

文章编号: 1000-5692(2003)02-0209-06

林木生物技术研究与应用进展

曾燕如, 方伟

(浙江林学院 生命科学学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 林木生物技术随着生命科学的发展取得了很大的进展。在基础研究方面, 目前已用多种分子标记构建了多个树种的遗传图谱, 为数量性状位点的识别打下了基础; 在基因工程方面, 林木生物技术已在抗性育种及品种改良中发挥着作用; 在细胞工程方面, 体细胞胚胎发生、人工种子技术、原生质体培养、光自养微繁不仅已取得了研究成果, 而且部分已用于规模化生产。虽然相对于农作物, 林木生物技术研究显得较为薄弱, 但随着国家投入的增加, 学科的相互渗透与交叉, 林木生物技术必定会得到长足的发展, 进一步深化林业研究。
参 39

关键词: 林木生物技术; 基础研究; 基因工程; 细胞工程

中图分类号: S718.46 **文献标识码:** A

生物技术作为解决全球性经济问题的关键技术, 已广泛应用于医药卫生、农林牧渔、环境、轻工、食品、化工和能源等领域, 对人类社会生活将产生深远的影响。林木生物技术作为生物技术的组成部分, 虽然起步较晚, 但已在林木遗传改良等方面发挥了巨大的作用。目前, 林木生物技术研究主要集中在基础研究、基因工程及细胞工程等领域。

1 林木生物技术的基础研究

遗传图谱构建是对基因组进行系统研究的基础, 也是在分子遗传基础上进行遗传改良的依据。林木遗传图谱的构建始于火炬松 *Pinus taeda* 的同工酶基因标记。随机扩增多态 NDA (RAPD) 和限制性片段长度多态性 (RFLP) 等分子标记的出现与应用, 使构建全部基因组的遗传图谱成为可能。同时, 随着生物技术的日益发展, 诸如单核苷酸多态 (SNP) 等标记的发现与应用, 使得图谱构建的精度及实用性越来越强。目前, 已有 6 属 11 种的针叶树、5 属 17 种 (含杂种) 的阔叶树用包括 RFLP、同功酶、微卫星 (SSR)、RAPD、扩增片段长度多态 (AFLP)、序列标签位点 (STS)、简单重复间隔序列 (ISSR)、表达序列标签多态 (ESTP) 及其他分子标记构建了遗传图谱, 并在数量性状位点定位、基因定位与分离和早期选择等方面对遗传图谱加以利用。南京林业大学林木遗传与基因工程国家林业局重点开放实验室利用 RAPD, AFLP 及 ISSR 标记构建了美洲黑杨 *Populus deltoids* 和欧美杨 *P. euramericana* 2 张连锁图谱, 分别覆盖了 3 801 cM 及 3 452 cM, 几乎完全覆盖了杨树基因组。澳大利亚^[1] 利用肯宁安氏南美杉 *Araucaria cunninghamii* 的全同胞家系进行了遗传作图, 并进行 QTL 的识别, 同时利用半同胞子代相关分析来识别平均效果良好的 QTL。澳大利亚^[2] 利用 RAPD, RFLP 和 AFLP 及等位酶等标记

收稿日期: 2002-07-19; 修回日期: 2002-12-25

基金项目: 浙江省科学技术厅重大项目(021102537)

作者简介: 曾燕如(1961—), 女, 浙江杭州人, 副教授, 从事林木遗传育种研究。

对桉树、松树及金合欢属的 1 个种 *Acacia mangium* 进行了连锁图谱的构建, 并已利用 RFLP, SSR, EST (Expressed sequence tag, 表达序列标签) 构建的蓝桉 *Eucalyptus globulus* 遗传连锁图进行了木材密度、纤维素及纸浆产量性状的 QTL 分析^[3]; 利用 QTL 作图对松树种间 (*Pinus elliotti* 与 *P. caribaea*) 杂种茎干材积性状的杂种优势进行了遗传分析^[4]。分子标记辅助育种也是遗传图谱的重要应用领域。Gianfranceschi 等将与苹果 *Malus pumila* 抗疮痂基因紧密连锁的 2 个 RAPD 标记转化为 SCAR 标记, 并直接应用于育种, 大大加快了抗苹果疮痂病性状的育种进程。Bouspuet 等则利用白云杉 *Picea alba* 的遗传图谱进行苗木的早期选择研究。此外, 利用遗传图谱进行目的基因的定位与分离也已展开。如 Wilox 等根据火炬松性的遗传图谱将抗梭锈病基因定位在第 9 条染色体上, 与分子标记 J7-485a 相距 2.0 cM。

