

转 *PuP5CS* 基因烟草对低温胁迫的生理响应

徐 博¹, 任 伟², 徐安凯², 王志锋², 孙启忠¹

(1. 中国农业科学院 草原研究所, 内蒙古 呼和浩特 010010; 2. 吉林省农业科学院, 吉林 公主岭 136100)

摘要:以朝鲜碱茅 *PuP5CS* 基因(HQ637435)为目的基因, 构建了 *PuP5CS* 基因的正义表达载体和反义表达载体, 通过农杆菌介导的叶盘法转化烟草, 研究了 *PuP5CS* 基因对烟草耐寒性的影响。结果显示, 低温胁迫下, 正义转基因烟草体内可溶性糖、脯氨酸、叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量均显著高于野生型烟草, 丙二醛含量增幅显著低于野生型烟草, 提高了转基因烟草的抗寒性, 而反义转基因烟草体内各项生理指标变化不明显。

关键词: *P5CS*; 转基因; 烟草; 抗寒性

中图分类号: S572 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)03-0186-05

Physiological Responses to Chilling Stress in Transplastomic Tobacco with *PuP5CS* Gene

XU Bo¹, REN Wei², XU An-kai², WANG Zhi-feng², SUN Qi-zhong¹

(1. Grassland Research Institute Chinese Academy of Agricultural Sciences, Huhhot 010010, China;

2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: To identify the responses to Chilling Stress in transplastomic tobacco with *PuP5CS* gene, sense and antisense plant expression vector of *PuP5CS* gene were constructed and introduced into tobacco via *Agrobacterium tumefaciens*. For the pBI121-*PuP5CS* + transgenic plants, the levels of soluble sugar, proline, chlorophyll a and chlorophyll b were significantly higher than wild-type tobacco, the level of malondialdehyde (MDA) was significantly lower than wild-type under the chilling stress, improved its cold resistance. But for the pBI121-*PuP5CS*-transgenic plants, the levels of them were not significant.

Key words: *P5CS*; Transgenic plants; Tobacco; Chilling stress

温度作为一个重要的环境因子, 在植物生长发育过程中, 对其生长、生殖和发育都起着关键的作用。低温胁迫是植物栽培中经常遇到的一种生物胁迫, 涉及到粮食作物、饲料植物及其他经济植物。脯氨酸作为植物体内的渗透调节剂、氮源、酶及细胞结构保护剂, 在逆境胁迫条件下, 可以保护质膜的完整性, 稳定膜结构, 降低渗透胁迫所造成的氧伤害^[1-2]。Δ²-吡咯啉-5-羧酸合成酶(*P5CS*)作为脯氨酸积累中谷氨酸途径的关键酶和限速酶^[3], 在调控植物体内脯氨酸合成水平, 控制脯氨酸积累等方面均起着重要作用^[4]。

许多研究表明, 在逆境条件下, *P5CS* 基因的诱导表达同时伴随着脯氨酸合成的增加^[5]。将豇豆的 *P5CS* 基因转入水稻, 发现胁迫后 2 个转基因株

系的脯氨酸含量比对照分别提高了 82% 和 68%^[6]。对全能花(*Pancreaticum maritimum* L.) 的研究发现, 随着 *P5CS* 表达水平的提高, 可溶性糖和其他渗透调节物质的积累也随之增加, 使细胞能够保持原生质体与环境之间的渗透平衡, 维持结构的完整性, 提高了植物对低温的适应性^[7]。

但是有关朝鲜碱茅 *P5CS* 基因抗逆性的研究还鲜有报道。朝鲜碱茅具有较强的耐盐、抗旱和抗寒性, 是盐碱地改良的先锋植物^[8]。本试验以之前在朝鲜碱茅中分离克隆到的 *PuP5CS* 基因(Genebank 登录号: HQ637435)为目的基因, 构建了 *PuP5CS* 基因的正义表达载体和反义表达载体, 通过叶盘法转化烟草, 研究了在低温胁迫下, 烟草体内可溶性糖、脯氨酸、丙二醛(MDA)和叶绿素的变化规律, 揭示

