

CaMV35S 启动子驱动的 *FT* 基因调控杨树 早期开花的初步研究

贾小明, 张焕玲

(西北农林科技大学 林学院 西部环境与生态教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 为了研究 CaMV35S 启动子驱动的 *FT* 基因对转基因杨树 *Populus* 早期开花的影响, 利用 Gateway 技术构建了 35S::*FT* 基因表达载体, 并对杨树进行了遗传转化, 从转基因杨树花的发育、花器官变异等方面初步探讨了 35S::*FT* 促进杨树早期开花性能。结果表明: 35S::*FT* 转基因杨树分生组织属性的改变及初始花结构的形成发生于试管培养阶段; 花开始发育后如不及时把开花植株继代培养或转至土壤温室培养, 初始花结构会凋谢枯萎, 不能继续发育。转基因植株花器官的分化与发育发生于温室培养阶段的 3~5 周内, 能够分化出典型的花器官, 但发育不完全, 具雌雄蕊、花盘结构, 无成熟苞片结构, 雄蕊不能成熟发育。35S::*FT* 诱导的花均为单朵花, 而非野生型的柔荑花序; 多数花属于单性花, 但转基因雄性无性系中会出现两性花。转基因植株的开花率随着试管苗继代次数的增加而急剧下降, 但两性花比例会上升。图 1 表 1 参 22

关键词: 林木育种学; 35S 启动子; *FT* 基因; 杨树; 早期开花

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2014)03-0404-06

FT gene with a CaMV35S promoter to control early flowering of transgenic poplar

JIA Xiaoming, ZHANG Huanling

(Key Laboratory of Environment and Ecology in West China of Ministry of Education, Northwest A & F University,
Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: To study the effects on the early flowering capacity of the *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) gene in transgenic poplar driven by a *Cauliflower Mosaic Virus* 35S (CaMV35S) promoter, provide basic data for effective application of *FT* gene on forest trees, an *FT* gene vector driven by a CaMV35S promoter was constructed using Gateway technology, and then genetic transformation of hybrid poplar was performed with this vector. The early flowering capability of transgenic poplar induced by 35S::*FT* was discussed both from flower development and floral organ variation viewpoints. Results showed that transformation of the meristem attributive and initial floral structure of 35S::*FT* transgenic poplar happened in the tube culture stage. If the flowering plants were not sub-cultured in vitro or timely transplanted into soil to culture in a greenhouse, the initial floral structure withered or ceased development. Within 3–5 weeks of greenhouse culture the initial floral structure continued to develop and finished floral organ differentiation and development. The floral organ was incomplete typically with pistil/stamen and flower disc structures but no mature bract structures; stamens also failed to mature. Flowers induced by 35S::*FT* were single flowers rather than catkins as with wild-types. Most flowers were

收稿日期: 2013-09-14; 修回日期: 2013-10-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31300563); 国家林业局引进国际先进农业科学技术计划(“948”计划)项目(2013-4-38); 陕西省自然科学基金资助项目(2012JM3006)

作者简介: 贾小明, 讲师, 博士研究生, 从事林木分子育种研究。E-mail: jxm0601@163.com。通信作者: 张焕玲, 实验师, 博士, 从事林木分子育种研究。E-mail: xingyuejia@163.com

unisexual, but bisexual flowers appeared on male transgenic plants. Flowering frequency of transgenic plants declined sharply with the increase of subculture time, but the proportion of bisexual flowers on male transgenic plants rose. 35S promoter is not suitable in genetic transformation for the purpose of getting normal floral organ. [Ch, 1 fig. 1 tab. 22 ref.]

Key words: forest tree breeding; 35S promoter; *FT* gene; poplar; early flowering