植物不育性遗传工程研究是生物技术基础研究的一个热点。不育性在减少遗传污染, 促进营养生长, 缩短育种周期方面具有重要的意义。为此, 研究人员从开花机制的分子基础研究入手, 克隆和转移不育基因。目前, 在林木转基因研究中考虑利用不育性防止基因污染问题。日本^[5]对自交不亲和的李 *Prunus simonii* 进行了研究, 发现在自交不亲和的李花柱中存在 S-RNase 的基因编码序列, 这个序列与具多个等位基因的控制配子自交不亲和的单个 S 位点有关。美国^[6]正着手研究开花起始基因, 并考虑从花组织特异表达的细胞毒素基因入手, 产生组织特异性切除或组织破坏的效果; 或从抑制开花基因的方面入手, 降低产生可育配子的可能性^[7]。

2 林木基因工程与遗传转化

林木基因工程的研究主要集中在抗性育种及品质改良等方面。近十几年来, 已有多种树木先后进行了抗病虫、抗除草剂、抗盐、抗旱和抗寒等领域的基因工程研究, 并且在杨树 *Populus*、核桃 *Juglans*、柳树 *Salix*、松树 *Pinus* 等树种中获得了转基因植株。杨属植物是农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 的天然寄主, 因此, 农杆菌介导的杨树转化系统的建立就相对容易。目前, 用于杨树及桉树的遗传转化系统已经建立, 松树转化系统的建立亦已出现了突破。用电穿孔进行直接的基因导入已在杨树上获得了成功, 并已获得了转基因植株, 但只适用于某些基因型^[8]。在提高欧洲山场 *Populus tremula* 杂种无性系抗冠瘿瘤的研究方面, 研究人员利用了反义 DNA 技术。日本^[7]就含有反义 DNA 的质粒构建及高效的转化系统进行了研究, 构建了 0.7 kb, 35 S 启动子控制下的反义调节 *iaaM* 基因 Hind III 片段 41 的双向载体质粒。

美国^[7]将编码 EPSP (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate) 合成酶的突变体细菌 *aroA* 基因转入杨树杂种无性系 NC5339, 以提高杨树对除草剂草甘膦的耐受性。*Bacillus thuringiensis* (Bt) 是目前应用最广的生物杀虫剂之一, 带有编码 Bt δ 内毒素基因的转基因植物已在包括杨树在内的许多植物中获得。南京林业大学林木遗传与基因工程实验室^[9]将经修饰的 Bt CryIA 基因及豇豆胰蛋白酶抑制因子 C_pPI 基因, 用农杆菌 LBA 4404 共感染的方式转入了杨树杂种无性系 NL-80106, 获得了转基因植株。美国^[7]将来源于西红柿 *Lycopersicon esculentum* 及马铃薯 *Solanum tuberosum* 的丝氨酸蛋白酶抑制因子 II (PIN2) 基因转入杨树杂种无性系 Ogy (*Populus* × *euramericana*) 及 Harsen (*Populus* × *P. grandidentata*) 中, 将来自水稻 *Oryza sativa* 的半胱氨酸蛋白酶抑制因子 OCI 基因转入杨树杂种 *Populus tremula* × *P. tremuloides* 无性系 NIRA353-38, 以提高它们对节肢动物及病原性害虫的抗性。江香梅^[10]以具有抗细菌、真菌、病毒、恶性肿瘤能力、抗性谱最为广泛且不易被产生抗性的兔防御素基因 NP-1 和从盐生植物山菠菜 *Atriplex hortensis* 中克隆的酶活性极强的甜菜碱醛脱氢酶基因 AhBADH 为外源目的基因, 成功地构建了抗病、抗盐双价基因的植物表达载体 pBin35S BADH-NP1, 首次将生物抗逆性基因和非生物抗逆性基因构建在同一个植物表达载体上, 并以 NL-80106 杨 *Populus deltoides* × *P. simonii* 为转化受体, 进行了以根癌农杆菌菌株 LBA4404 介导的遗传转化研究, 获得了一批 km^r 芽。