收稿日期: 2012-02-20

基金项目: 国家牧草产业技术体系

作者简介: 徐 博(1983-), 男, 吉林公主岭人, 博士, 主要从事牧草分子生物学研究。

通讯作者: 孙启忠(1960-), 男, 内蒙古五原人, 研究员, 博士生导师, 主要从事退化草地生态及牧草生产技术研究。

了 *PuP5CS* 基因提高烟草抗寒能力的生理机制, 为培育耐寒烟草新品种奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

大花烟草 (*Nicotiana glauca* Link et Otto cv. *Grandiflora*) 由吉林省农业科学院生物中心提供。烟草种子以 70% 酒精灭菌 2 min, 灭菌滤纸吸干后于 0.1% 升汞 (HgCl₂) 中灭菌 10 min, 无菌水洗脱 3~5 次, 置于灭菌滤纸上吸干水分, 接种于 1/2 MS 培养基上, 置于培养箱中 25℃ 培养。

1.2 菌株与试剂

大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 LBA4404、克隆载体 pMD18-T 及 pBI121 载体为本实验室保存。PMD18-T 载体、Ex-Taq 酶产品由 TakaRa 公司提供, 反转录酶、琼脂糖凝胶回收试剂盒由 MBI 公司提供。

1.3 载体的构建

根据已经克隆到的 *PuP5CS* 基因序列分别设计带有酶切位点的扩增引物 (表 1), 以 pMD18-T-*PuP5CS* 为模板进行扩增, 回收 PCR 产物并再次与 pMD18-T 载体连接, 构建中间载体 pMD18-T-*PuP5CS* + 和 pMD18-T-*PuP5CS* -。用 *Xba* I 和 *Sac* I 限制性内切酶双酶切中间载体 pMD18-T-*PuP5CS* +、pMD18-T-*PuP5CS* - 和表达载体 pBI121, 回收目的片段, 连接、转化。最终获得正义植物表达载体 (pBI121-*PuP5CS* +) 和反义植物表达载体 (pBI121-*PuP5CS* -)。采用冻融法获得相应的农杆菌转化菌株。

表 1 引物序列的设计

Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence
P5CS-5 +	TCTAGAATGGCCACCGCGGACC <i>Xba</i> I
P5CS-3 +	GAGCTCTCATTGCAAAGGAAGGTTCTTATG <i>Sac</i> I
P5CS-5 -	GAGCTCATGGCCACCGCGGACC <i>Sac</i> I
P5CS-3 -	TCTAGATCATTGCAAAGGAAGGTTCTTATG <i>Xba</i> I

1.4 烟草的转化及阳性植株的鉴定

采用农杆菌 (LBA4404) 介导的叶盘法转化烟

草^[9] 将侵染过的叶片置于 MS 培养基共培养 2 d, 然后将其转移到分化培养基 (MS + 0.1 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA + 500 mg/L Carb), 待分化芽长至 1~2 cm 时, 切下并转入生根培养基 (MS + 100 mg/L Kan + 300 mg/L Carb) 中诱导生根, 待其长出大量不定根后, 炼苗、移栽, 获得 T₀ 转基因烟草植株。

采用 SDS 法提取转基因烟草植株的基因组 DNA^[10], 以其为模板, PCR 检测 *P5CS* 基因目的片段, 为 2 156 bp。同时, 用筛选标记基因 NPTII 的特异引物进行双重 PCR 鉴定, 目的片段约 800 bp。提取转基因烟草植株的总 RNA, 反转录合成 cDNA。根据 *PuP5CS* 基因的全长序列设计 5' 端引物 (5'-GCAACGACTAAGATTCTCTGTTCTT-3') 和 3' 端引物 (5'-CTCATTGCAAAGGAAGGTTCTTATG-3'), 以 *Actin* 基因为内参 (GeneBank 登录号: FJ545641), 进行 RT-PCR 检测。

