

## 基于 cas9/gRNA 创制毛果杨 *PtrFLA31/34* 突变体

位 珍 程玉祥 夏德安\*

(东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室 哈尔滨 150040)

**摘 要** 束状阿拉伯半乳聚糖蛋白(FLA)对植物生长发育都起着重要作用。基于生物信息学分析,我们识别毛果杨 FLA 家族有 46 个成员,进化分析显示毛果杨 FLA 家族分为 A、B、C、D 4 个亚族,且 *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 处在进化树的一个小分支。半定量 RT-PCR 分析表明 *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 在毛果杨木质组织特异性、高水平表达。为了鉴定 *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 在木材形成上的功能,我们用 Cas9/gRNA 技术敲除 *PtrFLA31/34*,获得 3 株毛果杨 *fla31/34* 敲除双基因突变体材料。

**关键词** 毛果杨 *PtrFLA* 基因突变体 Cas9/gRNA

中图分类号 S792.11 文献标志码 A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2018.05.014

## Cas9/gRNA-mediated Targeted *PtrFLA31/34* Gene Mutation in *Populus*

WEI Zhen CHENG Yu-Xiang XIA De-An\*

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

**Abstract** Fasciclin-like arabinogalactan proteins (FLAs) play important roles in growth and development of plants. Based on bioinformatic analysis, we identified 46 FLAs in *Populus trichocarpa*. By phylogenetic analysis, *Populus* FLA family was classified into four Sub-groups (A-D) and *PtrFLA31* and *PtrFLA34* were in same small branch of the tree. By semi-quantitative RT-PCR analysis, *PtrFLA31* and *PtrFLA34* were specifically expressed in xylem on the high transcriptional level. In order to study their functions in wood formation, we knocked out *PtrFLA31/34* double genes via Cas9/gRNA, and obtained three *fla31/34* double mutants.

**Key words** *Populus trichocarpa* *PtrFLA* mutant Cas9/gRNA

束状阿拉伯半乳聚糖蛋白(fasciclin-like arabinogalactan proteins, FLA)是阿拉伯半乳聚糖蛋白(arabinogalactan proteins, AGPs)的一个亚家族,在植物根、茎、种子生长发育中起着重要作用。同时拥有 fasciclin 结构域和 AGP-like 糖基化区域的氨基酸特征序列,被认为是 FLA 家族成员, fasciclin 结构域约有 110 个氨基酸,但其分子功能还不清楚<sup>[1]</sup>。根据结构域的不同, FLA 被分成 4 个亚类(A-D),其中 A 类包含一个 fasciclin 结构域,其两边有 AGP 糖基化区域<sup>[2]</sup>。一些研究表明这个亚类 FLA 介入植物次生细胞壁功能:杨树 *PopFLA1-10* 表达水平被受到的张力及压力调控<sup>[3]</sup>;拟南芥

*AtFLA11* 和 *AtFLA12* 参与次生壁沉积<sup>[4-6]</sup>, *AtFLA11/12* 双突变体茎硬度和韧性均降低且微纤丝角增加<sup>[7]</sup>;百日菊 *ZeFLA11* 特异性表达在其木质部组织<sup>[8]</sup>;过表达桉树 FLA 导致转基因植株细胞壁糖含量中木糖和果糖比例发生变化<sup>[9]</sup>。然而,树木 FLA 基因敲除的表型,却是值得关注或探究的。

树木遗传杂合度高、多伴进行异交,传统的基因突变方法或策略很难应用于林木,导致无林木纯合突变体应用于其基因功能鉴定。Cas9/gRNA 基因组定点编辑技术,通过单链导向 RNA(single guide RNA, gRNA)来识别目标 DNA 序列,引导核酸酶 Cas9 剪切目标 DNA 双链、产生核酸编辑<sup>[10]</sup>,

基金项目:国家自然科学基金(31570580)

第一作者简介:位珍(1991-),女,硕士,主要从事林木次生生长研究。

\* 通信作者 E-mail: xiadean@126.com

收稿日期:2017-12-27

Foundation item: National 863 project(31570580)

First author introduction: WEI Zhen(1991-), female, master, mainly engaged in tree secondary growth.