在抗旱基因工程方面, 主要通过增加渗透性代谢产物的合成能力及增强植物对活性氧自由基的排除能力, 来增强植物的抗旱性^[11]。而与抗旱有关的基因有包含甘露醇、脯氨酸、甘氨酸甜菜碱、海藻糖、果聚糖、肌醇甲酯等渗透保护物质生物合成的关键酶相关基因、胚胎后期发生丰富基因 (Lea)

或 *Lea* 相关基因、编码转录因子的调节基因、解毒酶和氧化胁迫相关的酶基因等^[12]。郭卫东等^[13] 则构建了抗旱基因 *HDCS1* 的植物表达载体 *pBHC*。

在抗寒基因工程方面, 目前已在鱼类抗冻基因途径、脂肪酸去饱和途径、超氧化物歧化酶 (SOD) 基因途径、糖类基因途径的研究上取得了成果^[14]。但由于植物的抗寒性状是由多基因控制的, 靠转单个基因来提高抗寒性的程度相当有限。目前已分离鉴定的冷诱导基因源自拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的有 20 个, 源自黑麦 *Secale cereale* 的有 2 个, 源自欧洲油菜 *Brassica napus* 的有 6 个, 源自大麦 *Hordeum vulgare* 的有 12 个, 源自菠菜 *Spinacia oleracea* 的有 3 个, 源自小麦 *Triticum aestivum* 的有 6 个, 源自苜蓿 *Medicago sativa* sub spp. *falcata* 的有 8 个, 源自马铃薯的有 3 个^[15]。这些基因有时在干旱胁迫和盐胁迫的条件下, 或 ABA 的诱导下也可表达。

在木质素研究方面, 比利时^[7] 通过反义 COMT (bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid-O-methyltransferase) 策略, 使转基因颤杨 *Populus tremuloides* 中的木质素生物合成得以修饰; 通过反义 CAD (cinnamyl alcohol dehydrogenase) 策略, 使转基因杂种杨树 (*Populus tremula* × *P. alba*) 中的木质素生物合成得以修饰。美国已在火炬松中发现了一个突变的 CAD 等位基因, 该基因在纯合子的情况下可以改变木材的颜色及木质素的组成。法国、英国、美国和比利时的科学家^[16] 联合对杨树木质素的生物合成进行研究, 发现牛皮纸浆 (kraft pulping) 的加工过程中, 从 CAD 下调的转基因杨树木材中提取木质素比较容易, 而 COMT 下调的转基因杨树木材不太适合牛皮纸浆的加工。日本^[17] 研究发现, 杨树木质素形成过程中有过氧化物酶的基因参与, 而编码过氧化物酶的基因是 *prxA3a*。与对照相比, 转基因杨树中总的过氧化物酶活性有所下降, 且木质素含量下降了 3% ~ 26%。日本^[18] 已成功地将编码 Pal 盒结合蛋白的 *Ntlim 1* 导入木本植物赤桉 *Eucalyptus camaldulensis*, 使转基因桉树的木质素含量有所下降。

3 林木细胞工程

细胞工程即人们根据科学的设计改变细胞的遗传基础, 通过无菌操作大量培养细胞、组织乃至整个个体的技术。在林木体细胞胚胎发生、植株再生、人工种子技术、原生质体培养、细胞杂交和体细胞突变体的筛选与利用等方面已取得了令人瞩目的进展。

细胞工程中植物离体培养的材料有胚胎、器官、愈伤组织、细胞、原生质体和人工种子等。目前应用成功的经济林木达 50 余种, 如柑橘 *Citrus reticulata*、柿 *Diospyres kaki*、苹果 *Malus pumila*、桃 *Prunus persica*、猕猴桃 *Actinidia chinensis*、梨 *Pyrus pyrifolia*、枸杞 *Matrimony vine*、葡萄 *Vitis vinifera*、枇杷 *Eriobotrya japonica*、香椿 *Toona sinensis*、油茶 *Camellia oleifera*、酸枣 *Zizyphus spinosus*、桃叶橙 *Citrus sinensis* 和柠檬 *Citrus limon* 等^[19]。