FT (Flowering Locus *T*) 基因是模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的重要开花调控因子之一, 其编码蛋白质是可以长距离转运成花激素的主要成分, 在花形成过程中起关键作用^[1-2]。目前, 已经在水稻 *Oryza sativa*^[3], 小麦 *Triticum aestivum*^[4], 葫芦 *Cucurbita moschata*^[5], 番茄 *Lycopersicon esculentum*^[6], 柑橘 *Poncirus trifoliata*^[7], 苹果 *Malus × domestica*^[8], 杨树 *Populus*^[1,9-12] 等中克隆出 *FT* 的同源基因, 并对部分植物进行了遗传转化, 转基因植物中 *FT* 类基因的过量表达均不同程度地引起了转基因植株的早期开花。水稻 *FT* 同源基因 *Hd3a* 在水稻中的过量表达, 导致转化株具有不依赖于光周期的极早花表型^[3]。多年三叶桔 *Poncirus trifoliata* *FT* 同源基因 *CiFT* 的组成型表达, 促使幼龄期植株提早进入生殖阶段^[7]。苹果 *FT* 同源基因 *MdFT1* 在苹果和杨树中的组成型、或在拟南芥韧皮筛管特异表达启动子 *SUC2* 作用下的特异表达, 均可有效促进转化株的开花, 开花促进作用甚至表现在组织培养阶段^[8]。杨树中, Hsu 等^[9] 在美洲黑杨 *Populus deltoides* 中克隆到了与其开花诱导或季节性生长等相关的基因 *FT2*, 并将 *FT2* 转入杨树幼树中, 使它们 1 a 内开花。Böhlenius 等^[1] 将毛果杨 *P. trichocarpa* 的 *FT* 同源基因 *FT1* 转入杂种杨中, 4 周后农杆菌 *Agrobacterium* 浸染的茎段即出现花状结构, *FT1* 表达量稍弱的植株 6 个月可以成花。Shen 等^[12] 克隆了小叶杨 *Populus simonii* 的 2 个 *FT* 同源基因 *PsFT1* 和 *PsFT2*, 转基因杨树在 40 d 内即可开花。*FT* 基因在木本植物中应用的关键是其诱导的花能够产生有育性的正常配子。上述研究结果均只显示了 *FT* 基因能够促进转基因植物提前开花, 重点在开花过程中 *FT* 基因转录、表达活性及与其他基因的抑制/促进关系研究方面, 而对于其诱导的花的发育及花器官的变异却很少涉及。我们曾对热激启动子 (HSP) 驱动的不同种类 *FT* 基因诱导的杨树花器官进行较为详细的报道^[13], 发现 HSP 驱动的 *FT* 基因诱导的杨树花器官变异较大, 有单性单朵花, 两性单朵花, 正常的柔荑花序, 以及回复营养生长的花序等。那么, 作为植物转基因中应用最为普遍的组成型启动子——CaMV35S 启动子, 其驱动的 *FT* 基因诱导的杨树花器官变异有多大, 同 HSP 启动子相比较, 变异程度如何, 都值得进一步研究。

1 材料与方法

1.1 35S::*FT* 表达载体构建

从拟南芥中聚合酶链式反应 (PCR) 扩增获得 *FT* 基因编码区, 利用 Gateway 技术将扩增片段克隆在双元表达载体 pH35GS (Invitrogen) 上, 代替位于 CaMV35S 启动子下游的 *ccdB* 基因。扩增引物为: 5'-GGCATCGTATCAAGCTTACTAGTG-3', 5'-ATCAAGAACGTCTCCAACAACCTCTG-3'。

1.2 植物材料、转化及植株再生

供试杨树为杂种无性系 T89 (雄株, *P. tremula* × *P. tremuloides*) 及无性系 717 (雌株, *P. tremula* × *P. alba*) 试管苗。35S::*FT* 转化农杆菌 (LBA4404) 参考 Holstein 等^[14] 的方法, 无性系 T89 和 717 再生、转化参照 Tuominen 等^[15] 的方法。转基因植株的 PCR 检测参照 Filichkin 等^[16] 的方法, 扩增引物为: 5'-AGT-GAAGGCATCGTATCAAGC-3', 5'-CGCGGGATATCACCACCTTTG-3'。

