwang I, *et al*. Tissue-type-specific transcriptome analysis identifies developing xylem-specific promoters in poplar[J]. Plant Biotechnology Journal, 2012, 10: 587 – 596.

[34] Wang H Z, Xue Y X, Chen YJ, *et al*. Lignin modification improves the biofuel production potential in transgenic *Populus tomentosa*[J]. Industrial Crops and Products, 2012, 37: 170 – 177.

[35] Stout A T, Davis A A, Domec J C, *et al*. Growth under field conditions affects lignin content and producitivity in transgenic *Populus trichocarpa* with altered lignin biosynthesis[J]. Biomass and Bioenergy, 2014, 68: 228 – 239.

[36] 刘凤华, 郭　岩, 谷冬梅, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因植物的耐盐性研究[J]. 遗传学报,1997,24(1):54 – 58.

[37] Li Y, Su X, Zhang B, *et al*. Expression of jasmonic ethylene responsive factor gene in transgenic poplar tree leads to increased salt tolerance[J]. Tree Physiology, 2009, 29: 273 – 279.

[38] Du N, Liu X, Li Y, *et al*. Genetic transformation of *Populus tomentosa* to improve salt tolerance[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2012, 108: 181 – 189.

[39] Han M S, Noh E W, Han S H. Enhanced drought and salt tolerance by expression of AtGSK1 gene in poplar[J]. Plant Biotechnol Rep, 2013, 7: 39 – 47.

[40] Tang R J, Yang Y, Yang L, *et al*. Poplar calcineurin B-like proteins PtCBL10A and PtCBL10B regulate shoot salt tolerance through interaction with PtSOS2 in the vacuolar membrane[J]. Plant, Cell and Environment, 2014, 37: 573 – 58.

[41] Benedict C, Skinner J S, Meng R, *et al*. The CBF1-dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp[J]. Plant, Cell Environ, 2006, 29: 1259 – 1272.

[42] Behnke K, Ehlting B, Teuber M, *et al*. Transgenic, non-isoprene emitting poplars don't like it hot[J]. Plant J, 2007, 51: 485 – 499.

[43] 赵世民, 祖国诚, 刘根齐, 等. 通过农杆菌介导法将兔防御素 NP-1 基因导入毛白杨(*P. tomentosa*)[J]. 遗传学报,1999,26(6):711 – 714.

[44] Liang H, Catranis C M, Maynard C A, *et al*. Enhanced resistance to the poplar fungal pathogen, *Septoria musiva*, in hybrid poplar clones transformed with genes encoding antimicrobial peptides[J]. Biotechnol Lett, 2002, 24: 383 – 389.

[45] 孟　亮,李红双,金德敏, 等. 转几丁质酶基因黑杨的获得[J]. 生物技术通报,2004,3:48 – 51.

[46] Huang Y, Liu H, Jia Z, *et al*. Combined expression of antimicrobial genes (Bbchit1 and LJAMP2) in transgenic poplar enhances re-

sistance to fungal pathogens[J]. Tree Physiology, 2012, 32: 1313 -1320.

[47] 金 慧,栾雨时. 转录因子在植物抗病基因工程中的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2010,30(10):94 -99.

[48] Levee V, Major I, Levasseur C, *et al*. Expression profiling and functional analysis of *Populus WRKY*23 reveals a regulatory role in defense[J]. New Phytologist, 2009, 184: 48 -70.

[49] Tuominen H, Sitbon F, Jacobsson C, *et al*. Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid Aspen expressing *Agrobacterium fumefaciens* T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes[J]. Plant Physiol, 1995, 109: 1179 -1189.

[50] Nilsson O, Moritz T, Sundberg B, *et al*. Expression of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene in a deciduous forest tree alters growth and development and leads to stem fasciation[J]. Plant Physiol, 1996, 112(2): 493 -502.

[51] Han K M, Dharmawardhana P, Arias R S, *et al*. Gibberellin-associated cisgenes modify growth, stature and wood properties in *Populus*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2010, 1 -17.

[52] Eriksson M E, Israelsson M, Olsson O, *et al*. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length[J]. Nat Biotech, 2000, 18: 784 -788.

[53] Busov V B, Meilan R, Pearce D W, *et al*. Activation tagging of a dominant gibberellin catabolism gene (GA 2-oxidase) from Poplar that regulates tree stature[J]. Plant Physiol, 2003, 132: 1283 -1291.

[54] Rottmann W H, Meilan R, Sheppard L A, *et al*. Diverse effects of overexpression of *LEAFY* and *PTLF*, a poplar (*Populus*) homolog of LEAFY/FLORICAULA, in transgenic poplar and Arabidopsis[J]. Plant J, 2000, 22: 235 -245.

[55] Bohlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, *et al*. CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees[J]. Science, 2006, 312: 1040 -1043.

[56] Shen L, ChenY, Su X, *et al*. Two FT orthologs from Populus simonii Carriere induce early flowering in *Arabidopsis* and poplar trees [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2012, 108: 371 -379.

[57] Elorriaga E, Meilan R, Ma C, *et al*. A tapetal ablation transgene induces stable male sterility and slows field growth in Populus[J]. Tree Genetics & Genomes, 2014, 10: 1583 -1593.

[58] Doty S L, James C A, Moore A L, *et al*. Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(43): 16816 -16821.

[59] Lyyra S, Meagher RB, Kim T, *et al*. Coupling two mercury resistance genes in Eastern cottonwood enhances the processing of organomercury[J]. Plant Biotechnol J, 2007, 5: 254 -262.

[60] Ivanova L A, Ronzhina D A, Ivanov L A, *et al*. Over-expression of gsh1 in the cytosol affects the photosynthetic apparatus and improves the performance of transgenic poplars on heavy metal-contaminated soil[J]. Plant Biology, 2011, 13: 649 -659.

[61] Cobbett C S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification[J]. Plant Physiol, 2000, 123: 825 -833.

[62] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京:科学出版社,2002.

[63] Coleman G D, Ernst S G. In vitroshoot regeneration of Populus deltoides: effect of cytokinin and genotype[J]. Plant Cell Rep, 1989, 8: 459 -462.

[64] Han K H, Meilan R, Ma C, *et al*. An Agrobacterium tumefaciens transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus Populus)[J]. Plant Cell Rep, 2000, 19: 315 -320.

[65] Leple J C, Brasileiro AC M, Michel M F, *et al*. Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs [J]. Plant Cell Reports, 1992, 11: 137 -141.

[66] Huetteman C A, Preece J E. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody culture [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 1993, 33(2): 105 -119.

[67] Yevtushenko D P, Misra S. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of commercial hybrid poplar *Populus nigra L.* × *P. maximowiczii* A. Henry[J]. Plant Cell Rep, 2010, 29: 211 -221.

[68] Howe G T, Goldfarb B, Strauss S H. *Agrobacterium* mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and regeneration of transformed plants[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 1994, 36: 59 -71.

[69] Godwin I, Todd G, Lioyd F B, *et al*. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species[J]. Plant Cell Reports, 1991, 9: 671 -675.

[70] Wu H X, Sparks C, Amoah B, *et al*. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat [J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 659 -668.

[71] 姚 叶, 唐 琪, 李江艳, 等. 杨树基因启动子的克隆及功能研究进展[J]. 山东林业科技,2012,(5):121 -125.

[72] Han K H, Ma C P, Strauss S H. Matrix attachment regions (MARs) enhance transformation frequency and transgene expression in poplar[J]. Transgenic Research, 1997, 6: 415 -420.

[73] Shan Q, Wang Y, Li J, *et al*. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31: 686 -688.

(责任编辑:张 研)