

第 1 章 杨树基因工程的现状及发展前景

1.1 杨树基因克隆

1.1.1 杨树材性相关基因研究进展

树木在防风固沙、防止水土流失、美化环境、净化空气、维持地球生态系统的多样性等方面起着积极的作用，同时木材还是一种重要的可再生的资源。树木大于 85% 光合产物以木材（纤维素、木质素、半纤维等）的形式储存，这些以木材形式储存的光合产物也是工业生产的原材料，如造纸业、胶合板材生产业、家具生产业等。随着经济的发展，人民生活水平不断提高，消费观念改变，对木材品质的要求越来越多。树木为多年生物种，成材慢，育种和经营周期长，因此以提高木材品质的育种研究也是林木遗传改良研究的重点。

杨树作为速生树种之一，世界范围内栽培广泛，遗传资源丰富，无性再生能力强，生长迅速，轮伐周期相对来讲比较短，被普遍认为是未来生物能源的重要物种之一，并且作为林木分子生物学的模式物种。Fredrik Sterky 等对来自杨树 *Populus tremula*, *P. tremula tremuloides* T89 和 *P. trichocarpa* 16 个 cDNA 文库的 102 019 个 EST (expressed sequence tag) 进行了测序分析，获得 12 759 个单一序列 (singleton)，与木材形成或与木材形成有关组织的文库有 5 个，它们分别是 Cambial zone A_B (*P. tremula* × *P. tremuloides*)、Active cambium UB (*P. tremula*)、Dormant cambium UA (*P. tremula*)、Tension wood G (*P. tremula* × *P. tremuloides*) 和 Wood cell death (Sterky et al. 2004)。美国能源部 (DOE) 发起和出资，美国橡树岭国家实验室具体实施，完成杨树全基因组测序，于 2006 年 9 月 21 日对公众开放了全序列数据库。杨树成为继拟南芥和水稻之后第三个测定全基因组序列的植物，并且是第一个测定全基因组序列的多年生木本植物。杨树全基因组序列用“鸟枪法”测定，序列库中共含有 7 649 993 个片段，去除叶绿体基因组的污染，测得的序列长度大约为 8×基因组。目前对序列拼接的组装已完成了 483 Mb，占杨树基因组物理全长的 90% 以上，基本上覆盖了杨树基因组常染色体的大部分。杨树全基因组测序的完成，为杨树基因功能组学研究打下了坚实基础。在国家“973”林木分子育种基础研究项目的支持下，杨树多标记遗传图谱的构建以及材性相关 QTL 定位的研究得以完成 (苏晓华和黄秦军 2004)。利用 AFLP (amplified fragment length polymorphism) 和 SSR (simple sequence repeat) 标记构建了美洲黑杨 × 青杨杂种遗传图谱 (黄秦军等 2004)。

1.1.1.1 木材性状的控制机理

1. 木材性状表现为数量性状遗传

木材材性是一个复杂的性状，包括物理性状和化学组成，而化学组成 (如纤维素、

木质素)又影响到木材的物理性状。从遗传学角度来讲,生物性状是由遗传和非遗传因素共同作用形成的,而木材的形成过程受生物和非生物因素影响比较大,尤其是环境条件如温度、光照、水肥、栽植密度等直接影响树木的生长,进而影响木材的材性。而外界环境条件影响树木的生长发育要通过改变树木内在基因的表达来起作用。因此,环境条件影响树木的生长发育相关基因的表达,而基因表达的改变进一步影响木材形成,从而影响到树木成材后木材的理化性状。研究表明,影响或决定木材性状的遗传表现为数量性状遗传,并受几个主效基因的控制(黄秦军和苏晓华 2003)。

2. 木材的形成过程

木材的形成是位于木质部外围维管束形成层(vascular cambium)活动的结果。树干维管束形成层由原初形成层(pro-cambium)分化而来(Esau 1965),通过横向向外分化形成韧皮母细胞(phloem mother cell),韧皮部母细胞进一步分化,最终形成韧皮部细胞组织。维管束形成层向树干内侧横向分裂形成木质部母细胞(xylem mother cell)。木质部母细胞进一步分裂形成多层初生木质部细胞,经分化后形成管胞、导管和纤维细胞,初生木质部细胞分化过程中形成初生细胞壁(Plomion et al. 2001)。初生木质部细胞分裂结束后,进入体积扩大阶段,在此过程中初生细胞壁组分被逐步松动、降解,以便于细胞进行延伸扩大。当细胞扩大到一定范围后就进入次生生长,细胞质膜以主动运输形式向质膜周围沉淀细胞壁组分,并且木质化,最后形成次生细胞壁,随后形成次生壁的细胞进行程序性死亡,形成成熟木质部组织。次生细胞壁由外而内大致可以分为三层:S1、S2和S3(Timell 1986)。其中,次生细胞壁S2最为重要,它占整个细胞壁厚度的75%~85%。而平常人们所指的微纤丝角,也就是次生细胞壁S2层中纤维素晶体与细胞纵轴之间的夹角,其大小为 5° ~ 30° 。次生细胞壁S1和S3层占整个细胞壁厚度比例较小,对木材性状的影响也比较小,其微纤丝角角度平均为 60° ~ 90° (Plomion et al. 2001)。

3. 木材性状与木质部细胞次生生长的关系

木材中,纤维素和木质素相对含量、纤维长度、微纤丝角的大小,细胞壁成分、细胞大小等直接影响木材的物理性质(Meylan 1968, 1972)。一般情况下,次生细胞壁微纤丝角度越小,细胞壁越厚,细胞间隙和细胞个体越小,木质素含量越高木材的相对密度就越大(Deresse and Shepand 1999)。初生木质部细胞需要经过细胞扩张,次生壁加厚、细胞壁木质化和程序性细胞死亡等过程形成成熟的木质部。由此可以得出初生木质部细胞的成熟过程影响木材的密度。初生木质部细胞的扩张受初生细胞壁微纤维及附着其上的多糖(纤维素、半纤维素、果胶等)和蛋白质(α -伸展蛋白、延伸蛋白)的机械障碍作用,初生细胞在扩张之前,首先解除初生细胞壁对初生细胞扩张的机械阻碍,木葡聚糖内转糖酶、内源葡聚糖酶、伸展蛋白、果胶甲基酯酶和果胶酶参与破坏多糖分子间和分子内的交联,促使初生细胞壁上的蛋白质相对于多糖滑动,消除初生细胞壁对细胞伸展的束缚作用(Higuchi 1997)。细胞在完成初生扩张后,就进入次生生长,形成次生细胞壁。次生细胞壁主要由多糖(纤维素、半纤维素、果胶等)、木质素、细胞壁组成蛋白和微量水溶性和非水溶性物质组成。纤维素占木材干重的40%~50%,纤维

素为纤维素合成酶催化下以 UDP-D-Glu 为底物合成的 β -1,4-葡萄糖聚合产物。半纤维素占木材干重的 25% 左右,属于杂聚合糖,主要由葡甘露糖、乳葡甘露糖等构成。在聚合糖合成酶和糖苷转移酶的作用下,先形成半纤维素的多糖骨架,之后将多糖侧链添加到多糖骨架上 (Keegstra and Raikhel 2001),木质素占木材干重的 25%~35%,木质素填充于由纤维素构成的框架中,增强树干的机械强度,利于疏导组织的水分运输和抵抗不良外界环境的侵袭。木质素主要是由三种单体 [香豆醇 (coumaryl alcohol)、松柏醇 (coniferyl alcohol) 和芥子醇 (sinapyl alcohol)] 构成的苯丙烷单体复合物,目前对植物体内木质素合成代谢途径和调控机制的研究比较深入,对木材木质化过程的基因研究后发现,在其启动子位置存在着基因定位表达的保守基序 (motif) (Lacombe et al. 2000)。

