

一种杨树香叶基香叶醇还原酶及其编码基因与应用

技术领域

本发明涉及植物基因技术领域，具体涉及一种杨树香叶基香叶醇还原酶及其编码基因与应用。

背景技术

叶绿素分子在光合生物中普遍存在，其通过驱动反应中心的电子传递来完成在天线系统中捕获光能的基本过程。叶绿素在植物等光合生物体中起着至关重要的作用。叶绿素 a 是 PSI 和 PSII 反应中心的主要电子供体。随着分子生物学和蛋白质结构学的发展，参与叶绿素生物合成途径的关键成员得到了充分的探索和鉴定。香叶基香叶醇还原酶(CHLP)在植物光合作用和叶绿素合成中发挥了重要作用，并参与叶绿素生物合成的末端加氢化步骤。目前，CHLP 基因已在许多物种中被鉴定出来，包括光合细菌、藻类、烟草、水稻、桃子、橄榄和番茄。蓝藻的 *chl*p 突变体中的叶绿素和类胡萝卜素含量降低。烟草 *CHLP* 基因沉默后植株生长缓慢，叶片呈苍白或斑驳表型。在水稻中 *chl*p 突变体其叶片为黄绿色，影响植物生长。在杨树中，*PtrCHLP3* 基因在调控杨树生长速度、光合速率和叶片颜色等方面发挥了重要作用。因此，筛选并克隆 *PtrCHLP3* 基因，利用 *PtrCHLP3* 基因进行遗传转化，是改良植物新品种和创制彩叶植物的重要途径之一。

彩叶树种是建设公园城市的重要物质基础。但是，目前彩叶园林树木品种单一、稀缺，远不能满足城市园林绿化的需求，因而培育彩叶树木新品种已成为园林树木育种的一个重要目标。因此，亟待利用快速、定向改良的分子育种技术，弥补传统的园林树木育种技术的缺陷，高效选育彩叶树木新品种，以满

足公园城市建设的需求。已有的针对色彩改造的分子育种主要集中在对草本花卉花色的改造，而彩叶树木的分子育种国内外几乎还是空白。由于对彩叶树木叶色形成的关键基因及其调控机制了解不清楚，这些缺陷和瓶颈极大地阻碍了彩叶树木分子育种的进程，因而鲜有通过分子生物学手段对叶色进行改造，选育出彩叶树木新品种的报道。目前对杨树 *PtrCHLP3* 基因的研究尚未见报道，而通过利用其改良杨树新品种和创制彩叶植物的技术更是缺乏。如果能通过基因工程的技术调控 *PtrCHLP3* 基因的表达，逐步改善杨树生长速率及叶片颜色，将极大促进其在生产中的应用，对于林木分子育种研究及林业生态文明建设，具有非常重要的实践意义。

发明内容

针对现有技术存在的问题和缺陷，本发明提供一种杨树香叶基香叶醇还原酶及其编码基因与应用。本发明的技术方案为：

第一方面，本发明提供一种香叶基香叶醇还原酶，来源于杨树，其氨基酸序列如 SEQ ID NO .12 所示。

第二方面，本发明还提供与该香叶基香叶醇还原酶相关的生物材料，为以下 1) ~5) 中的任一种：

- 1) 编码香叶基香叶醇还原酶的核酸分子；
- 2) 含有 1) 所述核酸分子的表达盒；
- 3) 含有 1) 所述核酸分子的重组载体；
- 4) 含有 1) 所述核酸分子的重组微生物；
- 5) 含有 3) 所述重组载体的重组微生物。

进一步地，所述编码香叶基香叶醇还原酶的核酸分子的核苷酸序列如 SEQ ID NO .1 所示。

第三方面，本发明提供所述香叶基香叶醇还原酶或者所述生物材料在调控杨树生长发育上的应用。

说明书

进一步地，所述调控杨树生长发育包括调控杨树生长速率和/或叶片颜色。

进一步地，所述调控包括抑制所述香叶基香叶醇还原酶或者所述生物材料在杨树中的表达进而使杨树生长速率减慢和/或叶片颜色变黄。

第四方面，本发明提供一种转基因杨树的构建方法，包括如下步骤：

(1) 以 SEQ ID NO .1 所示的杨树香叶基香叶醇还原酶编码基因 *PtrCHLP3* 的基因序列为模板，分别利用正向片段克隆引物和反向片段克隆引物扩增正向片段和反向片段；