1.5 转基因烟草的抗寒性分析

选取经过鉴定的烟草植株, 通过无性生殖的方法对其进行扩繁, 并播种于温室, 生长 5 周后, 挑选健康植株用于试验。将野生型烟草和转基因烟草分别置于 5、15、25℃ 光照培养箱, 16 h 光照/8 h 黑暗, 处理 5 d 后, 参照徐春波等^[11] 的方法, 进行相关生理生化分析。可溶性糖含量的测定采用蒽酮硫酸水合热法, 叶绿素含量的测定采用分光光度法, 丙二醛 (MDA) 含量的测定采用硫代巴比妥酸 (TBA) 比色法, 脯氨酸 (Pro) 含量的测定采用磺基水杨酸法, 所有试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体的构建

以表达载体 pBI121 为原始载体, 将正向片段 (*PuP5CS* +) 和反向片段 (*PuP5CS* -) 替换掉原始载体上的 GUS 片段 (图 1), 最终获得正义植物表达载体: pBI121-*PuP5CS* + 和反义植物表达载体: pBI121-*PuP5CS* -。用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sac* I 来双酶切这 2 个表达载体, 如图 2 所示, 酶切得到的目的片段与碱茅 *PuP5CS* 基因的大小一致, 表明这 2 个载体构建无误, 可以进行后续试验。

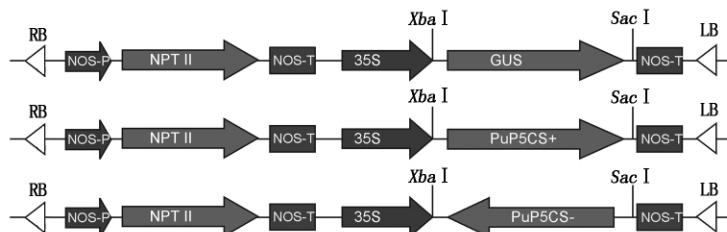
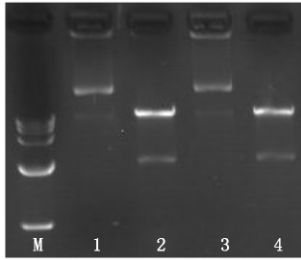


图 1 表达载体的构建
Fig. 1 Construction of expression vectors

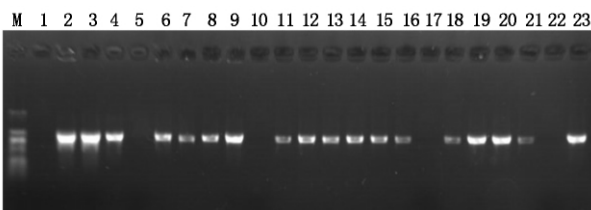


M. Marker; 1. 质粒 pBI121-*PuP5CS* +; 2. *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切质粒 pBI121-*PuP5CS* +; 3. 质粒 pBI121-*PuP5CS* -; 4. *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切质粒 pBI121-*PuP5CS* -

M. Marker; 1. pBI121-*PuP5CS* + vector; 2. Products of double-digestion by *Xba* I and *Sac* I for pBI121-*PuP5CS* + vector; 3. pBI121-*PuP5CS*-vector; 4. Products of double-digestion by *Xba* I and *Sac* I for pBI121-*PuP5CS*-vector

图2 载体酶切图谱

Fig. 2 Identification of pBI121-*PuP5CS* + and pBI121-*PuP5CS* - with *Xba* I and *Sac* I

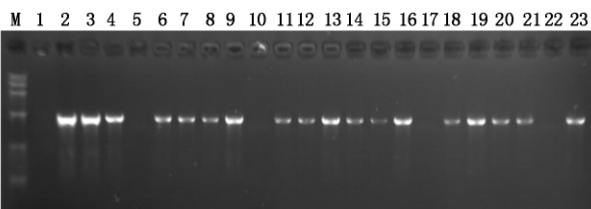


M. DNA Marker DL2000 plus; 1. 野生型; 2. P5CS + 正对照; 3. P5CS - 正对照; 4 ~ 13. pBI121-*PuP5CS* + 再生植株 PCR 检测; 14 ~ 23. pBI121-*PuP5CS* - 再生植株 PCR 检测。

M. DNA Marker DL2000 plus; 1. Wild type; 2. P5CS + positive control; 3. P5CS - positive control; 4 ~ 13. pBI121-*PuP5CS* + transgenic tobacco; 14 ~ 23. pBI121-*PuP5CS* - transgenic tobacco.

