

主楚杰,王爱云. 基因工程技术在杨树抗逆境方面的研究进展[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):10-13.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.004

基因工程技术在杨树抗逆境方面的研究进展

主楚杰,王爱云

(中南林业科技大学生命科学与技术学院,湖南长沙 410004)

摘要:阐述了基因工程技术在杨树抗逆遗传改良方面的应用,总结了转基因杨树抗病虫害、抗旱、耐盐以及在环境修复中取得的研究成果,讨论了基因工程技术在杨树抗逆方面存在的问题。杨树因长速快、产量高、基因组小等特点,具有较高的经济价值和生态效益,同时也是林木遗传改良的模式树种。尽管对杨树抗逆遗传改良进行了相关研究,但有关外源基因提高杨树抗逆性的机理和应用仍有待进一步深入研究。挖掘新的抗逆基因、培育具有抗性的杨树新品种仍将是今后的研究重点。

关键词:基因工程;杨树;抗逆

中图分类号:S792.110.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)02-0010-04

杨树是重要的速生丰产工业用材、绿化建设、防护林和生物质能源树种之一,具有较高的经济价值和生态效益。杨树的基因组较小,基因组测序已完成,因此,杨树被作为模式林木树种应用于木材的形成、抗逆性遗传改良等方面的研究^[1]。20 世纪末至 21 世纪初,我国建造了超过 1 000 万 hm² 的速生林基地,杨树占重要部分。随着杨树人工林的大面积推广,杨树的抗逆性明显降低,病虫害的发生和危害逐渐加重,培育杨树抗病新品种迫在眉睫。由于杨树生长周期长、树体高大,采用传统育种方法在短时间内培育抗病新品种较困难。随着分子生物学和基因工程技术的发展,植物抗逆机理研究的深入以及某些抗逆相关基因的克隆和转化,为杨树抗逆遗传改良开辟了一条新途径^[2-3]。

1 转基因杨树抗病虫研究

1.1 抗病研究

1.1.1 抗病毒病 抗病毒基因工程研究在林业上的应用才刚起步,目前,使用的基因主要有洋李痘病毒的外壳蛋白基因和黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因等几种。Cooper、李玮等分别将花叶病毒外壳蛋白基因和抗菌肽 *LCI* 基因导入杨树中,均获得良好抗病效果的转基因植株^[4-5]。

1.1.2 抗细菌病 农杆菌感染杨树后,杨树极易感染冠瘿病。目前,关于杨树抗冠瘿病的研究主要是采用转基因技术将农杆菌致瘤基因、激素 *IAA* 基因、抗菌肽基因(免防御素 *NP-I* 基因)导入杨树,获得抗性提高的转基因植株^[6]。

1.1.3 抗真菌病 植物受到病原物侵染后,会使多种病程相关蛋白迅速表达,参与其抗病防卫反应。在这些病程相关蛋白中,最主要的蛋白之一就是几丁质酶^[7],几乎所有的植物器官中均可以发现几丁质酶^[8]。在正常情况下,几丁质酶水

平很低,但经诱导因子的诱导,表达量可以迅速增加。病原真菌、细菌、病毒的侵染、激发子和一些逆境等均可能诱导植物几丁质酶的表达^[9]。近年来,有关对植物几丁质酶的特性、基因结构、分类、分子进化、生物学作用及转几丁质酶基因的研究,已成为植物抗真菌病害的研究热点之一^[10-11]。1991 年, Broglie 等首次对转几丁质酶基因在植物的抗真菌病方面进行了研究,他们将菜豆几丁质酶基因转入烟草和油菜,并得到表达,有效降低了植株的死苗率,控制了病情的发展^[12]。但转基因烟草植株对病原真菌的抗性没有明显提高。进一步研究证明,几丁质酶同工酶类型及其在植物体内定位的不同,将影响基因的表达和植株的抗病性。

Nicolescu 等分别将矮牵牛黄酮合成酶基因、草酸氧化酶基因、几丁质酶基因导入杨树,均获得了具有一定抗性的转基因植株^[13-15]。王琼等以受落叶松-杨栅锈菌单孢子堆菌系 Sb052 侵染的川杨叶片为材料,采用 RACE 技术克隆川杨几丁质酶基因 DNA 全长,通过荧光定量表达分析,推测 *PsChi I* 基因参与了寄主川杨抵抗真菌的防御机制^[16]。