1.3 转基因植株的培养及开花观察

将 PCR 检测呈阳性的植株按株系编号, 于 (25±2) °C, 光照 16 h·d⁻¹, 光强 45 μmol·m⁻²·s⁻¹ 的培养室中茎段扩繁培养, 待不定芽长至 2 cm 时生根培养, 期间观察记录在试管培养阶段的开花情况。将试管培养阶段形成初始花结构的转基因植株一部分茎段扩繁继代, 观察 35S::*FT* 在继代过程中的诱导开花情况; 同时, 将形成初始花结构的转基因植株另一部分移栽至装有灭菌移栽基质的塑料容器中 (口径 5 cm), 浇水后放在装水的密封塑料袋内炼苗 3 周后移至温室 [温度 (25±2) °C, 光照时间 16 h·d⁻¹, 光照强度 120 μmol·m⁻²·s⁻¹] 培养; 待苗高长至 15 cm 时移栽至口径 20 cm 的大塑料容器中, 观察记录温室培养阶段的开花情况。浇水 1 次·d⁻¹, 施液体肥料 1 次·周⁻¹ [V(氮):V(磷):V(钾)=20:20:20]。最后, 将温室培养开花的转基因植株转至露天栽培, 经过 1 个冬季休眠后, 于生长季观察转基因植株的 2 次开花能力。

2 结果与分析

2.1 35S::FT 转基因植株的获得及开花率

试验总共获得无性系 T89 转基因阳性株系 15 个, 其中在 6 个转基因株系中观察到了早期开花现象, 开花株系占阳性株系的 40.0%。获得无性系 717 转基因阳性株系 11 个, 其中在 5 个转基因株系中观察到了早期开花现象, 开花株系占阳性株系的 45.5%。同我们之前在 *HSP::FT* 中的研究结果类似^[11,13], 2 种杨树同一开花转基因株系内, 并不是所有单株都能诱导开花, 开花率(开花株系内, 开花个体占总个体数的百分率)最高的株系约为 56.0%, 最低的约为 12.0%, 这种现象在杨树开花基因转化研究中很常见, 可能是由于 *FT* 基因插入杨树基因组的位点不同影响的结果, 例如插入位点位于正向调节元件周围, 或位于反向调节元件周围, 会导致 *FT* 基因不同地表达强度和特异性。或者插入异染色质区, 而非非常染色质区域时, 由于与周边序列碱基组成的差异, 都可以引起基因沉默, 从而失去表达的能力^[17]。

2.2 35S::FT 转基因植株分生组织属性转变及初始花结构的形成发生于试管培养阶段

转基因植株顶端分生组织属性的转变及初始花结构的形成发生于试管培养阶段, 试管培养 2 个月, 株高为 4~6 cm 的植株就可开始初始花结构的发育(图 1a), 说明转基因植株顶端分生组织属性的改变最早可发生于外植体与农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 共培养之后至不定芽诱导出的 2 个月内。

在该时段内, 顶端分生组织由营养型向生殖型转变, 变成花序型分生组织^[18], 花序型分生组织在发育过程中, 一部分在叶腋部位产生花芽, 一部分继续生长、伸长, 在新的叶腋部位产生更多的花芽。花芽发育时, 最开始从叶腋部位长出一细丝状类似于花梗的结构, 随着培养时间延长, 细丝结构会伸长, 约 2 周后, 长至 3~5 mm 时, 其顶端会慢慢膨大, 在随后的温室培养中会分化成花器官, 形成单朵花(图 1b)。

花是极度压缩的枝条, 杨树野生型花是由很多小花紧密着生在花轴上, 形成一柔荑花序, 各小花之间无节间。而转基因植株产生的这些单朵花更像着生在一花枝上面, 每朵花基部有一叶片, 2 朵花之间的节间较长, 约 5 mm。这似乎暗示了 35S::FT 基因可能只决定了开花的时间, 不能使顶端分生组织属性由营养型向生殖型彻底转变, 一部分营养生长还在继续。当转基因植株产生 4~6 朵单朵花时, 花序型分生组织营养生长才明显受到抑制, 产生于顶端的 8~10 朵花簇生在一起, 外观更像一花序, 花与花之间的节间极度缩短, 基部没有叶片, 顶端成花, 不再伸长生长(图 1c)。

2.3 35S::FT 转基因开花株系开花率随继代次数增加而降低, 两性花比例上升

试验发现, 开花的转基因株系继代后开花率大幅下降(表 1)。T89 雄性无性系继代前 6 个开花株系的平均开花率为 37.8%, 继代 1 次后株系平均开花率就下降至 16.0%, 随着继代次数增加, 开花率不断下降, 继代 5 次后未发现开花植株。717 雌性无性系继代前 5 个开花株系的平均开花率为 10.3%, 继代 1 次后下降至 3.0%, 继代 2 次后未见开花植株。同时, T89 雄性转基因植株中会产生少量两性花(图 1e), 两性花的比例会随着继代次数的增加而上升。继代前两性花比率为 11.8%, 继代 1 次为 12.4%, 继代 4 次后升至 39.7%。在杨树其他开花基因转化中也曾发现转基因植株出现性别转化现象^[19], 目前还不清楚开花基因究竟如何引起两性花的发育, 以及为何继代次数会增加两性花比例。