图3 转基因烟草 *NPTII* 基因的 PCR 鉴定

Fig. 3 *NPTII* gene PCR testing of tobacco regeneration plants



M. DNA Marker DL15000 plus; 1. 野生型; 2. P5CS + 正对照; 3. P5CS - 正对照; 4 ~ 13. pBI121-*PuP5CS* + 再生植株 PCR 检测; 14 ~ 23. pBI121-*PuP5CS* - 再生植株 PCR 检测。

M. DNA Marker DL15000 plus; 1. Wild type; 2. P5CS + positive control; 3. P5CS - positive control; 4 ~ 13. pBI121-*PuP5CS* + transgenic tobacco; 14 ~ 23. pBI121-*PuP5CS* - transgenic tobacco.

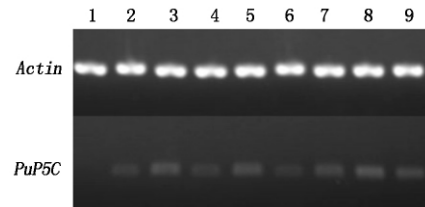
图4 转基因烟草 *PuP5CS* 基因的 PCR 鉴定

Fig. 4 *PuP5CS* gene PCR testing of tobacco regeneration plants

2.2 转基因烟草的分子检测

随机选择经卡那霉素抗性筛选的烟草分化苗 20 棵,以野生型烟草作为阴性对照,进行 *NPTII* 基因和 *PuP5CS* 基因的双重 PCR 检测。结果表明,共有 16 棵烟草扩增出 *NPTII* 基因的特异片段,约 800 bp,其中转 pBI121-*PuP5CS* + 基因烟草 8 棵,转 pBI121-*PuP5CS* - 基因烟草 8 棵,而野生型烟草没有扩增出目的片段(图 3)。*PuP5CS* 基因的 PCR 检测结果与 *NPTII* 基因的鉴定结果相一致(图 4)。初

步说明,在 DNA 水平上,目的基因已转入 To 烟草植株。此外,反转录 RT-PCR 检测表明,在经过鉴定的正义转 *PuP5CS* 基因烟草中, *PuP5CS* 基因可以正常转录生成 RNA,说明目的基因可以在 RNA 水平上正常表达(图 5)。



1. 野生型; 2 ~ 9. pBI121-*PuP5CS* + 再生植株 RT-PCR 检测。

1. Wild type; 2 ~ 9. pBI121-*PuP5CS* + transgenic tobacco.

图5 正义转基因烟草的 RT-PCR 鉴定

Fig. 5 RT-PCR testing of tobacco regeneration plants

2.3 转基因烟草的抗寒性鉴定

2.3.1 可溶性糖含量变化 可溶性糖是一类重要渗透调节物质,包括蔗糖、葡萄糖、果糖、半乳糖等,在逆境诱导条件下,可溶性糖的含量往往会大大增加^[12]。正如在本试验中(图 6),25℃ 常温下,正义和反义转基因烟草与野生型相比,可溶性糖含量(以鲜质量计)差异不显著,说明在常温情况下,外源基因的导入对于烟草的糖代谢没有产生明显的影响。而在低温处理下,野生型与正义转基因烟草的可溶性糖含量均有所增加,其中,正义转基因烟草植株的增加幅度显著高于野生型烟草。在 15℃ 胁迫时,野生型烟草的可溶性糖含量与非胁迫条件下的可溶性糖含量差异不显著,而正义转基因烟草植株的可溶性糖含量是非胁迫条件下的 1.4 倍。在 5℃ 胁迫下,野生型烟草的可溶性糖含量是非胁迫条件下的 1.3 倍,正义转基因烟草的增幅最大,达到了 1.9 倍,说明 *PuP5CS* 基因的表达参与了低温胁迫下转基因烟草植株体内糖类物质的合成代谢。而反义转基因烟草的可溶性糖含量在低温胁迫过程中变化不明显。