(2) 以 PCAMbiA2301-PS 为骨架载体，将 pCambia2301-PS 载体进行双酶切(SacI/XbaI)，然后将 *PtrCHLP3* 部分片段的正向序列、RTM 序列和部分片段的反向序列依次重组到 PCAMbiA2301-PS 载体中，得到 pCAMBIA2301-*PtrCHLP3*-RNAi 阳性质粒；

(3) 将 pCAMBIA2301-*PtrCHLP3*-RNAi 阳性质粒采用叶盘法转化杨树。

进一步地，所述步骤(1)中正向片段克隆引物为 *PtrCHLP3-F1* 和 *PtrCHLP3-R1*，所述反向片段克隆引物为 *PtrCHLP3-F2* 和 *PtrCHLP3-R2*；所述正向片段克隆引物 *PtrCHLP3-F1* 的序列如 SEQ ID NO .2 所示，所述正向片段克隆引物 *PtrCHLP3-R1* 的序列如 SEQ ID NO .3 所示，所述反向片段克隆引物 *PtrCHLP3-F2* 的序列如 SEQ ID NO .4 所示，所述反向片段克隆引物 *PtrCHLP3-R2* 的序列如 SEQ ID NO .5 所示。

进一步地，所述步骤(3)中将 pCAMBIA2301-*PtrCHLP3*-RNAi 表达载体采用叶盘法转化杨树，具体包括：将 pCAMBIA2301-*PtrCHLP3*-RNAi 阳性质粒转化表达菌株感受态，利用侵染法侵染杨树叶盘，筛选阳性转基因株系，获得转基因杨树。

优选地，所述表达菌株为农杆菌。

本发明的有益效果在于：

本发明提供了杨树 *PtrCHLP3* 基因能够调控杨树生长发育，尤其是调控杨树生长速度、光合速率和叶片颜色方面的新应用。进而采用转基因技术，将包

含 **PtrCHLP3** 基因的部分片段的载体整合到杨树基因组中，初步定向改变杨树生长速率和叶片颜色特征。**PtrCHLP3** 基因抑制表达能够减慢植株生长，使株高减少，茎部变细，叶片颜色变黄等，为利用基因工程技术初步选育杨树新品种提供了新方法。

附图说明

图 1 为本发明实施例 1 构建的 **PtrCHLP3** 抑制表达载体的相关检测电泳图；
(a) 总 RNA 电泳检测；(b) 目的片段全长电泳图；1~4：目的基因 **PtrCHLP3** 全长片段；M:Mark 2000；(c) PCR 验证农杆菌转化电泳图 M:Mark 2000；1~6: **pCAMBIA2301-PtrCHLP3-RNAi** 重组质粒的 PCR 验证；

图 2 为本发明实施例 1 构建的抑制表达的植物表达载体 **pCAMBIA2301-PtrCHLP3-RNAi** 的载体图谱。

图 3 为本发明实施例 1 中转 **PtrCHLP3** 基因杨树的转化、再生及表型图；其中，a：愈伤组织；b：叶盘再生转基因芽丛；c：再生的抗性转基因小植株；d：对照(WT)、抑制表达 (L1-L9) 转基因嫩植株继代扦插 30 天的表型图；

图 4 为本发明实施例 1 中转 **PtrCHLP3** 基因杨树不同的检测方式图；(a)构建的抑制表达植物表达载体 **pCAMBIA2301-PtrCHLP3-RNAi** 示意图片段；(b) 转 **PtrCHLP3** 基因杨树特异引物检测电泳图；M: Mark 2000；PC: **p2301-PnCHLP-RNAi** 阳性控制载体；NC: 阴性对照；WT: 野生型；L1-L9: **PtrCHLP3** 抑制表达杨树转基因株系；(c) 不同转基因植株的组织化学 GUS 染色图；WT: 野生型；L1-L9: **PtrCHLP3** 抑制表达杨树转基因株系；(d) 不同转基因株系 **PtrCHLP3** 基因相对表达量分析；WT: 野生型；L1-L9: **PtrCHLP3** 抑制表达杨树转基因株系；