1.1.1.2 木材形成和影响木材性状基因研究进展

1. 纤维素合成酶基因

木质部次生细胞壁的形成主要包括纤维素的合成及在原生细胞壁上的沉积。纤维素合成酶 *CesA* 基因和 *CesA* 类似基因 (CSL) 影响次生壁形成。从约 40 种植物中发现 1200 多条 *CesA* 和 CSL 序列 (Richmond and Somerville 2000)。目前,已从日本柳杉、火炬松和杨属中克隆了 100 余个 *CesA* 和 CSL 基因相关的 EST 片段 (Joshi 2004)。纤维素合成酶复合体催化亚基已经被分离和克隆,拟南芥中至少有六个基因编码该催化亚基。在杨树 (Wu et al. 2000, Djerbi et al. 2005) 和火炬松 (Nairn et al. 2005) 中已克隆到 20 余个 *CesA* 基因。*CesA2* 基因从美洲山杨中克隆,并且发现其在已发育木质部的次生壁合成中特异表达,在韧皮部纤维中不表达。纤维素合成酶为多基因家族,在拟南芥中克隆到了 20 余种纤维素合成酶类似的基因,这些基因至少可分为六个基因家系,即 CSLA、CSLB、CSLC、CSLD、CSLE 和 CSLG,它们与 *CesA* 的同源性不高,仅为 30%~45%,CSL 基因的具体功能还不清楚,可能各 CSL 家系作用完全不同,也有可能所有 *CesA* 和 CSL 基因共同作用形成酶复合体参与次生细胞壁的合成 (Joshi 2004)。从美洲黑杨中发现存在 48 个纤维素合成有关的基因,其中,37 个基因在美洲黑杨的不同组织中表达,除 18 个属于 *CesA* 基因外,其他 30 个为 *CesA* 类似基因 (CSL) (Shiro et al. 2006)。美洲山杨 (*P. tremuloides*) 中分离到的 *PtrCesA5* 基因与拟南芥中的 *AtCesA3* 基因高度同源,*AtCesA3* 主要参与初生细胞壁的合成,而 *PtrCesA5* 于正在进行次生细胞壁合成的木质部中高量表达 (Udaya and Chandrashekar 2003)。

2. 木质素合成相关酶基因

木质素的生物合成和沉积是一个复杂的过程,由多种酶类参与,主要有苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、咖啡酸-3-O-甲基转移酶 (COMT)、咖啡酰 CoA 3-O-甲基转移酶 (CCoAOMT)、4-香豆酸-CoA 连接酶 (4CL)、肉桂酰乙醇脱氢酶 (CAD) 及肉桂酰 CoA 还原酶 (CCR) 等。

从百日草中分离出的咖啡酰 CoA-O-甲基转移酶基因 (CCoAOMT) 多达 5~10 个 (Ye et al. 1994)。赵华燕等 (2004) 从水稻茎中分离得到 CCoAOMT。Martz 等

(1998) 证实烟草具 4 个 CCoAOMT 的编码基因。苎麻中也克隆 1 个 CCoAOMT 基因 (Martz et al. 1998)。Hu 等 (1998) 在颤杨中克隆了 2 个结构、功能均不同的 4-香豆酸 CoA 连接酶 (4CL) 基因, 发现 *Pt4CL1* 参与木质素的合成, *Pt4CL2* 与类黄酮物质的生物合成有关。此外, 还从落叶松中分离了 4CL 的编码基因。刘卫平等 (2003) 从杜仲中克隆到肉桂醇脱氢酶基因 (CAD) 片段, 该核苷酸片段与 GenBank 中的苹果树肉桂醇脱氢酶 (CAD) 基因序列有 64.1% 的同源性, 与桉树 mRNA CAD 有 63.9% 的同源性。蔺占兵等 (2001) 证实小麦中至少存在有多个肉桂酰辅酶 A 还原酶基因 (CRR), 并进行了分离和表达分析, 表明 *W-cr6* 基因主要在小麦的茎和叶中表达, *W-cr19* 基因主要在根和茎中表达 (蔺占兵等 2001)。Zhao 等 (2003) 从白杨中克隆到 4CL 基因, 并对其表达进行了研究 (Zhao 2003)。Lu 等 (2006) 从杨树 (*P. tremuloides*) 中分离出 4 个肉桂酸-4-氢氧化酶 (C4H) cDNA (*PtreC4H*) 片段, 并且从毛白杨 (*P. trichocarpa*) 基因组中找到三个 C4H 位点, 肉桂酸-4-氢氧化酶催化肉桂酸第四个位置上加羟基反应, 生成 4-羟基-肉桂酸。该基因在杨树的木质部、韧皮部、花瓣中都有表达, 但家族中的各成员在杨树组织中的表达方式存在差异。通过对顺式 (*cis*-) 调控区域研究发现, 该基因家族的表达差异由不同的顺式调控区域 (box L, box P 和 H box) 控制, 表明在不同组织中不同成员存在不同功能。

3. 控制微纤丝角的相关基因

通过研究发现, 除细胞间相互的作用力能影响组成木材细胞的微纤丝角大小外, 一些细胞内部的结构也能影响次生细胞壁中微纤丝的排布。最突出的例子是, 通过组织解剖和特异抗体染色显微观察后发现, 细胞骨架的排布与次生细胞壁 S2 层的微纤维结晶的排列具有平行性 (Chaffey 2000)。该发现表明, 在某种程度上意味着胞内骨架指导胞外骨架 (细胞壁) 合成。但具体机制, 如细胞骨架又如何指导木材形成过程中纤维素合成酶复合体的运动方向还不是特别清楚。拟南芥 FRA1 蛋白的发现从侧面间接证实了这一观点, *fra1* 基因编码一种拟驱动蛋白 (kinesin-like protein), 该蛋白 N 端具一微管蛋白结合驱动域 (micro-tubule binding motor domain)。拟南芥 *fra1* 突变体果皮细胞壁组分与正常植株相同, 但果皮纤维微纤丝排布与正常植株相比存在明显差异 (Zhong 2002)。如果细胞骨架排布确实指导纤维素合成酶复合体的运动方式, 那么木材微纤丝角大小的决定因素由胞外转移到胞内。现在问题是如何影响细胞骨架的排布方向, 细胞骨架末端如何锚定在细胞膜上, 如果存在末端受体, 控制末端受体在膜上的分布机制是什么更是值得研究, 控制木材细胞微纤丝排布方向的基因是否与拟南芥中的一致还有待于证实。

4. 次生生长调节基因

植物激素 (生长素、赤霉素、细胞分裂素、乙烯、脱落酸) 和葡萄糖梯度分布对形成层木质部细胞的分化起到调控作用 (Sundberg et al. 2000)。Schrader 等 (2003) 从杨树正在木质化的组织中克隆到属于 AUX1 基因家族的运载蛋白基因 *PttLAX1-PttLAX3*。

通过对 *PttLAX* 基因的组织特异性表达分析, 表明生长素不同的浓度梯度与维管形

成层发育的不同阶段以及运载蛋白基因家族不同成员的特异表达有关,同时研究表明维管形成层中生长素的运输还受发育及环境因子的调控。另有研究发现杨树中的 *Aux/IAA* 基因为至少拥有 8 个成员 (*PttIAA1~PttIAA8*) 的多基因家族,这些基因在形成层区差异表达。在应力木的诱导形成中,*PttIAA* 基因的表达发生变化。这些研究表明 *PttIAA* 基因在形成层的发育以及木质部的形成过程中起作用(田敏等 2007)。

植物 MYB 转录因子参与植物苯丙烷类次生代谢途径的调节。拟南芥 MYB 转录因子家族基因的 4 个成员 (*AtMYB77, AtMYB73, AtMYB44* 和 *AtMYB51*) 与次生木质部的形成有关(Ko et al. 2004)。从火炬松木质部的 cDNA 文库中筛选到 MYB 家族成员 *PtMYB4*, 在杨树 EST 库, 筛选出 3 个参与次生维管组织形成的 MYB 家族成员, *PttMYB3Ra, PttMYB4a* 和 *PttMYB21a*。*PttMYB21a* 在次生细胞壁形成区域具有较高的表达量, 反义抑制 *PttMYB21a* 表达的转基因杨树植株的韧皮部具有较高的 *CCoAOMT* 转录水平, 表明 *PttMYB21a* 是 *CCoAoMT* 的转录抑制因子。