1.2 抗虫研究

食叶害虫和蛀干害虫是危害杨树的 2 类主要害虫,包括杨尺蠖、舞毒蛾、杨扇舟蛾、光肩星天牛、桑天牛、云斑天牛等。目前,国内外用于杨树抗虫基因工程研究的外源基因主要有苏云金杆菌杀虫结晶蛋白基因、抗菌肽基因、昆虫特异性神经毒素基因、几丁质酶基因、多酚氧化酶、脂氧化酶、胆固醇氧化酶,以及 *Vip3A* 等,但对于杨树转 *Bt* 基因的研究最为深入,发展也最为迅速^[17-19]。

1.2.1 苏云金杆菌杀虫结晶蛋白基因 从苏云金杆菌的芽孢中分离出来的 *Bt* 杀虫晶体蛋白,现今已发现 60 多种,一般用 *Cry1*、*Cry2*、*Cry3*、*Cry4* 和 *Crt* 来表示,划分的主要依据是由其杀虫谱范围和基因序列的同源性来决定^[20]。*Bt* 毒蛋白是一个单基因产物,1981 年 Schnepf 等首次将苏云金杆菌 *Kurstaki HD-1* 的 *Bt* 毒蛋白基因克隆^[21]。该基因的 mRNA 在植物中表达量较低,不稳定,同时也不会改变原氨基酸序列,从而使这些毒蛋白的基因表达量提高了上百倍^[22-23]。鉴于 *Bt* 毒蛋白具有高度专一性、生物降解性,且对人畜无害的安全

收稿日期:2014-10-16

基金项目:湖南省自然科学基金(编号:13JJ5024)。

作者简介:主楚杰(1990—),男,湖南长沙人,硕士研究生,主要从事植物遗传改良研究。E-mail:zhuchujie@163.com。

通信作者:王爱云,教授,主要从事植物遗传改良研究。E-mail:wangaiyun12@aliyun.com。

性,被作为转基因植物抗虫基因工程中理想的杀虫目的基因^[24]。目前,已有许多转 *Bt* 基因植物问世,有的已进入大田试验和商品生产阶段^[25]。国内外关于转 *Bt* 基因在杨树方面的研究,主要集中在欧洲黑杨、美洲黑杨、欧美杨和杨树杂种 NC5339 (*Populusdehoides alba* × *P. grandidentata*)、NL-80106 (*P. × P. simonii*)、741 杨 [*P. alba* × (*P. davidiana* + *P. simonii*) × *P. tomentosa*] 等品种上,这些转 *Bt* 基因杨树均具有一定的抗虫效果^[26]。最早见于报道的是用 *Bt CryIA* 基因转化欧洲黑杨,通过 Southern 杂交证明外源基因的成功转入^[27]。此后,抗虫转基因研究就拉开了帷幕。广大研究工作者围绕 *Bt* 基因^[28-33],以及 *Bt* 嵌合基因^[34-35]、*Bt* 双元表达载体^[36]、*Bt* 双价抗虫基因^[37-38] 在杨树中的抗虫性进行了广泛研究,并取得了明显的抗虫效果。

1.2.2 蛋白酶抑制剂 蛋白酶抑制剂是对蛋白水解酶有抑制活性的一种水分子蛋白质,普遍存在于植物、动物和微生物中^[39]。迄今为止,自然界共发现四大类蛋白抑制剂:丝氨酸蛋白酶抑制剂、巯基蛋白酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂和酸性蛋白酶抑制剂。目前,用于转化杨树的主要有丝氨酸蛋白酶抑制剂基因和半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因^[40]。McNabb 等首次将马铃薯蛋白酶抑制剂基因导入 NC5339 无性系,转化获得抗虫杨树^[41]。Klopfenstein 等分别利用马铃薯的蛋白酶抑制剂与 NPT,以及大豆丝氨酸蛋白酶抑制剂基因、水稻巯基蛋白酶抑制剂基因和 *Bt Cry(A)* 构成的嵌合基因导入杨树,获得转基因植株^[42-43]。郝贵霞等将广谱抗虫基因豇豆胰蛋白酶抑制剂基因成功地导入了毛白杨,经 PCR 和 PCR-Southern 检测证实基因已整合进杨树基因组中^[44]。