图 5 为本发明实施例 1 中转 **PtrCHLP3** 基因杨树表型图及叶绿素含量；(a) 杨树叶片俯视图；WT: 野生型；chlp-3/4: **PtrCHLP3** 抑制表达杨树转基因株

系；(b) 杨树叶绿素含量；Chla：叶绿素 a；Chlb：叶绿素 b；Caro：类胡萝卜素；

图 6 为本发明实施例 1 中对照(WT)、抑制表达(chlp-3/4)阳性株系 35 天幼苗表型统计分析。(a)：表现图；(b)：株高与天数的关系；(c)：不同部位的鲜重；(d)：茎生长量；(e)：地径；(f) - (k)：第 8 节茎横切面染色图；(i) - (m)：第 8 节茎横切面数据统计。

具体实施方式

在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明，所述是对本发明的解释而不是限定。

实施例 1

1. 获取 PtrCHLP3 基因

总 RNA 的提取材料为 84K 杨的幼嫩叶片，采用液氮充分研磨，参照湖南艾瑞克生物公司的 RNeasy Pure Plant Kit 的 RNA 提取试剂盒说明书进行，实验过程中配合使用 RA-10 去核酸酶试剂喷洒实验仪器和操作台面，去除表面残留的 RNase。使用 Thermo Nanodrop 2000 核酸/蛋白定量仪测定 RNA 的浓度、OD260/OD280、OD260/OD230 的数值，观察样品在 260nm 处的吸收峰。

150V，20min，1%琼脂糖凝胶的条件下，电泳检测 RNA 完整性，结果如图 1 中 a 图所示。cDNA 的合成参照湖南艾瑞克生物公司 *TransScript*[®] All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for PCR 试剂盒说明书进行。根据 popgenie 数据库毛果杨基因组获取杨树 CHLP3 基因核苷酸序列，利用 Primer 5.0 设计引物 PtrCHLP3-F1（序列如 SEQ ID NO. 2 所示）和 PtrCHLP3-R1（序列如 SEQ ID

NO.3 所示)，以上一步合成的 cDNA 为模板，PCR 扩增基因全长。25 μ L 反应体系：2 \times EasyTaq[®]PCR SuperMix 12.5 μ L，引物 F (10 μ M) 1 μ L，引物 R (10 μ M) 1 μ L，cDNA 模板 2 μ L，ddH₂O 8.5 μ L；反应程序：94 $^{\circ}$ C 预变性 3min，35cycles(94 $^{\circ}$ C 30s, 62 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min)，72 $^{\circ}$ C 延伸 5min；4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应结束后，用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物如图 1 中 b 图所示，对 1000bp 处的条带进行切胶回收。回收按照北京擎科生物有限公司的胶回收试剂盒进行操作。获得杨树 PtrCHLP3 基因 ORF 序列。PtrCHLP3 基因的核苷酸如 SEQ ID NO.1 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO.12 所示。

2. 干扰表达植物表达载体 pCAMBIA2301-PtrCHLP3-RNAi 的构建

设计 PtrCHLP3 基因序列正向片段克隆引物 PtrCHLP3-F1(序列如 SEQ ID NO.2 所示)和 PtrCHLP3-R1(序列如 SEQ ID NO.3 所示)、反向片段克隆引物 PtrCHLP3-F2(序列如 SEQ ID NO.4 所示)和 PtrCHLP3-R2(序列如 SEQ ID NO.5 所示)。以 SEQ ID NO.1 所示的杨树 PtrCHLP3 基因为模板，使用 PCR 一步定向克隆试剂盒克隆目的基因。正向片段克隆的 25 μ L 反应体系：2 \times EasyTaq[®]PCR SuperMix 12.5 μ L，Primer PtrCHLP3-F1 1 μ L，Primer PtrCHLP3-R1 1 μ L，cDNA 2 μ L，ddH₂O 8.5 μ L；反向片段克隆的 25 μ L 反应体系：2 \times EasyTaq[®]PCR SuperMix 12.5 μ L，Primer PtrCHLP3-F2 1 μ L，Primer PtrCHLP3-R2 1 μ L，cDNA 2 μ L，ddH₂O 8.5 μ L；反应程序：94 $^{\circ}$ C 预变性 3min，35cycles(94 $^{\circ}$ C 30s, 62 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min)，72 $^{\circ}$ C 延伸 5min；4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应结束后，得到正向目的片段和反向目的片段。