从正在分化的美洲山杨木质部和韧皮部中鉴定到一个 MADS Box 基因 *PTM5*, 认为 *PTM5* 基因参与了木材形成的发育过程(Cseke et al. 2003)。锌指蛋白基因 *PtaRHE1* 在杨树形成层区域特异表达, 特别地, 其信号仅定位于射线初始细胞及其衍生细胞中, 暗示该基因在形成层细胞同一性的决定和维持中起作用。考虑到射线在植物次生生长中的重要作用, 即它们能介导木质部和韧皮部的营养运输及信号转导, 因此推测 *PtaRHE1* 可能还与木质部与韧皮部之间的物质及信号交流有关(Raemdonck et al. 2005)。

1.1.1.3 展望和存在问题

一直以来, 育种工作者对林木材性的育种放在育种工作的首位。通过选择优良品系、优化栽植密度及合理的整枝、施肥、病虫害防治等手段来改善林木的生长环境, 以提高木材的品质。随着技术的发展, 尤其是近年来生物技术的发展, 分子标记辅助育种手段的运用, 一些与木材性状相关基因的陆续被发现、克隆和验证, 一批抗病虫害、环境耐受性高、生长迅速的转基因林木新品种的获得, 为从基因水平上改善林木材性提供了范例。杨树作为木本植物的模式物种, 全基因组测序的完成和生物芯片技术的日益完善, 便于从整个基因转录本中研究基因的功能。利用 RNAi 技术、基因敲除技术对单个或多个基因进行定向操作, 以便迅速了解基因的具体功能。

杨树为多年生物种, 个体高大, 生长周期、成材时间长, 受环境因素影响大, 一直成为制约育种工作开展的主要原因, 对于材性功能基因组学研究也是如此。与木材形成或与材性有关的基因大部分属于多基因家族, 各家族基因的表达模式也各不相同, 因此给基因的功能研究带来了不便。目前, 植物次生生长主要以模式植物拟南芥作为研究对象, 但木本植物与草本植物拟南芥的次生生长之间毕竟存在差别。因此, 要了解木本植物木材形成和影响木材形成的机制, 还需直接从树木本身着手。

1.1.2 杨树花发育相关基因及转基因研究现状

杨树 (*Populus L.*) 是世界上重要的速生栽培树种之一, 在生态环境建设及林业生产中发挥着不可替代的作用。

近年来,随着国内外转基因研究与产业化发展,转基因杨树环境释放面积迅速增加,仅我国抗食叶害虫转基因欧洲黑杨目前的栽培面积就已经达到 6000 亩^①(卢孟柱等 2006)。由于杨树分布广泛,生殖年限较长,花粉量大,花粉传播距离远,转基因杨树花粉传播所引起的基因污染等生物安全问题日益严重,已经引起了全世界的广泛关注(Carlson 2005, 侯英杰等 2006, Hoenicka and Fladung 2006)。对杨树开花进行调控可以从根本上解决转基因杨树花粉传播所引起的基因污染等问题。另外,对杨树开花进行调控还可以有效地缩短传统杂交育种周期,同时还能够通过延迟成龄树开花而增加木材产量,因此在分子水平上全面了解杨树花发育过程成为林木遗传育种研究领域的新课题。杨树作为多年生林木基因工程的模式树种,对其花发育的深入研究还将有助于揭示其他多年生木本植物花发育分子机理。

长期以来,杨树作为工业用材和造林树种,其遗传改良和分子机理研究主要针对生长、抗逆以及材质等营养体性状,而忽略了对其开花、结实等生殖生长方面的研究。另外由于杨树具有较长的幼龄期(通常为 5~8 年),从而不可能像拟南芥等模式植物那样获得大量可供研究的花表型突变体,这也在一定程度上限制了对杨树花发育分子机理的研究,因此,对杨树花发育的研究,尤其是在分子水平上的系统研究,较其他以果实为收获物的植物(如玉米、水稻等)还相当薄弱。

1.1.2.1 杨树花发育及其基因调控

1. 杨树花发育的特点

杨树一般为雌雄异株,经过 5~8 年的营养生长后,在一系列的内、外因素(如春化等)的作用下在第一个生长季形成花芽,冬眠后,在第二个生长季开花(Boes and Strauss 1994),并在其随后的生长周期内,每年春季开花。通常雌雄花只有 2 轮器官,即高度退化的花被、雄蕊或雌蕊。

与其他植物一样,杨树的花发育也分为开花诱导、花的发端和花器官发育三个阶段。大量研究表明,植物的花发育是由多种基因参与的十分复杂的调控过程(Jack 2004, Tan and Swain 2006)。首先,在外部环境和植物体内在信号的作用下,植物顶端分生组织从营养生长向生殖生长转变,这一过程主要受光周期促进、自发促进、开花抑制、春化促进、赤霉素诱导等多条途径共同控制(Simpson and Dean 2002)。这些途径综合作用在花/花序分生组织特异基因,导致茎端分生组织向花序(花)分生组织转化;接着,花/花序分生组织在成花转变中激活花器官特异基因的表达,形成花器官。

杨树的花发育与拟南芥等具有典型的完全花的草本植物有很大不同:一是杨树具有较长的幼年期,并且成年树开花具有季节性;二是杨树为雌雄异株,而多数草本植物是雌雄同株的;三是杨树花的形态结构与一年生草本植物有着显著的区别,雌雄花通常只有 2 轮器官,即高度退化的花被、雄蕊或雌蕊。

近年来,通过对拟南芥、金鱼草(*Antirrhinum majus*)、矮牵牛(*Petunia hybrida*)等模式植物花发育的研究,分离鉴定了一大批与植物花发育相关的基因,为阐明

^① 1 亩 \approx 667 m², 后同。

植物花发育的分子机理奠定了坚实的基础 (Irish 2003, Jack 2004), 同时也促进了杨树等多年生木本植物花发育分子机理的研究。杨树花发育既有与其他开花植物花发育的共性, 又存在着特殊性, 这一特点也就决定了杨树中虽然也存在着与拟南芥等草本植物中相同花发育相关基因, 但这些基因在表达方式、基因功能、调控等方面具有独特性。

2. 杨树开花诱导的基因调控

植物顶端分生组织从营养生长向生殖生长转变是受控于环境和植物体内在的信号, 这一过程称为开花诱导, 开花诱导是植物生殖生长启动的第一个阶段, 受光周期促进、自发促进、春化促进、开花抑制、赤霉素诱导和糖类诱导等多条途径控制 (Simpson and Dean 2002)。这些途径通过控制一些开花途径共同控制的整合基因, 如 *FLOWERING LOCUS T (FT)*、*LEAFY (LFY)* *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* 等, 实现对植物开花时间的调控。其中的 *LFY* 也在花/花序分生组织形成中起作用。

Hsu 等 (2006) 在美洲黑杨 (*P. deltoides*) 中已经克隆到了与其开花诱导或季节性生长等相关的基因 *FT2*。*FT2* 基因是拟南芥 *FT* 基因的同源基因。研究表明 *FT2* 在未达到成熟期的杨树幼树中表达量极少, 在成年杨树开花期大量表达, 当将该基因转入杨树幼树中时, 该基因的表达量增加, 并且在 1 年内开花, 因此该基因不仅作用于杨树开花诱导途径, 同时也在杨树季节性开花中起作用。Böhlenius 等 (2006) 也通过大量实验证实毛果杨的 *FT* 基因的同源基因 *PtFT1* 不仅能够调控杨树开花时间, 而且也在秋季树体停止生长和芽的形成中起作用。

3. 杨树花/花序分生组织形成的基因调控

植物开花途径整合基因的表达激活花/花序分生组织特异基因, 如 *FRUITFUL (FUL)*、*CAULIFLOWR (CAL)*、*LFY*、*APETALA1 (AP1)* 等, 导致茎端分生组织向花序 (花) 分生组织转化, 形成序 (花) 分生组织, 这一过程称为花的发端。其中, *AP1* 还在花器官发育中控制萼片和花瓣的发育。