体细胞胚是植物细胞全能性的一种表达方式, 其胚状体为两极结构, 再生容易, 繁殖效率较高, 后代的稳定性好, 可作为人工种子及转基因的材料。目前, 体胚发生已作为裸子植物体外快繁的途径之一^[20]。研究发现, 植物的基因型、外植体、植物激素、 C_2H_4 、多胺、碳源、氮源、天然附加物、渗透压、活性炭和光照等均对体胚发生产生影响; 干燥和低温等逆境处理, 有利于体细胞胚的发生, 且具体细胞胚发生能力的愈伤组织中, DNA 甲基化的水平较低^[21]; 体细胞发生过程中, 过氧化物酶的活性与同工酶的种类有所增加, 而蛋白质种类及含量的增加和核酸的合成, 为体细胞胚的分化与发育奠定了分子基础^[22]。在木本植物中, 马尾松 *Pinus massoniana*、云南松 *Pinus yunnanensis*、红豆杉 *Taxus chinensis*、杨树、橡胶 *Hevea brasiliensis* 等 30 种以上的植物获得了体胚, 其中大多数是裸子植物^[23], 而挪威云杉 *Picea abies*、日本扁柏 *Chamaecyparis obtusa*、日本花柏 *Chamaecyparis pisifera* 及华山松 *Pinus armandi* cv. *Amamina*^[24]、日本赤松 *P. densiflora*、黑松 *P. thunbergii*^[25]、日本落叶松 *Larix kaempferi*^[26]、欧洲落叶松 *L. decidua*、欧日杂种落叶松 *L. × eurolepis*、美洲落叶松 *L. laricina*、西方落叶松 *L. occidenta*^[27]、核桃^[28]、枣 *Zizyphus*^[29]、杂种鹅掌楸 *Liriodendron chinense* × *L. tulipifera*、尾叶桉 *Eucalyptus urophylla*、火炬松、花旗松 *Pseudotsuga menziesii*、辐射松 *Pinus radiata*^[30] 等树种, 通过体细胞胚发生获得再生植株。日前, 日本正就体细胞胚生产的自动化进行研究^[31]。加拿大的 CellFor 有限公司自 1995 年

开始,就利用体细胞胚发生技术进行商业化的苗木生产,已形成了年产云杉 *Picea asperata*、火炬松、辐射松和花旗松等苗木 100 万株的规模^[32]。

在人工种子的研究中,自美国普度大学首次制成胡萝卜 *Daucus carota* 的人工种子以来,利用体胚制成的人工种子,用于大田或温室,已在白云杉 *Picea glauca*、黑云杉 *Picea mariana*^[29]、直杆桉 *E. maidenii*^[33]、桑树 *Morus alba* 等^[34] 木本植物中获得了成功。人工种子是将植物离体培养中产生的体细胞胚或能发育成完整植株的分生组织(芽、愈伤组织、胚状体等)包埋在含有营养物质和具有保护功能的外壳内,在适宜条件下能够发芽出苗的颗粒体。它具有固定杂种优势,缩短育种周期,降低栽培成本,运输方便,便于机械化操作和生产不受外界环境条件影响等优点,可用于自然条件下结实难的植物繁殖,人为地控制植物的生长以及抗性和无毒苗的保存等。制作高质量的体细胞胚是人工种子制作的前提。目前,对人工种子研究集中在体细胞胚、人工胚乳、人工外膜、包埋、贮藏和发芽等问题上,所涉及的物种达 40 几种之多^[30]。我国已将人工种子的研究列入了 863 高新技术发展计划。