用 XbaI/SacI 双酶切质粒 pCAMBIA2301-PC。双酶切体系为(50 μ L)：10 \times QuickCut Buffer 5 μ L，SacI 2.5 μ L，XbaI 2.5 μ L，pCambia2301-PS 1 μ g，ddH₂O up to 50 μ L；轻柔吸打混匀，37 $^{\circ}$ C 温育 2.5h。回收线性化的质粒载体 pCAMBIA2301-PC。利用 ClonExpress II 重组试剂盒将 PtrCHLP3 部分片段的正向序列、RTM 序列和部分片段的反向序列依次重组到 PCAMbiA2301-PS 载体

中，然后转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 。然后通过 PCR 鉴定挑选出转化的阳性克隆进行测序，获 pCAMBIA2301-PC 连接正向片段和反向片段的重组质粒，得到 pCAMBIA2301-PtrCHLP3-RNAi 载体，载体图谱如图 2 所示；

3. 农杆菌 GV3101 介导的叶盘法转化 84K 杨

从超低温冰箱中取出农杆菌感受态 100 μ L 放至碎冰上融化，向其中分别加入 5 μ L 抑制表达载体质粒 pCAMBIA2301-PtrCHLP3-RNAi，轻弹混匀；依次在冰上静置 5min，液氮速冻 5min，37 $^{\circ}$ C 水浴 5min，冰浴 5min。加入 700 μ L YEB 培养基，28 $^{\circ}$ C 摇床中 200r/min 培养 2.5h。6000r/min 离心 1min，留取 100 μ L 液体培养基吸打混匀，使用涂布棒涂布在含有 50mg/L Ka 的 YEB 固体培养基上，28 $^{\circ}$ C，倒置培养 48h。挑取 6 个单克隆菌落，分别根据载体自带 35S 片段设计上游引物 35S-F (SEQ ID NO .6)，载体 RTM 片段设计下游引物 RTM-R (SEQ ID NO .7) 进行 PCR 反应，并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物如图 1 中 c 图所示。将验证正确保存于终浓度为 20% 的甘油中，液氮冷冻后置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。挑取单菌落进行菌落 PCR，将 PCR 结果为阳性的菌落接种于含卡那霉素和利福平的液体培养基上 28 $^{\circ}$ C 摇菌 16h。将活化好的菌液离心，得到沉淀，将沉淀用液体 MS 培养基重悬，得到农杆菌菌液。分光光度计 600nm 波长光测定菌液浓度为 0.6~0.8 时，即可用于侵染转化。

取 84K 杨组培苗的上端叶片，用剪刀剪成约 1 \times 1cm 的块状，以主脉为中心轴，用刀片在主脉上划几刀（图 3 中 a 图），然后放入农杆菌重悬营养液 WPM 中侵染 10min 左右。取出叶片，放入装有滤纸的培养皿中晾数分钟，并用滤纸条彻底吸干叶片上残留的菌液，将叶片转入 WPM+100 μ M/L AS 中，25 $^{\circ}$ C 暗培养 2d。将侵染叶片转入 WPM+0.2mg/L KT+1.0mg/L 2,4-D+60mg/L Ka+250mg/L Cef+300mg/L TMT 中诱导愈伤的形成，25 $^{\circ}$ C 暗培养，每隔 2 周将叶片转入新配制的 WPM+0.2mg/L KT+1.0mg/L 2,4-D+60mg/L Ka+250mg/L Cef+300mg/L TMT 中。待愈伤至米粒大小将其切下，转入 WPM+0.02mg/L TDZ+60mg/L