在杨树中通过提高花/花序分生组织特异基因的表达量, 也能够促进其提早开花。目前在毛果杨 (*P. trichocarpa*) 中已经克隆到了与花序 (花) 分生组织形成相关的基因 *PTLF*。*PTLF* 基因是 *LFY* 同源基因, 该基因在发育中的花序中表达量最高, 在幼苗、叶原基和幼嫩的新叶, 特别是与花序相邻的叶芽中也有表达。在拟南芥异域表达 *PTLF* 基因 (35S::*PTLF*) 使转基因植株开花时间提前, 并有 1 个 35S::*PTLF* 转基因杨树株系也表现出提前开花的性状 (Rottmann et al. 2000)。

4. 杨树花器官形成的基因调控

植物成花转变中, 由于花/花序分生组织特异基因的表达, 激活花器官特异基因, 形成花器官。花器官特性基因控制花器官的发育, 在某一细胞中特定的基因组合即决定其发育形态。尽管杨树雌雄花只有 2 轮器官, 但研究表明, 它们具有同样的花发育的器官特性基因, 只是在基因作用范围等方面有所变化。

1) 植物花器官发育的经典模型——ABC 模型

1991 年 Coen 和 Meyerowitz 提出的花器官发育的 ABC 模型是植物花发育研究史上的经典 (Coen and Meyerowitz 1991)。该模型是在金鱼草、拟南芥遗传实验的基础上提出的: 与大多数典型的被子植物的花一样, 拟南芥的花由 4 轮同心花器官组成, 由外向内分别为花萼、花瓣、雄蕊和雌蕊, 之后由受精的心皮发育成果实。依据在花发育过程中所起的功能, 将控制花发育的器官特性基因分为 A、B、C 三类, 每类基因分别控制相邻两轮花器官的发育, 即第 1 轮花萼的发育由 A 基因控制, 第 2 轮花瓣由 A、B 共同控制, 第 3 轮雄蕊由 B、C 共同控制, 第 4 轮雌蕊由 C 基因单独控制。此外, A、C 两类基因相互拮抗, 即 A 功能基因能够抑制 C 在 1、2 轮的表达, C 反过来也能抑制 A 在 3、4 轮表达 (Weigel and Meyerowitz 1994, Ng and Yanofsky 2000)。之后, 随着花特异基因的不断发现, 对该模型进行了补充, 构成了目前的被子植物花发育的 ABC (DE) 模型, 其中, D 组基因控制胚珠的发育 (Colombo et al. 1995), 而 E 组基因与其余 ABC 类基因协同作用控制花瓣、雄蕊、心皮和胚珠的分化 (Pelaz et al. 2000)。下文以拟南芥中各类花器官发育基因为参照, 对杨树中控制花器官发育特性基因进行综述。

2) 杨树花器官特性基因

(1) A 类基因。在 ABC 模型中, A 类基因控制萼片的发育。在拟南芥中, A 类基因包括 *APETALA1* (*AP1*) 和 *AP2*。A 类基因与 B 类基因 (*AP3*、*PI*) 以及 E 类基因 (*SEP*) 一起控制花瓣的发育 (Theissen 2001)。*AP1* 功能缺失突变体的花器官向营养器官转变, 转 *AP1* 基因植株开花时间提前 (Irish and Sussex 1990, Bowman et al. 1993)。Cseke 等 (2003) 从美洲山杨 (*P. tremuloides*) 雌雄花穗中分离到 *AP1* 的同源基因 *PTM1* 和 *PTM2*, *PTM1* 在所有已知林木的 *AP1* 类基因中与 *AP1* 的同源性最高。表达分析表明, 与 *AP1* 相似, *PTM1* 和 *PTM2* 在还没有形成可见的花器官的花形成层中表达, 并在花发育过程中持续表达, 在冬眠前表达量降低, 冬眠后表达量升高, 当花成熟时再次降低。另外, *PTM1* 和 *PTM2* 基因在杨树雌雄株中表达也有差异, 因此它们有可能与杨树性别相关。

(2) B 类基因。拟南芥的 B 类基因只有 *APETALA3* (*AP3*) 和 *PISTILLATA* (*PI*) 两个。B 类基因在花瓣和雄蕊中表达 (Jack et al. 1992, Goto and Meyerowitz 1994)。B 类基因与 *AP1*、*SEP* 基因一起, 共同控制花瓣的发育, 与 *AG*、*SEP* 基因共同控制雄蕊的发育 (Honma and Goto 2001, Theissen 2001)。在毛果杨 (*P. trichocarpa*) 中已经克隆了 *PTD* 基因, 该基因在序列和表达方式上均与 *AP3* 类基因相似, 为 *AP3* 的同源基因。但由于杨树的花缺少花瓣, *PTD* 基因的作用范围有所减小, 仅在雌雄花内轮表达, 当花器官成熟时, 在雄蕊特异表达 (Sheppard et al. 2000)。因此 *PTD* 基因有可能是决定杨树性别的因素之一。王冬梅等 (2005) 通过 PCR 技术, 在毛白杨 (*P. tomentosa*) 中克隆了拟南芥 *AP3* 同源基因 *PtAP3*, Southern 杂交分析发现, 该基因在毛白杨雄株中为双拷贝, 在雌株中则为单拷贝。该基因在雌、雄株中拷贝数的差异是否是杨树性别的因素之一, 还有待研究。中国林业科学研究院林业研究所林木育种课题组从美洲黑杨雄性花芽 cDNA 文库中克隆了 *PI* 的同源基因 *PdPI*, 并通过相对定量 PCR 对其在不同器官中的表达进行了研究, 结果表明, 与拟南芥 *PI* 基因不同,

PdPI 基因在美洲黑杨花芽、根、茎、叶片和叶芽中均表达,在花芽、根中表达量较高,在茎、叶片和叶芽中的表达量极低。因此推断 *PdPI* 基因不仅与美洲黑杨花发育有着密切的关系,也可能对根等营养器官形成和发育起作用。

(3) C类基因。在拟南芥中C类基因仅有一个 *AGAMOUS* (*AG*)。 *AG* 在第3、第4轮的表达抑制 *AP1* 的表达, *AG* 与B类基因 *AP3*、*PI*, 以及E类基因 *SEP* 共同控制雄蕊的发育,与 *SEP* 基因一起控制心皮的形成 (Honma and Goto 2001, Theissen 2001)。拟南芥 *AG* 突变体的雄蕊转变成花瓣和心皮,并以萼片、花瓣、花瓣的模式多次重复,成为重瓣花 (Bowman et al. 1989)。在毛果杨 (*P. trichocarpa*) 中克隆的 *PTAG1* 和 *PTAG2* 基因具有C类基因功能。从花发育的早期至随后的各个阶段,这两个基因在雄花的内轮(雄蕊)和雌花的内轮(心皮)内表达 (Brunner et al. 2000)。然而与 *AG* 不同,该基因也在营养器官如叶片、树干中表达。

(4) D类基因。拟南芥中还有一些基因与C类基因同源性较高,但功能却与C类基因有所不同,如 *SHATTERPROOF1* (*SHP1*) 和 *SHP2* (也称为 *AGL1* 和 *AGL5*), *SHP1* 和 *SHP2* 功能冗余,在心皮和果实中特异表达,双基因突变体由于角果裂开区不能木质化而不能开裂 (Liljegren et al. 2000)。*SHP1*、*SHP2* 与在胚珠中特异表达的 *AGL11* 和 *AGL13* 基因 (Angenent and Colombo 1996) 一起,被归为D类基因。到目前为止,已经在苹果 (*Malus domestica*) 中克隆到两个D类基因 *MdMADS10* (Yao et al. 1999) 和 *MdMADS14* (van der Linden et al. 2002), 它们分别在果实中心区域表达和发育着的心皮中大量表达。在榛树 (*Corulus avellana*) 中也克隆到 *SHP* 类D类基因 *CaMADS1*, 主要在正在发育的心皮内表达,之后在胚珠中特异表达 (Rigola et al. 1998)。在杨树中还没有关于该类基因的报道。