\* Corresponding author E-mail: xiadean@126.com

Received date: 2017-12-27

这一技术恰好避开了传统方法制作林木纯合突变体所遇的障碍。目前,Cas9/gRNA 已经应用于拟南芥、大豆、烟草、玉米等植物基因组编辑<sup>[11~14]</sup>,然而模式木本植物—毛果杨中该技术应用还未见报道。

本研究中我们通过生物信息学方法识别毛果杨 *PtrFLA* 基因家族,进化树分析表明 *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 属于 FLA 的 A 亚族,且共同位列在进化树的一个小分支上。基于 Cas9/gRNA 技术,我们制备出 *PtrFLA31/34* 双基因突变体材料,为进一步鉴定该基因功能奠定前提。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

温室里栽培的 3 个月的毛果杨(*Populus trichocarpa*)幼树用于基因表达分析,1 个月的无菌组培幼苗用于遗传转化实验。

植物总 RNA 提取试剂 pBIOZOL Reagent (Bioflux),植物基因组 DNA 快速提取试剂 (Bioteke),cDNA 合成用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA eraser(Takara),高保真 DNA 聚合酶为 KOD-Plus(Toyobo),胶内 DNA 采用 Silica Bead DNA Gel Extretion Kit(Thermo Scientific)回收。质粒采用 E. A. N. A Plasmid Mini Kit(Omega)提取,基因引物合成以及 DNA 测序由 Invitrogen 公司完成。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 毛果杨 *PtrFLAs* 家族成员识别

分别以 21 个拟南芥 FLA 家族成员氨基酸序列,在毛果杨基因组数据库 Phytozome 12.0 中进行同源性检索,并结合 fasciclin 和 fasciclin-like 关键词检索,去除重复基因后对所有潜在的 FLA 成员用 SMART<sup>[15]</sup> 确认存在 fasciclin 结构域

(SM00554)。对识别出的 FLA 家族成员,用 SignalP 4.1<sup>[16]</sup>预测成员 N 端是否有信号肽,手动分析 AGP-like 糖基化区域。用 MEGA 软件构建拟南芥和毛果杨 *FLA* 家族成员的进化树。

#### 1.2.2 植物总 RNA 分离、总 cDNA 合成和基因组 DNA 提取

各个组织茎节的总 RNA 提取参照试剂盒提取步骤进行,植物总 RNA 用反转录试剂盒进一步合成 cDNA,基因组 DNA 提取采用一步法提取。

#### 1.2.3 植物靶基因编辑载体构建

用高保真 DNA 聚合酶 KOD-plus 扩增 *PtrFLA31/34* 靶位点的 gRNA 片段,片段胶内回收后在核酸内切酶 *Bsa* I 和高浓度 DNA 连接酶作用下,连接到植物基因编辑载体 pHSE401<sup>[17]</sup>。连接产物转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,经 Kana 抗性筛选后得到含 pHSE401-gRNA 重组质粒菌液,DNA 测序确认重组质粒正确。提取质粒后转入 GV3101 农杆菌,用于毛果杨遗传转化实验。

#### 1.2.4 毛果杨遗传转化及转基因植株鉴定

取 25~35 d 生长状况良好的毛果杨作为遗传转化材料,采用农杆菌介导法进行毛果杨转基因<sup>[18]</sup>。取转基因植株的少量叶片,提取基因组 DNA 后用作模板,用 DT1-F0/DT2-R0 和 zCas-U/D 引物进行 PCR 扩增鉴定转入的 gRNA 和 Cas9 基因。

#### 1.2.5 转基因植株体内靶基因位点编辑鉴定

取转基因植株基因组 DNA 作模板,以 FLA31-U/D 及 FLA34-U/D 引物,进行覆盖靶位点片段的 PCR 扩增。片段从胶内回收后连接到 pMD18-T 载体,将连接产物取 3  $\mu$ L 转入 DH5 $\alpha$  大肠杆菌,氨苄抗性筛选获得阳性菌液进行插入 DNA 的测序。与野生型比对测序结果,统计靶基因位点编辑情况,所用引物及序列(表 1)。

表 1 所用引物及序列  
Table 1 Primer sequences used in this study

基因 Gene	用途 Usage	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences(5'-3')
<i>PtrFLA31</i>	半定量 PCR Semi-quantitative PCR	<i>PtrFLA31</i> -RT	ATTGAGGAAGTAGTCACTGTGTTC ;GATGGTGCTGTGAGGAGTCTG
<i>PtrFLA34</i>	半定量 PCR Semi-quantitative PCR	<i>PtrFLA34</i> -RT	AGGAGGTGAGGAGTAAGTATTCC ;GATGATACACAGCAATGCCCTG
<i>PtrFLA31/34</i>	靶位点 gRNA Target Site gRNA	DT1-BsF	ATATATGGTCTCGATTGCGCTAAATGACTCAAGCCCGTT
		DT1-F0	TGCGCTAAATGACTCAAGCCCGTTTAGAGCTAGAAATAGC
		DT2-R0	AACCCATTGTCCCAATACCTTTGCCCAATCTCTTAGTCGACTCTAC
		DT2-BsR	ATTATTGGTCTCTAAACCCATTGTCCCAATACCTTTGCCC
<i>PtrFLA31/34</i>	位点编辑鉴定 Identification of site editing	FLA31-U/D	TAACCTTGATCCTCTGCTCACAAC ;GTCTGTGTATACGGTGCCAGAT
		FLA34-U/D	TATTGCACCTAACTATATAACCTC ;GGCTAGTTGTTGTCTGTGTATA
<i>zCas</i>	转基因鉴定 Transgene confirmation	<i>zCas</i> -U/D	TGAGAACATCGTCATTGAGATGG ;CAGCTTGTCATTCTCATCGTACT