Ka+250mg/L Cef+300mg/L TMT 中诱导芽的形成, 25℃光照培养, 每隔 2 周将愈伤转入新配制的 WPM+0.02mg/L TDZ+60mg/L Ka+250mg/L Cef+300mg/L TMT 中, 直至愈伤组织长出较多的芽(图 3 中 b 图)。将芽和愈伤组织一起接种到无激素的 WPM+60mg/L Ka+250mg/L Cef 中, 诱导芽进行伸长生长。当芽伸长至 1cm 后, 将芽切下, 转入 WPM+60mg/L Ka+250mg/L Cef 中诱导芽进行生根(图 3 中 c 图), 25℃光照培养至小苗高度约为 10cm。图 3 中 d 图给出了对照(WT)、抑制表达(L1-L9)转基因杨树继代扦插 30 天的表型图(注: 图 3 和图 4 中的植物一一对应)。选择根系发育良好的 84K 杨树, 开盖于培养室中炼苗 3d 后, 移栽至花盆中, 在光照培养箱中培养 7d, 最后转入大棚温室中正常管理。用未经处理的野生 84K 杨树作对照, 炼苗方式同上。L1~L9 属于相同转基因植株, 区别在于 *PtrCHLP3* 基因的表达水平不一样。

4. 转基因株系的检测

图 4 中 a 图中代表插入到杨树基因组中干扰表达载体的部分片段示意图。采用 PCR 法对转基因株系进行验证。待不定芽形成完整小植株时, 切取部分叶片, 使用 CTAB 方法提取基因组 DNA(模板), 用基因特异引物检测阳性植株。分别在 CaMV35S 和 RTM 上设计一对特异引物 *35S-F*(序列如 SEQ ID NO.6 所示)和 *RTM-R*(序列如 SEQ ID NO.7 所示), 以未转化植株为阴性对照(野生型植株), 对转基因再生株系进行初步 PCR 检测, PCR 体系为(25μL): 1.1×T3 Super PCR Mix 21μL, *35S-F* 和 *RTM-R* 引物各 1μL, DNA 模板 2μL; PCR 程序为 98℃ 预变性 2min, 35cycles(98℃ 10s, 60℃ 10s, 72℃ 30sec), 72℃ 延伸 2min, 4℃ 保存。PCR 产物用凝胶电泳检测如图 4 中 b 图所示, 阳性抑制表达株系 9 个(用 L1-L9 表示), 均可扩增出约 500bp 大小的条带, 而野生型植株没有扩增出条带。

采用 GUS 染色法对转基因株系进行验证。参照华越洋生物的 GUS 染色试剂盒说明书, 剪取叶片放入 1.5mL 离心管, 加入 1ml 的 GUS 染色工作液浸泡叶

片, 37℃放置 24h, 弃去液体。加 70%乙醇浸泡叶片脱色 1-3h, 2-3 次, 至野生型 84K 杨叶片呈白色。观察, 叶片中出现的蓝色小点是 GUS 表达位点。GUS 染色观察结果如图 4 中 c 图所示, 阳性抑制表达株系 9 个 (L1-L9) 均为蓝色, 而野生型植株为白色。选取 PCR 和 GUS 双重检测为阳性株系的叶片提取 RNA 并反转录为 cDNA, 然后采用荧光定量 RT-PCR 计算各株系 *PtrCHLP3* 的相对表达情况。以 *Actin* 为内参设计一对引物 *PtrActin-F*(序列如 SEQ ID NO .10 所示) 和 *PtrActin-R*(序列如 SEQ ID NO .11 所示), 再设计一对 *PtrCHLP3*-ORF 区的特异引物 *CHLP3-F*(序列如 SEQ ID NO .8 所示)和 *CHLP3-R*(序列如 SEQ ID NO .9 所示)。按照荧光定量试剂盒(TransScript® Top Green qPCR SuperMix 建立扩增体系, 扩增条件: 94℃ 30s, 40cycles(94℃ 5sec, 60℃ 15s, 72℃ 10s)。每个样品重复 3 次, 根据数据分析得到各个样品的 CT 值, 计算各转基因株系及野生型的 *PtrCHLP3* 相对表达情况。检测结果如图 4 中 d 图所示, 与野生型(WT)相比, 抑制表达转 *PtrCHLP3* 基因株系表达量均降低, 尤其在株系 L3 和 L4 中 *PtrCHLP3* 的表达受到显著抑制。证实内源基因 *PtrCHLP3* 已经转入 84K 杨基因组中并得到抑制表达的结果。