(5) E类基因。拟南芥的 *SEP1*、*SEP2* 和 *SEP3* 等 *SEP* 类基因功能与B/C类组合基因相同,归为E类基因 (Pelaz et al. 2000)。*SEP* 类基因可与A、B、C类MADS-box基因相互作用,如 *SEP3* 和 *AG*、*AP1* 以及 *PI/AP3* 二聚体结合,在花的不同轮中起作用 (Honma and Goto 2001)。*SEP1*、*SEP2* 在四轮花器官形成层中均表达,当花器官形成后表达量降低 (Flanagan and Ma 1994)。*SEP1* 也在胚珠未成熟胚和种皮内高表达,*SEP3* 主要在花瓣雄蕊和心皮中表达 (Mandel and Yanofsky 1998)。在杨树中,*PTM3*、*PTM4* 及 *PTM6* 分别是 *SEP1*、*SEP2* 和 *SEP3* 类的基因。在雌雄花发育的各个阶段均能检测到 *PTM3/4* 及 *PTM6* mRNA 表达,*PTM3/4* 在顶芽、幼叶和幼茎中 *PTM3/4* 有微量表达。原位杂交显示,这3个基因在发育中的胚珠以及花药原基中大量表达 (Cseke et al. 2005)。

1.1.2.2 杨树开花的基因工程调控

目前,已从杨树中分离出了一些与花发育相关的基因,为利用基因工程手段进行杨树开花调控打下了良好基础。目前,对杨树进行开花调控主要应用于以下两个方面:

1. 促进杨树提早开花,加速其遗传育种进程

研究者主要通过遗传转化的方法将与花发育相关的基因导入杨树,使基因超表达,从而达到使转基因植株提早开花,极大地加快育种周期的目的。

1995年, Weigel和Nilsson将拟南芥 *LEAFY* 基因转入杂种杨 (*P. tremula* × *P. tremuloides*), 从而使转基因植株的花期明显提前。这是应用花发育相关基因进行杨树开花调控的首次报道。随后, 研究者致力于采用杨树自身花发育相关基因促进杨树提早开花。Rottman等(2000)将毛果杨中的 *LFY* 同源基因 *PTLF* 转入杨树, 使 35S::PTLF 转基因杨树株系表现出早花的性状。最近, Hsu等(2006)将美洲黑杨的拟南芥 *FT* 同源基因 *FT2* 转入杨树幼树中时, 使其在1年内开花。Böhlenius等(2006)将毛果杨的 *FT* 基因的同源基因 *PtFT1* 转入杂种杨 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) 中, 4周后农杆菌侵染的茎段即出现花状结构, *PtFT1* 表达量稍弱的植株6个月就可以形成正常的雌花和雄花。

2. 培育环境友好杨树新品种及推迟杨树开花时间

杨树作为木本植物基因工程的模式树种, 国内外杨树转基因研究迅速发展, 转基因杨树环境释放面积也随之迅速增加, 基因污染等问题日益突出, 因此, 培育不育的环境友好的转基因杨树已成为杨树育种研究领域的当务之急。目前, 用于杨树不育基因工程的基因主要是 *BARNASE* 基因, 一般将其置于花特异性启动子 *TA-29* 下进行表达。2000年, 李玲等将 *TA-29-BARNASE* 基因导入抗虫的转基因欧洲黑杨幼嫩叶片中, 经PCR、Southern blot、Dot blot分析证实了外源基因已经整合到再生植株的基因组中, 但未见后续报道。最近, Brunner等(2007)报道了转 *TA-29-BARNASE* 基因杨树在田间试验中表现出了高度雄性不育。但也有实验表明, 由于花特异性启动子的渗漏等原因, 会导致转基因杨树生长或形态不正常等问题 (Wei et al. 2006), 从而影响了其应用。

成年杨树花序量大, 花粉及种子发育消耗了大量可用于树体生长的营养物质, 因此如果可以推迟其开花, 就可能会大大增加木材产量。但到目前为止, 还未见这方面的成功报道。

1.1.2.3 展望

迄今为止, 在杨树中已经鉴定出一些与花发育相关的基因, 并对这些基因的表达、功能、调控方式等方面进行了研究, 为揭示杨树花发育的分子机理奠定了基础。由于杨树的花发育与拟南芥等草本植物有很大不同, 因此杨树中很可能存在着多年生木本所特有的花发育基因和花发育调控系统。但到目前为止, 还没有发现杨树不同于草本植物的花发育基因以及人们所猜测的多年生木本植物特有的开花调控分子机制。这一方面是由于杨树具有较长的童期, 很难从突变体出发直接鉴定和克隆调控林木花发育的特异基因; 另一方面可能是杨树等多年生木本植物虽然具有与草本植物相同的基因, 但人们尚未发现这些基因在木本植物中的具有独特的调控和作用方式。

在杨树花发育基因调控方面, 虽然通过基因工程方法, 已获得了提早开花及不育的转基因杨树, 但依旧存在一些技术上的问题, 使这些研究成果在杨树育种实践中不能普遍应用。尽管如此, 其应用前景仍然十分诱人。

随着杨树全基因组测序已经完成, 使世界各地的研究者均能够获得大量的杨树基因组序列 (<http://genome.jgi-psf.org/popltr1/popltr1.home.html>), 这将极大地推动杨

树花发育领域的研究。同时，基因芯片技术、RNAi 以及基因删除技术的发展也为全面系统地研究花发育分子机理提供了有力武器。因此，我们有理由相信，在不久的将来杨树花发育分子机制的研究将有重大突破，其遗传改良进程也将突飞猛进，并将有力地推动其他多年生木本植物花发育的研究。

1.1.3 杨树营养生长发育基因克隆与转化研究进展

杨树速生、易繁殖，是世界上重要的用材树种之一，也是林木研究的模式树种。杨树的营养生长包括种子萌发及幼苗生长、根茎叶形态及生长发育。从人类应用角度来讲，杨树产量由营养器官构成，且以树干为主，木材的品质受到广泛关注。提高杨树产量、改善木材品质一直是科研的重要课题。

杨树产量的组成已经从生理学的角度进行了研究 (Ceulemans 1990)，其结构和功能单元被在不同组织水平确定，如单个叶、枝条和整个树木。在与生长过程相关的组分中，气孔形态和行为 (Tschaplinski et al. 1994)、叶片形态和叶片生长生理 (Ridge et al. 1986)、叶和整个树的光合作用 (Isebrands et al. 1988) 以及根的发育 (Friend et al. 1991) 都表现出最显著的遗传变异。杨树杂种优势原因是从有利的叶片组合和树冠结构角度来解释的，许多与此相关的数量特征被绘制成 QTL 遗传图谱 (Bradshaw et al. 1995, Wu et al. 1997) 和分子标记 (黄秦军等 2007)，但是控制这些数量特征的基因仍然没有被完全确定和注释。本节旨在总结杨树营养生长发育基因克隆及转化的研究情况，为进一步提高杨树产量和改善木材品质打下基础。

1.1.3.1 从杨树克隆的与营养生长相关的基因

种子萌发，胚根发育，叶片生长，枝条发育，木材形成，幼苗长成大树。所有营养器官都经历了从初始分化到衰老的过程。从基因的角度来研究营养器官的发育，不断发现全新基因，探明基因的表达调控机制，为杨树基因工程育种打下基础。基因工程育种的第一步是目的基因的发现与获得，即目的基因克隆，然后是基因的转化与表达，最后获得理想的转基因植株。基因克隆在基因工程育种中占据首要地位。作为木本植物研究的模式物种，杨树相关基因的克隆工作一直受到研究者的关注，近年来已分离得到了一系列相关基因 (表 1-1)。

表 1-1 从杨树中克隆到的与营养生长相关的基因

基因名称	缩写	基因功能
赤霉素分解代谢酶基因	<i>GA2ox</i>	使植物矮化
扩张蛋白 <i>PtEXP1</i> 基因	<i>PtEXP1</i>	细胞壁松弛因子，具有伸展细胞壁、促进细胞分化的功能
细胞色素 P450 类固醇单加氧酶基因	<i>CYP90</i>	与矮化基因产物、细胞色素 P450 在进化上相关
	<i>PtCesA</i>	纤维合成酶基因，与初生壁和次生壁形成有关
	<i>CSL</i>	<i>CesA</i> 类似基因
钙离子依赖型脱氧核糖核酸酶基因	<i>DNase</i>	该基因可能参与了催化次生木质部分化 (PCD 过程) 中核 DNA 片段化
<i>PtSAD</i>	<i>PtSAD</i>	编码芥子醇脱氢酶 SAD，木质素生物合成关键基因