1.2.3 昆虫毒性基因 昆虫特异性神经毒素是从胡蜂、蝎子、蜘蛛的毒液中分离到的一些小肽(30~40 个氨基酸),是一类作用于昆虫神经系统并具有毒杀作用的蛋白类神经毒素。这类毒素只作用于昆虫而对哺乳动物和其他动物无害或者毒性很小,是一种十分理想的抗虫基因源^[45]。伍宁丰等将抗虫的蝎神经毒素基因导入黑杨无性系 N-80106 中,通过根癌农杆菌将构建在双子叶高效表达载体上的已优化了密码子的 *AaIT* 基因转化杨树杂种 NL-80106 (*Populusdeltoides* × *P. sinonii*),得到了转基因植株^[46],通过 PCR、PCR-Southern 杂交和 ELISA 分析,证实了转基因植株中 *AaIT* 基因的表达,转基因植株对 1 龄舞毒蛾幼虫的效果最好,具有明显抗虫性。

1.2.4 其他抗虫基因 近年来,陆续开展了植物凝集素基因、脂氧化酶、多酚氧化酶、胆固醇氧化酶及 Vip3A 等编码基因在杨树抗虫方面的应用研究,取得了一定的进展^[47-48]。

2 转基因杨树耐旱研究

我国国土面积有 50% 以上属于干旱或半干旱地区,这些地区降雨量集中,年降水量介于 250~500 mm 之间,土壤水分缺失严重。据统计,半干旱区人工造林成活率、保存率大约为 30%,而干旱区一般为 4%,最高也不会超过 20%,严重阻碍了当地林业生产发展和生态环境的改善^[49]。

根据基因的作用方式,可将参与杨树干旱胁迫相关基因分为 2 类:一类是直接参与植物抗旱能力提高的功能基因,包括水通道蛋白、渗透蛋白、Lea 蛋白等;一类是起调节作用的蛋白基因,主要包括 Bzip、MYC、MYB 和 DREB 等传递信号和

调控基因表达的转录因子基因。MAP 激酶、CDP 激酶、受体蛋白激酶、核糖体蛋白激酶和转录调控蛋白激酶等,以及感应和转导胁迫信号的蛋白激酶基因以及磷酸酯酶、磷酸酶 C 等蛋白酶基因^[50]。目前,关于杨树抗旱研究主要通过克隆松树、桉柳、桦树、栎树等极端抗逆植物的抗旱基因,导入杨树中,获得抗旱性植株。

侯德英等采用根癌农杆菌介导法,将甜菜碱合成酶基因转化,获得转基因植株^[51]。通过农杆菌介导法,王沛雅等分别将油菜素内酯生物合成酶基因 *DAS5*、桉柳 *TabZIP* 基因、锌指蛋白转录基因、pBI121-chiAPX 重组质粒等基因导入杨树中,转基因株系的抗旱性得到提高^[52-55]。经过不断研究,转 *sosl* 基因山哈杨^[56]、转 *Lea* 基因小黑杨^[57]、转 *AtDREB1A* 基因银新杨^[58]、转 *AREB1C* 基因南林 895 杨^[59]、转 *Trx* 基因欧美杨^[60]、转基因 *SacB* 根腺杂种杨^[61-62] 等的抗旱性均有不同程度的提高。崔旭东等采用基因枪法,5 个抗旱相关基因——转录因子基因 *JERF36* 基因、*ZxZF* 基因、*AREB* 基因和功能基因 *SacB* 基因、*GST* 基因的共转化,获得了包含 1~4 个外源基因的转基因抗旱性杨树植株^[63]。

3 转基因杨树耐盐研究

随着全球人口不断增长,工农业污染日益加重,淡水资源急剧减少,土壤盐碱化带来的危害越来越明显,严重制约着我国农林业生产的可持续发展,影响生态环境平衡,阻碍经济发展。因此,提高植物的耐盐性、加强盐碱地的生物治理和综合开发具有重要实际意义。盐胁迫对杨树的生长影响较大,主要影响杨树的生长、光合作用、生物膜、物质代谢和激素的产生等。杨树的耐盐机理主要与渗透调节机制、离子区域化机制与杨树耐盐相关基因(糖醇合成相关基因、甜菜碱合成相关基因以及脱水应答元件 DREB 类基因)的调节相关^[64-66]。