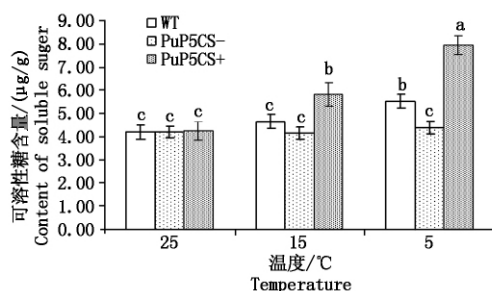


图6 可溶性糖含量变化

Fig. 6 Change of soluble sugar content

2.3.2 叶绿素含量变化 叶绿素含量的高低在一定程度上反映了植物体内光合作用的强弱,通常低温胁迫会影响植物光合作用的反应进程^[13]。如图

7 和图 8 所示 25℃ 常温下, 转基因烟草与野生型烟草体内叶绿素 a(以鲜质量计) 和叶绿素 b(以鲜质量计) 的含量差异不显著。随着温度的降低, 野生型烟草、反义转基因烟草和正义转基因烟草体内叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量总体上呈现出先升高后降低的变化趋势, 说明在 5℃ 低温胁迫条件下, 烟草体内的光合作用进程已经受到严重影响。但是, 野生型烟草和反义转基因烟草在整个低温胁迫过程中, 叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量差异不显著, 而正义转基因烟草在 15℃ 和 5℃ 低温胁迫下的叶绿素 a 和叶绿素 b 含量要显著高于 25℃ 常温处理, 说明低温胁迫下 *PuP5CS* 基因的表达可能参与了烟草植株体内的光合作用反应, 进而提高了正义转基因烟草的抗寒能力。

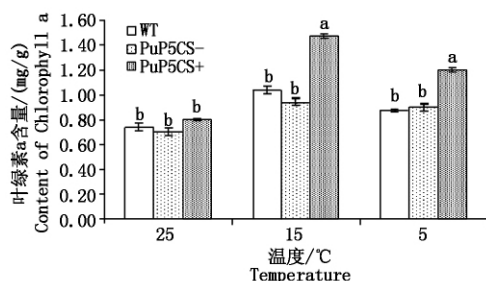


图 7 叶绿素 a 含量变化

Fig. 7 Change of Chlorophyll a content

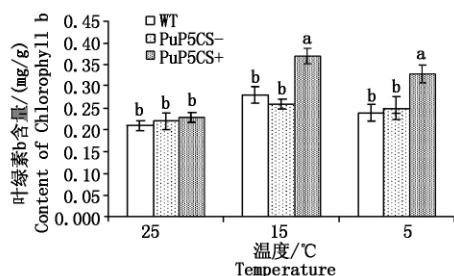


图 8 叶绿素 b 含量变化

Fig. 8 Change of Chlorophyll b content

2.3.3 丙二醛含量变化 植物在逆境条件下, 往往会发生膜质过氧化作用, 最终形成分解产物丙二醛 (MDA), 其产生数量的多少能够间接性地反映植物组织的抗氧化能力的强弱, 是植物抗性胜利研究中的一个常用指标^[14]。如图 9 所示, 25℃ 常温下, 野生型与转基因烟草体内 MDA 的含量(以鲜质量计) 差异不显著。随着温度的降低, 在 15℃ 和 5℃ 低温胁迫下, 野生型与转基因烟草体内 MDA 的含量均显著增加, 但是正义转基因烟草的增加幅度要小于反义转基因烟草和野生型烟草植株。在 5℃ 低温胁迫下, 正义转基因烟草体内 MDA 的含量是非胁迫条件下的 1.3 倍, 而反义转基因烟草和野生型烟草体内 MDA 的含量是非胁迫条件下的 1.5 倍。MDA 是细胞膜脂过氧化作用的产物之一, 它的含量可以