基因名称	缩写	基因功能
<i>lac1, lac2, lac3, lac90</i> , 和 <i>lac110</i> UDP 葡萄糖脱氢酶基因	<i>lac</i>	漆酶编码基因, 与细胞壁形成有关 细胞壁胶形成过程中的编码基因
咖啡酰-O-甲基转移酶基因	COMT	木质素生物合成途径中的甲基化酶基因
阿魏酸 5-脱氢酶基因	F5H	木质素合成酶基因
咖啡酰 CoA 甲基转移酶基因	CCoAOMT	木质素合成相关基因
香豆酸 CoA 连接酶基因	4CL	木质素合成相关基因
苯丙氨酸解氨酶基因	PAL	木质素生物合成途径中的第一个限速酶, 其表达影响直接影响木质素合成
肉桂酰乙醇脱氢酶基因	CAD	木质素合成相关基因
肉桂酰辅酶还原酶基因	CCR	木质素合成相关基因

1. 根

从杨树种子萌发到长成幼苗这一发育过程, 目前进行的研究工作比较少。张德强等 (2002) 以毛白杨 5082 为母本、截叶毛白杨为父本进行杂交, 所得种子生根的统计结果为, 生根幼苗: 不生根幼苗 = 3: 1。由此认为, 种子胚根发育生根这一性状为质量性状, 并且由单个或几个显性基因控制。没有控制胚根发育基因的进一步报道。

2. 叶及叶绿体

叶生长是杨树营养生长的重要组成部分, 通过叶的生长, 叶绿素合成, 光合作用产生能量满足整个树体生长的需要。在这方面, 苏晓华等 (2001) 对美洲黑杨与青杨杂交 F_2 代群体的 5 个叶片数量性状进行了 RAPD 标记和 QTL 定位, 并连锁作图。张德强等 (2005) 以毛新杨 × 毛白杨的 120 株个体为作图群体, 也对控制叶片表型性状如叶长、叶宽、叶面积和叶柄长以及春季萌芽时间共 5 个性状的 QTL 进行了分析, 结果认为叶片表型和春季萌芽时间这两类性状是由各自相应的基因控制, 但也没有克隆与叶生长性状相关的基因。杨树基因组测序工作已经完成并公布, 将为这方面的研究提供了强大支持。另外, 叶生长是典型的 PCD (programmed cell death) 过程, 据 Wullschlegler 等 (2002) 做的杨树叶片 EST 工作, 在新叶和老叶中各种类型功能基因组对比中, 老叶中与死亡和老化相关的基因占到 11%, 比新叶中的多 7%, 但在杨树叶衰老相关基因克隆及转化方面, 还没有见到报道。

周弈华等 (2001a, 2001b) 利用 PCR 法, 从毛白杨叶绿体基因组中克隆了 1.7 kb 和 1.6 kb 相邻 DNA 片段 (这两个 DNA 片段包含核糖体蛋白 3' *rps12*、*rps7* 基因和 NADH 脱氢酶第二亚基 *ndhB* 基因片段), 并以这两个相邻片段为同源重组片段, 分别将绿色荧光蛋白 (GFP) 基因和苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白 (Bt) 基因及其原核表达框插入其间, 构建了杨树叶绿体定点转化载体 pPZG 和 pPZB。崔彬彬等 (2006) 以毛新杨 × 毛白杨、毛新杨 × 银腺杨为研究对象, 扩增了叶绿体 *trnD-trnT*、*rps12/7-nadB*、*trnT-trnF*、*trnL-trnf3'* 和 *trnL-trnF5'* 基因片段, 认为 F_1 代的叶绿体 DNA 为母性遗传; 尹维波等 (2002) 还报道了毛白杨叶绿体 ATP 酶 β 亚基基因序列。

3. 木材发育相关基因克隆

杨树的木材（次生木质部）是树木维管形成层（简称形成层）分化的产物，由轴向系统和射线系统两大类细胞组成。木射线由径向稍伸长的薄壁细胞组成，但在多数失去功能的木质部中形成次生壁，原生质体死亡成为死细胞。轴向系统由导管、管胞、木纤维和木薄壁细胞四种成分组成，其中，导管分子和管胞统称管状分子（TE）。研究木材发育最重要的是研究次生木质部的分化。次生木质部分化过程是典型的 PCD 过程。

木质部分化方面的基因（主要是管状分子分化基因、维管发育、木质素合成、纤维素合成基因），最初都是利用图位克隆、同源克隆等方法从百日草细胞离体培养系统和拟南芥突变体中获得的，而直接来自于树木的基因主要是利用同源序列基因克隆方法得到的。基因组学研究更加适合木材形成相关基因的分离（卢孟柱 2003）。

国际上如瑞典、法国等获得了杨树不同组织及其不同发育时期的大量 EST（Sterky et al. 1998），并利用 EST 库制备了的 cDNA 芯片分析了形成层到木质部不同区域所涉及的基因表达（Wullschlegler et al. 2002）。随着杨树全基因组测序和基因注释工作的完成，木材形成相关基因的克隆及其表达调控成为热点。

次生壁形成的主要过程包括纤维素的合成和纤维丝在原生细胞壁上的沉积。影响次生壁形成的主要基因有纤维素合成酶 *CesA* 基因家系和 *CesA* 类似基因（*CSL*）家系。

美国密歇根大学从欧洲颤杨（*P. tremuloides*）中得到的 *PtrCesA1* 基因是林木中克隆到的第一个纤维素合酶基因，它在木质部中特异表达，共有 2973 bp，与次生壁的形成有关，在次生壁形成时期该纤维素合酶基因的表达丰度最高（Wu et al. 2000）。随后又报道了欧洲颤杨的 *PtrCesA2*、*PtrCesA3*、*PtrCesA4*、*PtrCesA5*、*PtrCesA6*、*PtrCesA7* 共 6 个基因（Samuga and Joshi 2002, Kalluri and Joshi 2003, Kalluri and Joshi 2004）。其中，*PtrCesA1*、*PtrCesA2*、*PtrCesA3* 的表达时期与表达部位很相似，因此推测这三个基因可能在同一个纤维素合酶复合体中，共同完成杨树的次生壁的合成（Samuga and Joshi 2004）；而 *PtrCesA4*、*PtrCesA5*、*PtrCesA7* 的表达时期合部位相似，推测它们可能与初生壁的形成相关（Kalluri and Joshi 2004）；*PtrCesA6* 与茎的伸长生长有关，在杨树枝条的快速生长期表达丰度高（Liang and Joshi 2004）。另外，在美洲山杨（*P. tremuloides* Michx.）中克隆的 *PtrCesA2* 基因在已发育木质部的次生壁合成中特异表达，但在韧皮部纤维中不表达，表明 *CesA* 单个基因的表达具有细胞特异性（Wu et al. 2000）。Holland 等（2000）对杨树及其他植物的纤维素合酶进行了比较研究，结果表明这些酶本身的某些特异性序列决定其在初生细胞壁中表达，而非单独由启动子决定。李春秀等（2007）以毛白杨形成层为材料克隆了毛白杨纤维素合酶基因（*PtoCesA1*），序列分析表明该基因序列为 3215 bp，与同源率为 97%。除此之外，在杂交杨（*P. tremula* × *P. tremuloides*）中也克隆出来纤维素合酶基因，同时 Soraya 等（2004）还报道了几个类纤维素合酶基因（*cls*）参与纤维素的合成。

次生壁加厚的另一个主要成分是木质素，它的形成受发育、胁迫和病原物侵染诱导。在木质素相关基因克隆方面，已经得到的基因有：从毛白杨等杨树中克隆的 COMT（咖啡酰-O-甲基转移酶）、CCoAOMT（咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶）、4CL（4-香豆酸-CoA-连接酶）、苯丙氨酸解氨酶（PAL）、肉桂酰辅酶还原酶（CCR）、肉桂