围绕杨树耐盐机理,在抗盐基因工程中主要有以下转化基因进行了应用研究:1-磷酸甘露醇脱氢酶、甜菜碱醛脱氢酶、 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因、反义磷脂酶 D、6-磷酸山梨醇脱氢酶等。其中 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白和液泡 H^+ 焦磷酸化酶是当前植物耐盐研究的焦点,这 2 种蛋白在植物的抗盐过程中起重要的作用。美国已经获得了转 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的杨树,耐盐效果较好^[67]。我国在耐盐转基因杨树的研究取得了良好进展。1-磷酸甘露醇脱氢酶基因、外源基因 *BetA*、山菠菜 *AhDERB1* 基因、双价耐盐基因(甘露醇和山梨醇基因)、番茄的 ERF 类转录因子 *JERFs* 基因、*mt1D* 基因^[68-74]、辽宁碱蓬的外源基因、*NTHK1* 的转基因、*Mn-SOD* 基因、蒙古柳 cDNA 农杆菌表达文库、重组质粒 pBI121-cAPX、拟南芥 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 (Na^+/H^+ antiporter) 基因 (*AtNHX1*)、正义 *PLD α* 基因^[75-81] 等外源基因成功导入杨树中,并取得了不同程度的耐盐转基因植株。

4 转基因杨树在环境修复方面的研究

随着工农业的快速发展,土壤污染日益严重,重金属已成为土壤污染中最严重的污染物之一。采用具有重金属超富集能力的植物对该类土壤进行综合治理是最安全、最经济有效的环境治理方法。但重金属超富集植物生长缓慢、生物量低,而生长速度快、生物量高的林木材料对重金属富集量低。通

过基因工程技术在杨树遗传改良上的应用,开展了关于利用杨树修复重金属污染土壤的一系列研究,并取得了一定进展。

1998 年,Rugh 等将抗重金属相关基因 *merA* 转入到杨树中,研究表明,转基因杨树对汞的富集能力是未转基因杨树的 10 倍,而对重金属汞的耐受性也提高了 3~4 倍^[82]。转基因植株的基因产物也能有选择地影响某些土壤微生物的生长与繁殖,但与施肥、灌水和施药等农作措施相比,影响明显较小^[83]。

5 存在问题及展望

经过广大研究者的不断努力和探索,利用基因工程技术提高杨树的抗逆性取得了一些成果,但仍存在不足。杨树在分子水平上的定向改造技术远远落后于农作物,杨树的内源优良抗性基因还未被识别和有效利用。能够有效利用于杨树的外源基因多来自于农作物,多数是只能控制单一性状的功能基因,这些基因的转入并不能完全满足杨树多基因调控的要求,现阶段外源基因导入杨树的转化效率低、试验重复性差。如何将外源基因定位整合入杨树基因组中且能在高代转基因材料中稳定表达,挖掘杨树本身优良抗逆基因,实现多基因共转化等方面,还有待进一步深入研究。

利用基因工程技术,对林木进行定向遗传改良提高抗逆性,为培育林木新品种提供了一条新途径。杨树具有生长速度快、生物量高、基因组小等特点,在林木分子遗传育种中有着不可替代的作用。我国的荒地、盐碱地、沙土地、重金属污染地面积大,培育多抗性的速生、丰产、优质杨树品种,为这些地区提供适应的杨树品种,不仅可以改善生态环境,同时也可以促进地方经济的持续发展。

参考文献:

- [1] Jansson S, Douglas C J. *Populus*: a model system for plant biology [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2007, 58: 435–458.
- [2] Bhalerao R. Out of the woods: forest biotechnology enters the genomics era [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(2): 206–213.
- [3] Tuskan G A, Difazio S, Jansson S, et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1596–1604.
- [4] 许农, 黄敏仁, 陈道明. 杨树基因工程研究进展 [J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 1993, 17(4): 78–83.
- [5] 李玮. 利用转基因技术培育抗病番茄新品系 [D]. 济南: 山东师范大学, 2010.
- [6] 赵世民. 瓜尔胶多糖分子结构的教学方法探讨 [J]. *韶关学院学报*, 2013(8): 95–99.
- [7] Duplessis S, Major I, Martin F, et al. Poplar and pathogen interactions: insights from populus Genome-Wide analyses of resistance and defense gene families and gene expression profiling [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2009, 28(5): 309–334.
- [8] Hamid R, Khan M A, Ahmad M, et al. Chitinases: an update [EB/OL]. (2013-01-28) [2014-12-23]. <http://www.jpbonline.org/text.asp>.
- [9] Davis J M, Wu Haiguo, Cooke J E, et al. Pathogen challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15(4): 380–387.
- [10] Mathivanan N, Kabilan V, Murugesan K. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis* [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1998, 44(7): 646–651.
- [11] Sharma N, Sharma K P, Gaur R K, et al. Role of chitinases in plant defense [J]. *Asian Journal of Biochemistry*, 2011, 6(1): 29–37.
- [12] Broglie K, Chet I, Holliday M, et al. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *rhizoctonia-solani* [J]. *Science*, 1991, 254(535): 1194–1197.
- [13] Nicolescu C, Sandre C, Jouanin L, et al. Genetic engineering on phenolic metabolism in poplar in relation with resistance against pathogens [J]. *Acta Botanica Gallica*, 1996, 143: 539–546.
- [14] Liang H, Maynard C A, Allen R D, et al. Increased septoria musiva resistance in transgenic hybrid poplar leaves expressing a wheat oxalate oxidase gene [J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 45(6): 619–629.
- [15] 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.
- [16] 王琼, 曹支敏. 杨树 *PsChiI* 基因全长的克隆与表达分析 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2014, 42(7): 83–88, 94.
- [17] 刘琴, 徐健, 赵松, 等. 苏云金杆菌杀虫蛋白的多样性 [J]. *华东昆虫学报*, 2006, 15(4): 263–267.
- [18] 夏启中, 张明菊. 抗植物虫害基因及其应用 [J]. *鄂州大学学报*, 2005, 12(3): 56–60.
- [19] 刘海涛, 张川红, 马森, 等. 中国树木转基因研究进展及其生物安全管理现状 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25(5): 80–89.
- [20] 罗志军. *Bt* 毒蛋白基因工程研究进展 [J]. *重庆师专学报*, 2000, 19(2): 89–91.
- [21] 林良斌, 官春云. *Bt* 毒蛋白基因与植物抗虫基因工程 [J]. *生物工程进展*, 1997, 17(2): 50–54.
- [22] Pelark F J. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1991, 88: 3324–3328.
- [23] 郭三堆, 洪朝阳, 徐琼芳, 等. 苏云金芽孢杆菌 aizawai 7-29δ-内毒素基因改造后的杀虫活性研究 [J]. *中国农业科学*, 1993, 26(5): 77–81, 104.
- [24] 令利军, 万平, 张正英. 几种常见植物抗虫基因作用机理研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2004(1): 27–30.
- [25] 卢孟柱, 胡建军. 我国转基因杨树的研究及应用现状 [J]. *林业科技开发*, 2006, 20(6): 1–4.
- [26] 郭同斌, 嵇保中, 诸葛强, 等. 转 *Bt* 基因杨树 (NL-80106) 对杨小舟蛾抗虫性研究 [J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2004, 28(6): 5–9.
- [27] 伍宇丰, 范云六. 含苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因的杨树工程植株的建立 [J]. *科学通报*, 1991(9): 705–708.
- [28] 田颖川, 李太元, 莽克强, 等. 抗虫转基因欧洲黑杨的培育 [J]. *生物工程学报*, 1993, 9(4): 291–297, 395.
- [29] 郑均宝, 张玉满, 杨文芝, 等. 741 杨离体叶片再生及抗虫基因转化 [J]. *河北农业大学学报*, 1995, 18(3): 20–25.
- [30] 郑均宝, 梁海永, 高宝嘉, 等. 转双抗虫基因 741 毛白杨的选择及抗虫性 [J]. *林业科学*, 2000, 36(2): 13–19, 129.
- [31] 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.
- [32] 白亚蒙. 大田试验转基因杨树无性系的抗虫性研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2004.
- [33] 高萍, 贝纳新, 李浩戈. 抗虫转基因杨树的培育及其抗虫性初步研究 [J]. *林业科技*, 2008, 33(5): 25–27.
- [34] 陈颖, 韩一凡, 李铃, 等. 苏云金杆菌杀虫晶体蛋白基因转