2.4 花器官的分化发生在温室培养阶段

转基因植株在试管培养阶段只能形成初始花结构, 不能完成花器官的分化。试管内开花的转基因植株, 如不及时继代培养或移栽至温室培养, 初级花结构会很快枯萎凋谢, 不能继续发育。只有将试管培养完成花芽分化的材料移栽至温室培养, 才能完成花器官的分化。我们将部分试管阶段形成初始花结构未凋谢、未继代的转基因植株, 直接经炼苗移栽后转入温室培养, 发现试管阶段诱导的初始花结构在移栽至温室后会继续发育, 形成花器官, 但发育不完全, 具雌雄蕊、花盘结构, 无成熟苞片结

表 1 继代次数对转基因无性系开花率、两性花比率的影响

Table 1 Effects of subculture on flowering frequency and bisexual flower rate of transgenic clones

继代次数	T89(♂)开花率/%	717(♀)开花率/%	T89(♂)两性花比例
0	37.8	10.3	11.8
1	16.0	3.0	12.4
2	9.2	0	—
3	3.6	0	—
4	0.8	0	39.7
5	0	0	—

说明: 表中数据为 11 个开花株系的平均值, 每个株系约 30~35 个个体。“—”表示未观察。

构, 雄蕊不能成熟发育(图 1g)。雄株 T89 转基因株系会产生大量的雄花(图 1d)以及少量两性花(10%左右)(图 1e), 雌株 717 转基因株系只产生雌花(图 1f)。不论哪种花, 均为单朵花, 而非野生型的柔荑花序(图 1j)。从试管培养阶段初始花结构形成至温室培养阶段花器官的分化需要约 5 周左右的时间。花器官均产生于初始花结构顶端膨大部位。对于雄花, 花药从花盘中展露约需 1 周时间; 每个花朵会产生 3~5 枚散生雄蕊, 均由 1 个花丝连接在花盘上, 花丝长约 0.5 mm, 花药长约 0.1~0.3 mm (图 1d)。花药外形跟野生型区别不大, 但不能成熟发育, 未发现散粉现象。两性花的雄蕊和雄花的大小相当, 也未见散粉现象, 雌蕊很大, 子房可达 2 mm, 纺锤形, 没有明显的花柱 (图 1e)。雌花子房比两性花子房大, 约 3~4 mm(图 1f)。因为一起开放的雄花未能散粉, 又未进行人工授粉, 所以, 两性花及雌花的胚囊育性未知。



a. 试管培养阶段形成初始花结构; b. 腋生单朵花, 枝条顶端未成花; c. 顶端簇生单朵花; d. 雄花, 箭头所指为花盘内的花药, 比例尺 0.5 cm; e. 两性花, 箭头所指为雄蕊及雌蕊, 比例尺 2 mm; f. 雌花, 比例尺 1 cm; g. 温室培养阶段继续发育的花枝; h. *HSP::FT* 诱导的杨树雄花穗^[13]; i. *HSP::FT* 诱导的杨树雌花穗^[13]; j. 无性系 T89 野生型花序^[10]。

图 1 35S::*FT* 转基因杨树早期花发育及花器官变异

Figure 1 Flower development and variation of 35S::*FT* transgenic poplars

2.5 温室开花后的植株, 未能再次开花

温室培养阶段的开花植株, 在随后 1 a 的继续培养中未能再次开花, 即使植株高度达 1 m 以上的植株, 也未二次开花。是否因为植株没有经过休眠造成这种现象呢? 我们将在温室生长 1 a 的 35S::FT 转基因植株移栽至露天栽培, 发现经过一个冬天的低温休眠处理, 第 1 次开花的转基因植株也未能再次开花。