酰乙醇脱氢酶 (CAD) 等基因 (魏建华和宋艳茹 2002, 魏建华等 2001a, 魏建华等 2001b, 赵华燕等 2004, 贾彩虹等 2004, 卢善发和宋艳茹 1999)。这些基因的克隆为通过基因工程方法降低木质素含量, 改变木质素组成创造了条件。木质素生物合成途径见图 1-1。

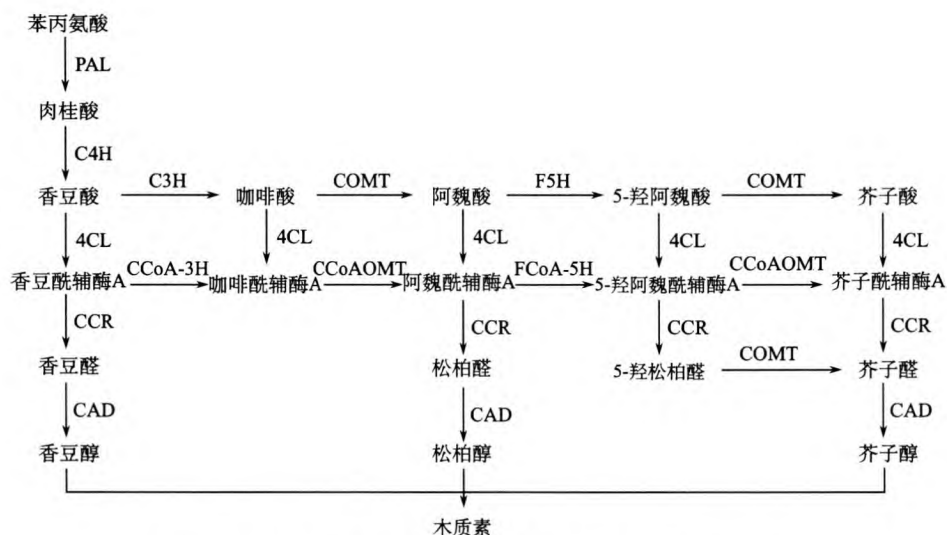


图 1-1 木质素生物合成途径示意图 (卢善发和宋艳茹 1999)

PAL: 苯丙氨酸解氨酶; C4H: 肉桂酸-4-羟化酶; 4CL: 4-肉桂酸 CoA 连接酶; C3H: 香豆酸-3-羟化酶; COMT: 咖啡酸-3-O-甲基转移酶; F5H: 阿魏酸-5-羟化酶; CCoA-3H: 香豆酸 CoA-3 羟化酶; CCoAOMT: 咖啡酸 CoA-3-O-甲基转移酶; FCoA-5H: 阿魏酰辅酶 A-5-羟化酶; CCR: 肉桂酸 CoA 还原酶; CAD: 肉桂酰乙醇脱氢酶。

Li 等 (2001) 从山杨中分离了编码芥子醇脱氢酶 SAD 的基因 (*PtSAD*), 该基因大量存在于富含丁香酚 (syringyl) 木质素的韧皮部纤维细胞中, 是被子植物丁香酚木质素生物合成的关键基因。Ranocha 等 (2002) 从杨树 (*P. trichocarpa*) 木质部中克隆了 5 个不同的漆酶编码基因, 并对其功能进行了研究, 他们发现其中一些基因的产物是正常杨树形成正常细胞壁所必需的。Johansson 等 (2002) 以杨树 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) 形成层细胞壁材料, 构建了 cDNA 文库, 从中分离出了一个 1834 bp 的 cDNA 克隆, 进一步研究发现, 该 cDNA 片段在形成层细胞壁中高丰度表达, 是细胞壁胶形成过程中一种重要的酶 (UDP 葡萄糖脱氢酶) 的编码基因。张春玲等 (2006) 以毛白杨 (*P. stomentosa* Carr.) 为材料, 利用 RT-PCR 法从树干形成层区域中成功克隆出可能与木质部细胞分化相关的基因 *PtEXP1* 的全长 cDNA 片段。

程序性细胞死亡发生在木质化完成之后, 主要是导管细胞的原生质体水解。在杨属中已发现一些与细胞程序性死亡相关的转录因子, 如与拟南芥 OPEN STOMATA1、XYLEM CYSTEINE PEPTIDASE2、VACUOLELESS1 和 VACUOLAR PROCESSING ENZYME 同源的转录因子 (Moreau et al. 2005)。杜鹃 (2005) 利用 DNA-SDS-PAGE 胶在分化中的次生木质部中检测到两种钙离子依赖型的脱氧核糖核酸酶 (DNase), 此 DNase 酶的活性可以为 caspase3 专一抑制剂所抑制, 进一步克隆了 38 kDa DNase 的全

长 cDNA 并将其转入大肠杆菌后获得了其表达产物，其具有消化底物 DNA 的酶活性。RT-PCR 检测和原位杂交显示该基因主要在形成层区域和未成熟木质部处于伸展生长状态的细胞中表达，在时序上该 DNase 基因表达要早于 TUNEL 反应信号。该核酸酶可能参与了催化次生木质部（PCD 过程）中核 DNA 片段化。

4. 高生长等基因克隆

高生长是重要的生物学性状，控制树高一直是研究人员的愿望。在对 627 个独立的激活标记转基因株系进行了筛选之后，Busov 等（2005）鉴定了一株矮化的转基因杂交杨（*P. tremula* × *P. alba*）。矮化基因显性表达的原因是一个极度活跃的基因，这个基因编码植物中主要的赤霉素分解代谢酶（GA2ox）。突变体产生是由于在转录起始点附近插入了强启动子。杨树 GA2ox 基因的过表达导致 mRNA 转录本富集、GAs 光谱定量位移，并且和过量表达了豌豆 GA2ox 基因的转基因杨树有相似显性。王新宇等（2005）从杨树中克隆出细胞色素 P450 类固醇单加氧酶（CYP90）基因，通过系统树发现，CYP90 蛋白与番茄和玉米的矮化基因产物有比较密切的联系。把高生长控制技术，如转基因矮化，应用到林木培育或者园艺上，能够产生明显的经济和环境效益。

1999 年，研究者从美洲黑杨中分离到一段树皮储藏蛋白基因启动子片段（Jiang et al. 1999）。随后，Zhu 和 Coleman（2001）克隆到了该储藏蛋白 *BspA* 基因的全长序列。

盖颖和蒋湘宁（2006）以毛白杨叶片为材料，用 PCR 技术扩增愈伤诱导表达启动子 *winp* 序列并插入克隆载体。该启动子序列中富含植物激素响应和光响应的保守 DNA 序列以及机械损伤响应和病原菌侵入的锌指型转录因子 WRKY 结合序列。

1. 1. 3. 2 杨树营养生长转基因进展

1. 高生长等方面

提高林木的生长速率，改良林木的木材性状是林木育种的重要目标。Tzfira（1999）等采用农杆菌介导法将 *rol* 基因导入欧洲山杨的嫩茎，研究了茎干生长、叶芽萌发和分枝习性。研究表明：转 *rol* 基因植株表现为顶端优势被打破，每个外植体产生多达 4 个腋芽，累积茎干长度较大和生长速率较快，茎干生长指数增加。Nilsson 等（1996）的研究表明，转 *rolA* 或 *rolB* 或 *rolC* 基因的杂种杨树生长和发育速度、生根能力均发生改变。其中，转 *rolC* 基因的杨树不仅表型发生改变（如顶端优势降低、植株矮化和节间缩短），同时植物内源激素含量下降、赤霉素合成发生变化，而细胞分裂素水平却升高。Claudia 等（2001）研究了 3 年生的转 *rolC* 基因欧洲山杨 × 美洲山杨的木材形成及结构特点。该转基因植株具有明显的茎生长减少和芽的萌发提前等特点，芽的萌发和叶片形成后并不立即开始形成木材，而对照却开始形成木材；转基因杨树和对照的木材结构没有明显的区别，转基因植株的矮化可能是细胞数的减少所导致的。转 *rolC* 基因的杨树可以作为研究木材形成机制的一种有用的模式。