在某种程度上反映植物遭受逆境伤害的程度, 受伤的程度越大, 含量越高, 由此可见, 正义转基因烟草的抗寒性相对较强。

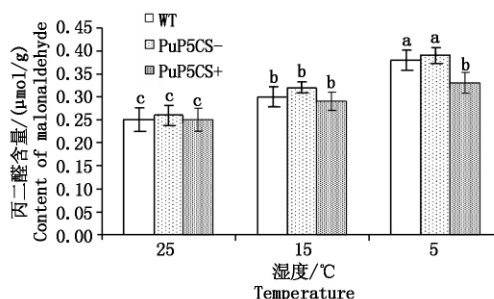


图 9 丙二醛含量变化

Fig. 9 Change of malonaldehyde content

2.3.4 游离脯氨酸含量变化 脯氨酸是植物体内一种重要的渗透调节物质, 许多逆境条件都可以诱导体内脯氨酸含量的增加^[15]。不同温度处理下, 烟草体内游离脯氨酸的含量(以鲜质量计) 如图 10 所示, 在常温 25℃ 时, 野生型与转基因烟草体内脯氨酸的含量差异不显著, 而在 15℃ 和 5℃ 的低温胁迫下, 野生型与转基因烟草植株的脯氨酸含量显著增加, 并且正义转基因烟草植株的增幅要远远大于野生型烟草和反义转基因烟草。正义转基因烟草在 15℃ 和 5℃ 低温胁迫下, 体内脯氨酸的含量是非胁迫条件下的 2.0 倍和 2.5 倍, 而野生型烟草仅为 1.3 倍和 1.5 倍。可见, 在低温胁迫下, 外源 *P5CS* 基因的表达显著提高了烟草体内游离脯氨酸的含量, 增强了转基因烟草的抗寒性。

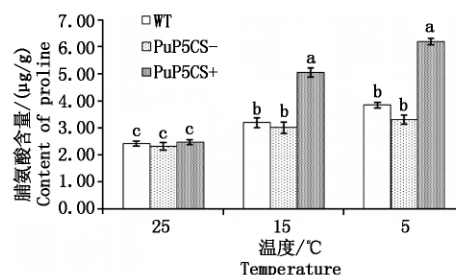


图 10 脯氨酸含量变化

Fig. 10 Change of proline content

3 讨论

许多研究都表明, 在高温、低温、干旱、盐碱等逆境胁迫条件下, 脯氨酸在植物细胞内起重要的作用。一是作为渗透调节物质, 用来保持原生质与环境的渗透平衡, 它可与胞内一些化合物形成聚合物, 类似亲水胶体, 以防止水分散失。二是保持膜结构的完整性, 因为脯氨酸与蛋白质相互作用能增加蛋白质的可溶性和减少可溶性蛋白的沉淀, 增强蛋白质的水合作用^[16]。因此, 一些学者对脯氨酸的合成途径做了详细研究, 结果发现, *P5CS* 是脯氨酸合成的限

速酶,在逆境条件下,该基因的诱导表达往往伴随着脯氨酸合成的增加^[17]。

本研究将碱茅的脯氨酸基因 *PuP5CS* ,通过叶盘法转化模式植物烟草,对转基因烟草在低温胁迫下的生理响应做了初步研究,结果表明,*PuP5CS* 基因的表达显著提高了正义转基因烟草体内可溶性糖和脯氨酸的含量,丙二醛的增幅要明显小于野生型烟草,从增加渗透调节物质和保护膜系统 2 个方面提高了烟草的抗寒能力。此外,*PuP5CS* 基因的表达也参与了烟草体内的光合作用反应,影响了烟草体内叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量,并呈现出先增高后降低的变化趋势,说明在 5℃ 低温胁迫下烟草体内的光合作用已经受到了损坏。而反义转基因烟草在整个低温胁迫过程中的生理变化不大,进一步表明 *PuP5CS* 基因不仅影响了烟草体内脯氨酸的合成过程,而且还参与了体内可溶性糖、丙二醛、叶绿素 a 和叶绿素 b 的代谢调控,从增加渗透调节物质,缓解膜质氧化反应,增强光合作用等几个方面在整体上提高了烟草的抗寒性。而 *PuP5CS* 基因的表达如何参与体内可溶性糖、丙二醛、叶绿素 a 和叶绿素 b 的代谢调控,是否还伴随着其他的信号交叉反应,这些信号途径中的一些关键作用因子是什么,还有待于借助 RNA 干扰等技术做进一步的研究。此外,目前对脯氨酸的研究,主要集中在合成领域,而植物体内脯氨酸的累积涉及到脯氨酸的合成、分解和运输各个环节,因此,必须加强脯氨酸分解和运输的研究,才能更好地了解逆境条件下植物积累脯氨酸的内在规律。