5.转基因株系表型的测量记录统计

对转基因阳性株系的叶片颜色和叶绿素分析(图 5): 与野生型相比, *chlp3* 和 *chlp4* 的叶片颜色明显变黄(图 5 中的 a 图)。同时, 叶绿素含量分析表明, 转基因植株叶片中的叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量显著低于野生型植株(图 5 中的 b 图)。

对转基因阳性株系的生长过程的观察显示, 相对于对照(WT)植株, 抑制表达植株株高、地径、生长量、生物量(鲜重)、第 7-8 节间都减小(图 6)。

为了进一步研究 *PtrCHLP3* 基因对杨树生长发育的影响, 我们在正常条件下观察了 WT 和转基因杨树的 35d。表型分析表明, 与野生型杨树相比, 转基因杨树的地上部分高度和根长均受到显著抑制(图 6 中 a 图)。随着生长时间的延

长，WT 的株高和茎的伸长率均显著高于转基因植株(图 6 中 b 图和 d 图)。此外，转基因杨树的根、茎和叶的鲜重显著低于野生型，并分别相应降低了 30-75%、42-84%和 46-82%(图 6 中 c 图)。与野生型相比，转基因植株的茎径明显更小(图 6 中 e 图)。

为了进一步了解 PtrCHLP3 对杨树茎部厚度的影响，我们采用甲苯胺蓝和间苯三酚-hcl 对 WT 和 chlp 植株第 8 节间的横断面进行了染色(图 6 中 f-k 图)。间氯苯三酚-HCl 染色观察细胞壁中的木质素（红紫）。在野生型和转基因植物中，我们观察到木质素在木质部、韧皮部纤维和髓部细胞中的沉积没有差异(图 6 中 g、i 和 k 图)。转基因杨树的韧皮部和木质部的宽度明显小于野生型。此外，与野生型相比，茎中转基因木质部的比例显著降低(图 6 中 I 图)。然而，转基因茎和野生型茎之间的树皮比例没有显著差异。与之前的结果一致，对次生木质部细胞层的定量分析显示，转基因植株的木质部细胞层明显小于 WT(图 6 中 m 图)。这些结果表明，抑制 PtrCHLP3 的表达可以抑制杨树木质部的扩张。综上所述，PtrCHLP3 在调控杨树生长中起着非常重要的作用。

本发明中所用引物的序列如表 1 所示：

表 1 引物

序列名称	名称	序列
Primers are used to construct vectors		
SEQ ID NO .2	<i>PtrCHLP3-F1</i>	CCAGCAAGTCTAGTCC F GA
SEQ ID NO .3	<i>PtrCHLP3-R1</i>	CTTCCCATCATACTCA R GT
SEQ ID NO .4	<i>PtrCHLP3-F2</i>	CTTCCCATCATACTCA F GT

说明书

SEQ ID NO .5	<i>PtrCHLP3-R2</i>	R CCAGCAAGTCTAGTCC GA
Primers were used for PCR		
SEQ ID NO .6	<i>35S-F</i>	F GACGCACAATCCCACT ATCC
SEQ ID NO .7	<i>RTM-R</i>	R TCTATCTGCTGGGTCC AAATC
Primers were used for RT-PCR detection		
SEQ ID NO .8	<i>CHLP3-F</i>	F AAACCGCAACCTCCGA GTAG
SEQ ID NO .9	<i>CHLP3-R</i>	R ACTCACCCACCATGCA CAAA
SEQ ID NO .10	<i>PtrActin-F</i>	F CCCATTGAGCACGGTA TTGT
SEQ ID NO .11	<i>PtrActin-R</i>	R TACGACCACTGGCATA CAGG

综上所述，本发明采用转基因技术，将包含 *PtrCHLP3* 基因的部分片段的载体整合到杨树基因组中，初步定向改变杨树生长速率和叶片颜色特征。*PtrCHLP3* 基因抑制表达能够减慢植株生长，使株高减少，茎部变细，叶片颜色变黄等，为利用基因工程技术初步选育杨树新品种提供了新方法。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变

形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。