3 讨论

试验显示: FT 基因在诱导杨树早期开花方面, 确实有明显促进作用。由于 35S 启动子的过量表达, 促使 FT 基因在 2 月龄试管苗中提前表达而诱导其开花, 这将杨树大田开花所需的 8~20 a 时间缩短到短短的 2 个月。然而, 35S::FT 转基因植株所开的花全为异常的单朵花, 而非野生型的柔荑花序。除了胚囊育性不可知之外, 所有雄花均不能完全发育, 不能产生花粉。而我们构建的热激启动子(HSP)驱动的 FT 转基因杨树, 尽管花器官变异依然较大, 但产生了较多数量的正常柔荑花序(图 1h 和图 1i), 且有花粉产生^[11,13]。这说明, 在以诱导正常花器为目的转基因研究中, 35S 并不是合适的启动子, 尽管该启动子驱动的 FT 转基因植株具有明显的早花性, 但因其诱导的花发育不全没有育性而失去应用价值。

35S::FT 转基因植株在成花过程的早期, 分生组织并不能完全失去营养生长特性, 导致花与花之间有较长节间, 且有叶片发育, 形成异常的单朵花, 单朵花不能成熟发育等。这些都暗示了 FT 基因可能只决定了开花的时间, 而不能决定花的正常发育。在后期, 分生组织基本丧失了营养生长特性, 形成外观更像花序的顶端簇生单朵花。这暗示了在后期, 可能有别的影响花朵发育的基因发挥了作用, 促使花的发育更加趋于正常, 而这些开花基因的正常表达, 与转基因植株的生长发育状态有关。这也说明了为什么转基因植株在试管培养阶段只能完成分生组织属性的改变, 形成初始花结构, 不能完成花器官的分化与发育, 而在移栽至温室后会完成花器官的分化发育过程的原因。

植物从营养生长向生殖生长的转换是高等植物开花最重要的过程, 开花诱导过程是开花基因在时间和空间上顺序表达的结果, 机制十分复杂, 有光周期、春化、自主促进和赤霉素(GA)等多种开花诱导途径的参与, 涉及许多调控基因^[18]。自然界中杨树必须经过 8~20 a 的营养生长阶段之后才能诱导开花, 35S::FT 虽然可以瞬时过量表达促进转基因杨树在很早的试管培养阶段形成花结构, 但似乎很难改变杨树在长期进化过程中形成的固有开花模式, 正常花器的诱导依然离不开植株自身足够的营养生长, 以及在特定发育阶段表达的其他开花基因的调控。这一点在我们对 HSP::FT 转基因杨树的研究中也有发现, 热激材料的年龄越大, 开花率越高, 正常花器数目越多^[13]。这也暗示了在开花基因转化研究中, 特异性启动子较组成型启动子有优势, 因为特异性启动子如 HSP 可以在植株经过足够的营养生长时间之后再诱导让其表达, 促进开花, 而组成型启动子如 35S, 这一点似乎很难实现。

以往研究显示, 35S 启动子驱动的开花基因的表达很不稳定, 在离体及温室栽培中促花性能不一, 甚至同一开花基因转化不同种植物促花性能也不一样, 开花植株重复开花率较低, 而且会阻遏植物的正常生长发育等^[10,21]。我们的研究也发现这种不稳定现象, 35S::FT 转基因杨树开花率随着试管苗继代次数的增加而下降、温室培养及转至大田的开花植株也未能再次开花。甚至同样的实验材料, 我们的结果与 Hoenicka 等^[10]的研究结果也不一致, 他们在 35S::FT 转化无性系 T89 的研究中发现, 转基因植株在温室培养阶段不能继续完成花的发育。引起这种不稳定现象的原因需进一步用实验证明, Hoenicka 等^[10]认为可能是由于基因沉默或其他开花基因扰乱了 35S::FT 系统的开花诱导所致。也可能与影响 35S 启动子表达的植株发育阶段、光周期、温度等因素^[22]有关。

总之, 植物生长发育、开花结实是一个复杂的生化过程。该过程的正常实现, 既与各种相互关联的遗传基因、环境因子、遗传与环境因子之间的严密调控有关, 也与长期进化中形成的各种平衡关系有关, 还与植物的生长发育状态有关^[4-6,9-10,21-22]。开花基因转化中, 转基因植株早期开花中存在的一系列异常现象, 可能涉及上述任一因素, 要揭示其真正原因, 需要从分子手段入手, 深入探明开花基因及其调控基因促进开花的机制以及影响花器官正常发育的基因及其调控机制。相信杨树和其他林木以及 1 年生植物的比较基因组学和基因组功能的基础研究, 将会帮助找到解决问题的新途径。或许, 其他开花基因(单基因途径)及启动子, 以及多种开花基因的联合使用(基因叠加途径), 是解决这一问题的有效途径。