本试验通过研究转 *PuP5CS* 基因烟草对低温胁迫的生理响应,初步表明,通过基因工程技术培育抗逆转基因植物新品种是一条可行途径,有待于结合传统育种技术进行大田试验的进一步研究,为治理盐碱地、改善生态环境以及转基因作物的中试与产业化提供理论基础^[18]。

参考文献:

- [1] Zhao F Y, Guo S L, Wang Z L *et al.* Recent advances in study on transgenic plants for salt tolerance[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 2003 29(3): 71–78.
- [2] Mansour M. Physiological attributes associated with early season against NaCl stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry* 1998 39(10): 1039–1044.
- [3] Kavi Kishor P B, Sangam S, Amrutha R N *et al.* Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance[J]. *Current Science* 2005 88: 424–438.
- [4] Delauney A J, Verma D P S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants[J]. *The Plant Journal* 1993 4(2): 215–223.
- [5] 曹丽, 孙振元, 义鸣放, 等. 多年生黑麦草 P5CS 基因的 cDNA 克隆、表达及亚细胞定位[J]. *园艺学报*, 2010 37(9): 1477–1484.
- [6] Hu C A, Delauney A, Verma D S. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants[J]. *Proc Natl Acad Sci* 1992 89: 9354–9358.
- [7] Khedr A H, Abbas M A, Wahid A A *et al.* Abogadallah GM. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Panicum maritimum* L. to salt stress[J]. *Journal of Experiment Botany* 2003 54: 2553–2562.
- [8] 任伟, 王志锋, 徐安凯. 碱茅耐盐碱基因克隆研究进展[J]. *草业学报* 2010 19(5): 260–266.
- [9] 鲁燕, 徐兆师, 张瑞越, 等. W6 基因的过表达提高转基因烟草的耐盐性[J]. *作物学报* 2008 34(6): 984–990.
- [10] 杨成民, 王宏芝, 孙振元, 等. 利用基因枪共转化法获得转 *bar* 与 *P5CS* 基因黑麦草[J]. *草地学报* 2005 13(1): 34–38.
- [11] 徐春波, 米福贵, 王勇. 转基因冰草植株耐盐性研究[J]. *草地学报* 2006 14(1): 20–23.
- [12] Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z *et al.* Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress[J]. *Plant Physiology* 2000 122: 1129–1136.
- [13] Armengaud P, Thierry L, Buhot N *et al.* Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features[J]. *Physiol Plant* 2004 120: 442–450.
- [14] Aida H S, Radhia G B, Amira B. Over expression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants[J]. *Plant Science* 2005 169(4): 74–752.
- [15] Chen J B, Wang S M, Jing R L *et al.* Cloning the *PvP5CS* gene from common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its expression patterns under abiotic stresses[J]. *Journal of Plant Physiology* 2009 166(1): 12–19.
- [16] 张春宝, 赵洪银, 李启云, 等. 野生大豆 Δ^1 -吡咯琳-5-羧酸合成酶(P5CS)基因的克隆与序列分析[J]. *大豆科学* 2008 27(6): 915–920.
- [17] Zhu B. Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice[J]. *Plant Science* 1998 139: 40–48.
- [18] 韩素英, 张守攻, 汪泉, 等. 小叶杨 Δ^1 -吡咯琳-5-羧酸合成酶(P5CS)基因克隆及在杂种落叶松中的转化[J]. *生物技术通报* 2006(3): 92–99.