- 化美洲黑杨的研究[J]. 林业科学, 1995, 3(2): 97-103.
- [35] 王学聘, 韩一凡, 戴进韵, 等. 抗虫转基因欧美杨的培育[J]. 林业科学, 1997, 33(1): 70-75.
- [36] 李明亮, 张辉, 胡建军, 等. 转 *Bt* 基因和蛋白酶抑制剂基因杨树抗虫性的研究[J]. 林业科学, 2000, 36(2): 93-97.
- [37] 姜静, 常玉广, 董京祥, 等. 小黑杨转双价抗虫基因的研究[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(6): 669-672.
- [38] 熊忠平, 孟繁君, 王志英, 等. 转基因小黑杨对舞毒蛾的抗性测定[J]. 林业勘查设计, 2006(2): 78-80.
- [39] 文方德, 傅家瑞. 植物种子的蛋白酶抑制剂及其生理功能[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(1): 1-9.
- [40] Richardson M. The proteinase inhibitor of plants and micro-organisms[J]. Phytochemistry, 1977, 16: 159.
- [41] McNabb H S. A field trial of transgenic hybrid poplar trees: establishment and growth through the second season[J]. Agriculture Research Institute, 1991, 9: 155-159.
- [42] Klopfenstein N B, Hall R B, Hart E R, et al. Transgenic *Populus* hybrid expresses a wound-inducible potato proteinase inhibitor II-CAT gene fusion[J]. Canadian Journal of Forest Research, 1991, 21: 1321-1328.
- [43] 韩岚岚, 赵奎军, 张杰. 昆虫类钙粘蛋白与 *Bt* Cry1A 蛋白之间的相互作用[J]. 昆虫知识, 2009(2): 203-209.
- [44] 郝贵霞, 朱桢, 朱之梯. 豇豆蛋白酶抑制剂基因转化毛白杨的研究[J]. 植物学报, 1999, 41(12): 1276-1282.
- [45] 饶红宇, 黄敏仁. 杨树基因工程研究的现状及展望[J]. 林业科技开发, 1999, 56(4): 3-6.
- [46] 伍宇丰, 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): 13-17.
- [47] 郭同斌, 嵇保中, 蒋继宏, 等. 转基因杨树对杨小舟蛾体内三种保护酶活力的影响[J]. 昆虫学报, 2006, 49(3): 381-386.
- [48] 李亚红. 转基因杨树作为新造纸资源植物的研究[C]//第二届全国环境化学学术报告会论文集, 2004: 797-799.
- [49] 黄荣辉, 刘永, 王林, 等. 2009 年秋至 2010 年春我国西南地区严重干旱的成因分析[J]. 大气科学, 2012, 36(3): 443-457.
- [50] Shinozaki K, Yamaguchi Shinozaki K. Molecular responses to drought and cold stress[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1996, 7(2): 161-167.
- [51] 侯德英. 转 *CMO* 和 *BADH* 基因烟草抗旱性及山杨转基因研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2003.
- [52] 王沛雅, 杨晖, 杨涛, 等. 农杆菌介导的河北杨遗传转化体系的建立[J]. 生物技术通报, 2012, 3(3): 141-147.
- [53] 尹承苗, 王功帅, 李园园, 等. 连作苹果园土壤真菌的 T-RFLP 分析[J]. 生态学报, 2014, 34(4): 837-846.
- [54] 张伟溪, 刘淳洋, 丁昌俊, 等. 欧美杨锌指蛋白转录因子基因 (*ZxZF*) 的遗传转化及抗旱性初步分析[J]. 林业科学, 2014, 50(3): 31-37.
- [55] 郎洪岩. 转 *chlAPX* 基因杨树对逆境胁迫的响应[D]. 济南: 山东师范大学, 2014.
- [56] 张文元. *sos1* 和 *sos2* 基因在杨树上的遗传转化及其功能的初步验证[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2006.
- [57] 白爽. 转 *Lea* 基因小黑杨花粉植株抗旱、耐盐性分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [58] 秦红霞, 刘敬梅, 宋玉霞. 转 *AtDREB1A* 的银新杨 APX 和 CAT 活性检测[J]. 江西农业学报, 2007, 19(10): 89-91.
- [59] 杨春霞, 李火根, 程强, 等. 南林 895 杨抗旱耐盐基因 *DREB1C* 的转化[J]. 林业科学, 2009, 45(2): 17-21.