参考文献:

- [1] BÖHLENIUS 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**(5776): 1040 – 1043.
- [2] FLACHOWSKY H, HANKE M V, PEIL A, *et al.* A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants [J]. *Plant Breed*, 2009, **128**: 217 – 226.
- [3] TAMAKI S, MATSUO S. Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice [J]. *Science*, 2007, **316**(5827): 1033 – 1036.
- [4] YAN Limei, FU Dong, LI Chunlei, *et al.* The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologs of *FT* [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2006, **103**(51): 19581 – 19586.
- [5] LIN M K, BELANGER H, LEE Y J, *et al.* FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the *Cucurbits* [J]. *Plant Cell*, 2007, **19**: 1488 – 1506.
- [6] LIFSCHITZ E, EVIATAR T, ROZMAN A, *et al.* The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, **103**: 6398 – 6403.
- [7] ENDO T, SHIMADA T, FUJII H, *et al.* Ectopic expression of an *FT* homolog from citrus confers an early flowering phenotype on trifoliate orange (*Poncirus trifoliate* L.Raf) [J]. *Transgenic Res*, 2005, **14**(5): 703 – 712.
- [8] TRANKNER C, LEHMANN S, HOENICKA H, *et al.* Over-expression of an *FT*-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants [J]. *Planta*, 2010, **232**(6): 1309 – 1324.
- [9] HSU C Y, LIU Y, LUTHE D S, *et al.* Poplar *FT2* shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering [J]. *Plant Cell*, 2006, **18**: 1846 – 1861.
- [10] HOENICKA H, LEHNHARDT D, POLAK O, *et al.* Early flowering and genetic containment studies in transgenic poplar [J]. *J Biogeosci For*, 2012, **5**: 138 – 146.
- [11] ZHANG Huanling, HARRY D E, MA C, *et al.* Precocious flowering in trees: the *FLOWERING LOCUS T* gene as a research and breeding tool in *Populus* [J]. *J Exp Bot*, 2010, **61**(10): 2549 – 2560.
- [12] SHEN Lili, CHEN Yang, SU Xiaohua, *et al.* Two FT orthologs from *Populus simonii* Carrière induce early flowering in *Arabidopsis* and poplar trees [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2012, **108**(3): 371 – 379.
- [13] 贾小明, 张焕玲. 3 种 *FT* 基因诱导杨树早期开花比较 [J]. 东北林业大学学报, 2011, **39**(11): 1 – 4.
JIA Xiaoming, ZHANG Huanling. Comparison of flowering induced by three *FT* genes on poplar [J]. *J Nor For Univ*, 2011, **39**(11): 1 – 4.
- [14] HOLSTEIN M, de WACEK D, DEPICKER A, *et al.* Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Mol Gen Genet*, 1978, **163**: 181 – 187.
- [15] TUOMINEN H, SITBON F, JACOBSSON C, *et al.* Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes [J]. *Plant Physiol*, 1995, **109**: 1179 – 1189.
- [16] FILICHKIN S A, MEILAN R, BUSOV V B, *et al.* Alcohol-inducible gene expression in transgenic *Populus* [J]. *Plant Cell Reports*, 2005, **25**: 660 – 667.
- [17] KUMAR S, FLADUNG M. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*) (II) Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen [J]. *Planta*, 2001, **213**: 731 – 740.
- [18] KOMEDA Y. Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, **55**(1): 521 – 535.
- [19] 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.
- [20] WEIGEL D. The genetics of flower development: From floral induction to ovule morphogenesis [J]. *Ann Rev Genet*, 1995, **29**: 19 – 39.
- [21] ZEEVAART J A . Florigen coming of age after 70 years [J]. *Plant Cell*, 2006, **18**(8): 1783 – 1789.
- [22] BENFEY P N, CHUA N H. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants [J]. *Science*, 1990, **250**: 959 – 966.