原生质体可用于细胞生理现象、细胞核与细胞质相互关系、病毒侵染与复制机理的研究,可用于体细胞杂交,外源 DNA 与细胞器的导入,原生质体转化和突变体的筛选等。目前,在银白杨 *Populus alba* × 大齿杨 *P. grandidentata*、北美鹅掌楸 *L. tulipifera*、欧洲黑场 *P. nigra* × 毛果杨 *P. trichocarpa*、欧洲山场、桉树 *E. robusta*、加勒比松 *Pinus caribaea*、欧洲落叶松、桑树、小叶杨 *P. simonii* 上,利用原生质体培养,已获得了再生植株^[35]。在枸杞中,利用原生质体培养已就抗根腐病和抗盐性状的突变体进行了筛选^[36]。

随着苗木工厂化生产的展开,光自养微繁(photoautotrophic micropropagation)的研究范围也不断扩大。光自养微繁指培养基中不添加诸如糖和维生素等外源有机化合物的微型繁殖,它是随着离体环境控制技术的发展而发展起来的。光自养微繁已在果树(倒捻子)、桉树、泡桐 *Paulownia tomentosa* 金合欢属 *Acacia* 和杜鹃花属 *Rhododendron*^[37] 植物中展开,并已获得了完整的微繁植株^[38]。

4 问题与展望

林木生物技术已在研究与应用领域取得了长足的进展,但也存在不少问题。林木有别于农作物,基础研究相对薄弱,已成为制约林木研究进一步深化的瓶颈。因此,加强林木的基础研究,如主要树种高密度遗传图谱的构建等尤显重要。在遗传图谱构建方面,随着第 3 代分子标记技术的出现,应尽量采用诸如 SNP 等新标记。此外,研究发现,一年生植物的转基因表达不如原先所想像的那样稳定^[39]。因此,对于多年生植物的林木而言,更应重视转基因植株的田间试验与稳定性和安全性评价。目前,北美及欧洲正加强转 Bt 基因杨树的田间试验与评价^[7]。此外,在基因工程方面还需要建立 DNA 导入的技术参数,更深入地了解外源 DNA 与植物细胞基因组整合的机制,以改进现有的实验操作技术。一旦建立了 DNA 导入的参数体系,还应考虑目标细胞对外源基因导入的反应、吸收外源 DNA 的细胞感受态、基因的瞬间表达和被导 DNA 的稳定表达和被导 DNA 与目标细胞机制间的相互作用等。

在宏观方面,由于具有不同的地理、环境和气候条件,我国拥有十分丰富的生物及遗传资源。在生物技术产业迅速崛起并已成为国际市场竞争热点领域的大环境下,我国和其他国家一样,政府十分重视生命科学及生物技术的发展,将其放在各层次科学技术及产业发展计划的重要位置,使其成为优先发展的产业,且在人才及技术方面已拥有了相当的储备,使我国生物技术在某些方面接近发达国家的水平,在发展中国家处于领先地位。但和国际水平相比,我国的科技投入仍明显不足,研究经费的投入仅占国内生产总值的 0.5%,远远低于世界发达国家的水平,在林木生物技术方面更是经费缺乏。由于林木生长的特殊性,基础研究薄弱,创新成果屈指可数,难以突破。在某些方面,由于体制不健全,导致研究效率低下,投资效益不高。所有诸如此类的问题或多或少地影响我国林木生物技术的研究与应用,相信不久的将来会有所改善。

参考文献:

- [1] Scott L J, Shepherd M, Nikles D G, *et al.* QTL mapping in a hoop pine interprovenance hybrid population [A]. Dungey H S, Dieters M J, Nikles D G. *Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees* [C]. Queensland; Department of Primary Industries, 2000. 234—24.
- [2] Moran G F, Butcher P A, Devey M F, *et al.* Generic mapping and application in hybrid breeding [A]. Dungey H S, Dieters M J, Nikles D G. *Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees* [C]. Queensland; Department of Primary Industries, 2000. 177—183.
- [3] Thamaris K, Groom K, Murrell J, *et al.* A genetic linkage map and QTL analysis of wood and pulp traits in *Eucalyptus globulus* [A]. Dungey H S, Dieters M J, Nikles D G. *Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees* [C]. Queensland; Department of Primary Industries, 2000. 510—513.
- [4] Shepherd M, Dieters M J, Toon P, *et al.* The genetic basis of heterosis for stem volume in an interspecific *Pinus hybrid* from QTL mapping [A]. Dungey H S, Dieters M J, Nikles D G. *Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees* [C]. Queensland; Department of Primary Industries, 2000. 218—226.
- [5] Yamane H, Tao R, Sugiura A. Identification and cDNA cloning for S-RNase in self-incompatible Japanese plum (*Prunus salicina* cv. Sordum) [J]. *Plant Biotechnol.* 1999, 16 (5): 389—396.
- [6] Meilan R, Brunner A M, Skinner J S, *et al.* Modification of flowering in transgenic trees [A]. Morohoshi N, Komamine A. *Molecular Breeding of Woody Plants* [C]. Amsterdam; Elsevier science B V, 2001. 247—256.
- [7] Klopferstein N B, Chun Y W, Kee M S, *et al.* *Genetic Engineering, and Molecular Biology* [R]. For Collins; Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station, 1997. 212—219.
- [8] Chupeau M C. Recovery of transgenic trees after electroporation of poplar protoplasts [J]. *Trans Res.* 1994, 3: 13—19.
- [9] Rao H Y, Wu N F, Huang M R, *et al.* Two insect resistant genes were transferred into poplar hybrid and transgenic poplar show insect-resistance [A]. Morohoshi N, Komamine A. *Molecular Breeding of Woody Plants* [C]. Amsterdam; Elsevier Science B V, 2001. 239—246.
- [10] 江香梅. 抗病、抗盐双价基因表达载体构建和杨树遗传转化研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2001.
- [11] 张树珍, 王自章. 植物耐旱的分子基础及植物耐旱基因工程的研究进展 [J]. *生命科学研究*, 2001, 5 (3): 134—140.
- [12] 张香海, 黄丛林, 沈元月, 等. 植物抗旱基因工程研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2001, (4): 21—25.
- [13] 郭卫东, 饶景萍, 徐炎, 等. 抗旱基因HDCS1的植物表达载体构建 [J]. *西北植物学报*, 1999, 19 (3): 371—375.
- [14] 沈立晓. 陈力耕植物抗寒基因工程的研究进展 [J]. *生物学杂志*, 1998, 15 (6): 1—3.
- [15] 陈香波, 张爱平, 姚泉洪. 植物抗寒基因工程研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2001, (4): 14—20.
- [16] Boerjan W, Meyermans H, Chen C Y, *et al.* Lignin biosynthesis in poplar: genetic engineering and effects on kraft pulping [A]. Morohoshi N, Komamine A. *Molecular Breeding of Woody Plants* [C]. Amsterdam; Elsevier Science B V, 2001. 187—194.
- [17] Morohoshi N, Li Y H, Tsuji Y, *et al.* Analysis of transgenic poplar in which the expression of peroxidase gene is suppressed [A]. Morohoshi N, Komamine A. *Molecular Breeding of Woody Plants* [C]. Amsterdam; Elsevier Science B V, 2001. 195—204.
- [18] Kawaoka A, Nanto K, Koiuchi S, *et al.* Transcriptional regulation of lignin biosynthesis by tobacco LIM protein in transgenic woody plant [A]. Morohoshi N, Komamine A. *Molecular Breeding of Woody Plants* [C]. Amsterdam; Elsevier Science B V, 2001. 205—210.
- [19] 何业华, 胡芳名, 谢碧霞. 经济林木离体培养研究进展 [J]. *中南林学院学报*, 2000, 20 (1): 31—39.
- [20] 杨映根, 桂耀林, 郭仲琛. 裸子植物体细胞胚胎发生和人工种子的研究 [J]. *种子*, 1995, (3): 25—30.
- [21] Hao Y J, Deng X X. Stress treatments and DNA methylation affected the somatic embryogenesis of citrus callus [J]. *植物学报*, 2002, 44 (6): 673—677.
- [22] 崔凯荣, 邢更生, 周功克, 等. 体细胞胚发生的生化基础 [J]. *生命科学*, 2001, 13 (1): 28—33.
- [23] 陈夜江, 赖钟雄. 果树和林木体细胞胚胎发生的研究与利用 [J]. *福建农业大学学报*, 2001, 30 (3): 420—426.
- [24] Hosoi Y, Ishii K, Maruyama E, *et al.* Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Pinus amandii* var. *amamiana* [A]. Morohoshi N, Komamine A. *Molecular Breeding of Woody Plants* [C]. Amsterdam; Elsevier Science B V, 2001. 313—318.
- [25] Taniguchi T. Plant regeneration from somatic embryos in *Pinus thunbergii* and *pinus densiflora* [A]. Morohoshi N, Komamine A. *Molecular Breeding of Woody Plants* [C]. Amsterdam; Elsevier Science B V, 2001. 319—324.
- [26] Ogita S, Sasamoto H. Efficient plant regeneration of *Larix kaempferi* [A]. Morohoshi N, Komamine A. *Molecular Breeding of Woody Plants* [C]. Amsterdam; Elsevier Science B V, 2001. 289—296.
- [27] 贺风美, 王力华, 刘阳. 落叶松体细胞胚发生研究进展 [J]. *辽宁林业科技*, 2002, (6): 33—35.
- [28] 汤浩茹, 王永清. 核桃体细胞胚发生与转基因研究进展 [J]. *林业科学*, 2000, 36 (3): 10—110.
- [29] 程佑发, 王勋陵. 枣树体细胞胚发生和组织学研究 [J]. *西北植物学报*, 2001, 21 (1): 142—143.
- [30] 陈金慧, 王洪云, 诸葛强, 等. 林木体细胞胚发生技术进展 [J]. *林业科技开发*, 2000, 14 (3): 9—11.
- [31] Ibaraki Y. Automation in somatic embryo production [A]. Morohoshi N, Komamine A. *Molecular Breeding of Woody Plants* [C]. Amsterdam; Elsevier Science B V, 2001. 365—374.
- [32] Cyr D R, Attree S M, El-Kassaby Y A, *et al.* Application of somatic embryogenesis to tree improvement in conifers [A]. Morohoshi N, Komamine A. *Molecular Breeding of Woody Plants* [C]. Amsterdam; Elsevier Science B V, 2001. 305—312.