- [60] 郑琼. 欧美杨组培体系的建立和 *Trx* 基因的遗传转化[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [61] 李义良, 苏晓华, 张冰玉, 等. 外源 *SacB* 基因在银腺杂种杨基因组中的表达及抗旱性分析[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(2): 1-6.
- [62] 张冰玉, 苏晓华, 黄秦军, 等. 转果聚糖蔗糖转移酶基因银腺杨的获得[J]. 林业科学, 2005, 41(3): 48-53.
- [63] 崔旭东, 苏晓华, 张冰玉, 等. 欧美杨渤丰 1 号高效组培再生体系建立[J]. 林业科学研究, 2012, 25(2): 157-162.
- [64] 陈翠霞, 于元杰, 王洪刚, 等. 棉花耐盐变异体的 RAPD 分析及抗盐生理研究[J]. 作物学报, 1999, 35(5): 643-646.
- [65] 刘俊君, 王海云, 黄绍兴, 等. 转基因烟草的甘露醇合成和耐盐性[J]. 生物工程学报, 1996, 12(2): 206-210.
- [66] 王少峡, 王振英, 彭永康. DREB 转录因子及其在植物抗逆中的作用[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 7-13.
- [67] 刘岩, 张薇, 计东风, 等. NaCl 胁迫对桑树种子萌发和 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因表达的影响[J]. 蚕业科学, 2013(5): 851-857.
- [68] 刘风华, 孙仲序, 崔德才, 等. 细菌 *mtl-D* 基因的克隆及在转基因八里庄杨中的表达[J]. 遗传学报, 2000, 27(5): 428-433.
- [69] 王玉成, 杨传平, 刘桂丰, 等. *DREB* 基因的抗逆生理与分子机制研究[C]//东北三省及内蒙古地区遗传学研究进展学术研讨会论文集汇编. 北京: 中国遗传学会, 2009.
- [70] 杜宁霞, 李云, 于海武, 等. 毛白杨叶片再生系统的建立[J]. 林学研究, 2002, 4(2): 48-51.
- [71] 樊军锋, 韩一凡, 李玲, 等. 84K 杨树耐盐基因转化研究[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(4): 33-37.
- [72] 孙仲序, 杨红花, 崔德才, 等. 转基因杨树的抗盐性分析[J]. 生物工程学报, 2002, 18(4): 481-485.
- [73] 李义良, 苏晓华, 张冰玉, 等. 转 *JERFs* 基因银中杨的获得及耐盐性鉴定[C]//第九届中国林业青年学术年会论文摘要集, 北京: 中国林学会, 2010.
- [74] 尹建道, 孙仲序, 王玉祥, 等. 转抗盐碱基因八里庄杨大田释放试验[J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(3): 23-25.
- [75] 张学彬, 夏秀英, 毕晓颖, 等. 欧美杨 107 耐盐转基因植株的试验[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(5): 712-715.
- [76] 宋建, 周祥明, 郝志愚, 等. 转 *NTHK1* 基因对杨树各器官中 Na^+ 、 K^+ 分布的影响[J]. 天津农业科学, 2012, 18(5): 1-6.
- [77] Wang Y C, Qu G Z, Li H Y, et al. Enhanced salt tolerance of transgenic poplar plants expressing a manganese superoxide dismutase from *Tamarix androssowii*[J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(2): 1119-1124.
- [78] 韩雪. 山新杨高效遗传转化体系的建立及蒙古柳 FOX 山新杨抗性植株的获得[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013.
- [79] 李江艳. 过量表达 *cAPX* 基因提高毛白杨抗逆性研究[D]. 济南: 山东师范大学学报, 2014.
- [80] 姜超强, 郑青松, 刘兆普, 等. 转 *AtNHX1* 基因杨树 Tr 品系的耐盐性研究[J]. 植物生态学报, 2010, 34(5): 563-570.
- [81] 张廷婷. 转正、反义磷脂酶 *Dα* 基因和 *Bt* 毒蛋白基因毛白杨的获得及其抗性分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008.
- [82] Rugh C L, Senecoff J F, Meagher R B, et al. Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16: 925-928.
- [83] 杨天章, 张晓科, 刘宏伟, 等. 矮秆小麦 XN0004 的矮秆基因 *Rht21* 的染色体臂定位[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 1993(4): 13-17.