Gallardo 将针叶树 GS 基因导入杨树，由于 GS 在转基因植物体内过量表达，引起谷氨酰胺合成大量增加，植物的可溶性总蛋白及叶绿素含量也相应增加。与对照植物相比，转基因幼苗的株高在 2 个月内增加了 76.0%，6 个月增加了 21.3%。Eriksson 等

通过转基因使欧洲山杨×美洲山杨中的 GA 过量表达,提高了生长速率和生物产量。

张冰玉等采用农杆菌介导法,将透明颤菌血红蛋白 [vitreoscilla hemoglobin (VHb)] 基因 *vgb* 导入银腺杨 (*P. alba*×*P. glandulosa*),共获得 52 株整合了 *vgb* 基因的再生植株。在温室生长条件下,转基因无性系的外部形态与对照相比无显著差异。但在株高和地径上,有 3 株转基因无性系较对照植株有明显增加。王建革等还把 *vgb* 转入库安托杨,也获得了转基因植株。

杨树是 C₃ 植物,杨树方面对光合方面的研究一般仅仅限于光合速率、叶绿素含量等生理指标的测定,在育种上一般只是研究不同品种间光合速率、叶绿素含量的比较分析,如罗青红等(2006)在胡杨、灰叶胡杨光合及叶绿素等方面做的工作。在高光效育种方面还没有见到利用 C₄ 光合途径改造杨树的报道。C₄ 光合途径主要涉及 3 种关键酶,即 PEPC(磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶)、磷酸丙酮酸二激酶(PPDK)和依赖于 NAD(P)的苹果酸酶 [NAD(P)-dependent malic enzyme, NAD(P)-ME]。玉米的 PEPC 有 C₄ 型、C₃ 型和根型 3 种类型,高粱的 PEPC 基因家族也有 3 个成员。可以尝试将 PEPC 等基因转入杨树中提高杨树的光合速率。

2. 木材形成方面

杨树具有典型的次生生长期,包括维管形成层启动的一系列活动过程,如微管组织形成、次生壁形成、木质素沉积(木质化)、程序性细胞死亡和心材侵填物的形成等,从而把维管形成层细胞结合进次生韧皮部(树皮)和次生木质部(木材)。木材形成是次生生长的结果。微管组织的形成中,顶端分生组织分裂产生原形成层(pro-cambium),原形成层再分化出维管形成层,维管形成层在完全展开的芽与根、木质部与韧皮部间形成连续的一圈细胞。调节顶芽分生组织的一些重要基因家系也在形成层中表达。例如, KANADI 转录因子和 HD-ZIP III 基因在欧洲山杨 (*P. tremula* L.) 的形成层区域表达 (Schrader et al. 2004),表明形成层与顶芽分生组织在遗传调控上具有重叠性。

Franke 等认为林木中过量表达 *F5H* 是对木质素生物合成进行修饰的有效代谢基因工程策略。Jouanin 等通过转 COMT 基因,6 月龄的转基因欧洲山杨×银白杨的木质素含量下降 17%,木质素的结构得到显著改变,几乎没有紫丁香基型木质素,纤维素含量提高,使木质素更容易被工业降解。

Hu 等通过对美洲山杨转 *Pt4CL1* 基因的研究表明:由于对 *Pt4CL1* 基因进行反义控制,生长 10 个月的转基因植株木质素减少 45%,纤维素增加 15%,叶、根和茎生长加快,木质素和纤维素的沉积为一种补偿性调控模式。至今,已将 *4CL*、*CAD* 和豆科植物的阳离子过氧化酶基因 (*Shpx6a*) 反义导入美洲山杨、欧洲山杨和欧洲山杨×银白杨 (*P. tremula* L.×*P. alba* L.)。4CL 表达被抑制的转基因美洲山杨木质素含量也明显下降,木质素下降最高达 45%,同时纤维素含量增加 15%。Zeliha 等将 *Shpx6a* 转入欧洲山杨,使转基因植株木质素的含量降低 10%~20%。Jouanin 发现由于基因沉默使得再生杨树苗中 35S 启动子作用的 COMT 活性降低为零,木质素含量降低 17%,而 *CAD* 启动子作用下的 COMT 转基因杨树苗的纤维素含量增加,木质素缩合程度也提高,更加不利于纸浆加工。李春秀等(2007)将从毛白杨中克隆到的毛白杨纤维素合成酶基因 (*PtoCesA1*),转移到烟草中。张春玲等(2006)将毛白杨 *PtEXP1* 基因成功

转入银腺杨 (*P. alba* × *P. glandulossa* 84K), 获得转基因植株。

Busov 及其同事利用激活标签 (activation tagging) 法进行了杨树转化产生了大量的转基因个体, 其中, 有 9 株有明显表型变异 (Busov et al. 2005), 其中, 一株对应的突变基因为赤霉素 2-氧化酶类似物。另外, 增强子捕获 (enhancer trap)、基因捕获 (gene trap)、T-DNA 插入和 *Ac/Ds* 转座子等转基因技术也正准备用于鉴定杨树木材形成组织中基因的具体功能 (Wullschlegel et al. 2002, Groover et al. 2004, Busov et al. 2005)。

在植物生长调节剂方面, 五大类调节剂几乎都参与了木质部分化的控制, 但目前对于生长素和细胞分裂素诱导木质部分化的信号转导途径还不清楚。生长素的一个效应因子 MP 可能参与了这一途径, 因为 MP 基因突变体导致了木质部长轴分化的偏离 (Przemeck et al. 1996, Hardtke and Berleth 1998)。山杨转录因子 *PttHB1* (Hertzberg and Olsson 1998) 可能在木质部分化过程中起作用。转 IAA 合成酶基因白杨中发现转基因植物的 IAA 浓度比野生型稍高。然而, 转基因植物的茎的直径比野生型植物小, 且主要是木质部径向宽度的减小造成的 (Tuominen et al. 2000)。这一试验结果说明采用改变激素水平的方法来改变木材材性, 不能获得理想的效果。赤霉素和生长素同时施用能够促进分生组织的活性及木质部纤维细胞的伸长, 因而赤霉素是细胞纵向伸长所必需的。超量表达 GA-20 氧化酶的转基因杂种白杨纵向生长和径向生长都有所增加, 同时木质部纤维的长度也有所增加 (Eriksson et al. 2000)。由于树木转化后其所产生木材材性表型在多年之后才能被观察到, 因此, 在林木材性方面的转基因研究往往会受到时间的限制。

1.1.3.3 木材形成的蛋白质组学研究

基因是遗传信息的携带者, 而生命功能的真正执行者是蛋白质。由于很多蛋白质的功能的发挥需要翻译后调控、修饰、分拣和转运等过程, 基因表达与其编码的蛋白质丰度并非完全相关。因此仅仅从基因的角度来研究是远远不够的, 还必须研究基因的产物——蛋白质, 才能真正解释生命活动的规律。因而, 如果能整合转录组分析和蛋白质学分析的结果和数据, 可以更好地理解木材形成的生物学过程。

在杨树蛋白质组学研究方面, 比利时科学家利用双向电泳技术, 分析了毛果杨 (*P. trichocarpa*) 形成层区域、未成熟木质部区域和成熟木质部区域在春夏秋冬四季的蛋白质表达图谱, 并对 18 个蛋白质点进行了序列分析, 赋予了 10 种蛋白质可能的功能 (Vander et al. 2000)。如今, 国内外获得了大量与木材形成相关基因表达的信息 (Hertzberg et al. 2001), 但由于所用试验材料限制, 获得的基因多数没有明确确定参与了细胞分化发育中的哪些过程。

中国林业科学研究院卢孟柱课题组利用蛋白质组学方法对再生不同时期的样品进行了分析, 一共获得了 244 个差异表达蛋白质, 其中, 199 个差异表达蛋白鉴定出功能信息, 并按照功能对这些蛋白质进行了分类分析。在形成层发生阶段主要是一些与细胞周期、细胞分化相关的调节因子大量表达; 在次生木质部形成阶段, 一共鉴定到了 27 个与次生细胞壁形成相关的蛋白质, 这些功能蛋白质表达的模式是与次生维管系统的再生过程相一致的 (Du Juan et al. 2006)。