- [33] 詹忠根, 张铭, 徐程. 植物非体细胞胚与人工种子 [J]. 种子, 2002, (6): 28—31.
- [34] 叶志毅, 刘红. 桑树体细胞胚的诱导及人工种子制作初探 [J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2001, 27 (4): 469—470.
- [35] 陆荣生, 朝美丽. 木本植物原生质体培养研究进展 [J]. 广西林业科技, 1998, 27 (4): 197—201.
- [36] 胡博然, 徐文彪, 赵吉强, 等. 枸杞生物技术研究进展 [J]. 西北植物学报, 2001, 21 (4): 811—817.
- [37] Valero-Aracama C, Zobayed S M A, Roy S K, *et al.* Photoautotrophic micropropagation of *Rhododendron* [A]. Morohoshi N, Komamine A. *Molecular Breeding of Woody Plants* [C]. Amsterdam: Elsevier Science B V, 2001. 385—390.
- [38] Nguyen Q T, Kozai T. Photoautotrophic micropropagation of tropical and subtropical woody plants [A]. Morohoshi N, Komamine A. *Molecular Breeding of Woody Plants* [C]. Amsterdam: Elsevier Science B V, 2001. 335—344.
- [39] Finnegan J. Transgene inactivation: plants fight back [J]. *Bio/Technology*, 1994, 12: 883—888.

Progress in research and application of forest tree biotechnology

ZENG Yan-ru, FANG Wei

(School of Life Sciences, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Great progress has been made in biotechnology of forest trees with the development of life science. In fundamental research, the genetic maps of many tree species have been constructed with a variety of molecular markers, which has laid a foundation for the identification of quantitative trait loci. In gene engineering, biotechnology of forest trees has played a role in resistance breeding and variety improvement. In cytological engineering, research results have been obtained in somatic embryogenesis, artificial seed, protoplast culture and photoautotrophic micropropagation, some of which have been used in large-scale production. Although research in biotechnology of forest trees is relatively weak as compared with that of agricultural crops, greater progress will be surely made in this field with more national investment and inters penetration of multiple disciplines, which will deepen studies of forestry. [Ch, 39 ref.]

Key words: forest tree biotechnology; fundamental research; gene engineering; cytological engineering