表 2 毛果杨 FLA 家族成员

Table 2 *PtrFLA* family genes in *P. trichocarpa*

基因名 Name	基因 ID Gene ID	蛋白长度 Protein length( aa )	Fas 个数 FAS number	信号肽 Signal peptide	基因名 Name	基因 ID Gene ID	蛋白长度 Protein length( aa )	Fas 个数 FAS number	信号肽 Signal peptide
<i>PtrFLA1</i>	Potri. 001G320800	243	1	Y	<i>PtrFLA24</i>	Potri. 015G129400	240	1	Y
<i>PtrFLA2</i>	Potri. 001G367900	406	2	Y	<i>PtrFLA25</i>	Potri. 016G066500	466	2	Y
<i>PtrFLA3</i>	Potri. 002G223300	263	1	Y	<i>PtrFLA26</i>	Potri. 016G088700	239	1	Y
<i>PtrFLA4</i>	Potri. 004G210600	268	1	Y	<i>PtrFLA27</i>	Potri. 017G111600	352	2	Y
<i>PtrFLA5</i>	Potri. 005G079500	442	1	Y	<i>PtrFLA28</i>	Potri. 019G002300	283	1	Y
<i>PtrFLA6</i>	Potri. 006G129200	239	1	Y	<i>PtrFLA29</i>	Potri. 019G049600	252	1	Y
<i>PtrFLA7</i>	Potri. 006G200300	466	2	Y	<i>PtrFLA30</i>	Potri. 019G093300	245	1	Y
<i>PtrFLA8</i>	Potri. 008G012400	463	2	Y	<i>PtrFLA31</i>	Potri. 019G120900	227	1	Y
<i>PtrFLA9</i>	Potri. 009G012100	263	1	Y	<i>PtrFLA32</i>	Potri. 019G121100	262	1	Y
<i>PtrFLA10</i>	Potri. 009G012200	269	1	Y	<i>PtrFLA33</i>	Potri. 019G121200	263	1	Y
<i>PtrFLA11</i>	Potri. 010G244900	459	2	Y	<i>PtrFLA34</i>	Potri. 019G122800	252	1	Y
<i>PtrFLA12</i>	Potri. 011G093500	408	2	Y	<i>PtrFLA35</i>	Potri. 019G123200	263	1	Y
<i>PtrFLA13</i>	Potri. 012G015000	269	1	Y	<i>PtrFLA36</i>	Potri. 019G123100	263	1	Y
<i>PtrFLA14</i>	Potri. 012G127900	240	1	Y	<i>PtrFLA37</i>	Potri. 019G123000	269	1	Y
<i>PtrFLA15</i>	Potri. 013G014200	266	1	Y	<i>PtrFLA38</i>	Potri. 019G122600	215	1	N
<i>PtrFLA16</i>	Potri. 013G120600	238	1	Y	<i>PtrFLA39</i>	Potri. 019G120800	214	1	N
<i>PtrFLA17</i>	Potri. 013G151300	269	1	Y	<i>PtrFLA40</i>	Potri. 008G127500	292	1	Y
<i>PtrFLA18</i>	Potri. 013G151400	269	1	Y	<i>PtrFLA41</i>	Potri. 001G037800	281	1	Y
<i>PtrFLA19</i>	Potri. 013G151500	264	1	Y	<i>PtrFLA42</i>	Potri. 013G152200	353	1	N
<i>PtrFLA20</i>	Potri. 014G071700	421	1	Y	<i>PtrFLA43</i>	Potri. T118500	210	1	N
<i>PtrFLA21</i>	Potri. 014G162900	262	1	Y	<i>PtrFLA44</i>	Potri. 019G008400	361	1	N
<i>PtrFLA22</i>	Potri. 014G168100	397	2	Y	<i>PtrFLA45</i>	Potri. 018G097000	427	1	N
<i>PtrFLA23</i>	Potri. 015G013300	267	1	Y	<i>PtrFLA46</i>	Potri. 006G174900	426	1	N

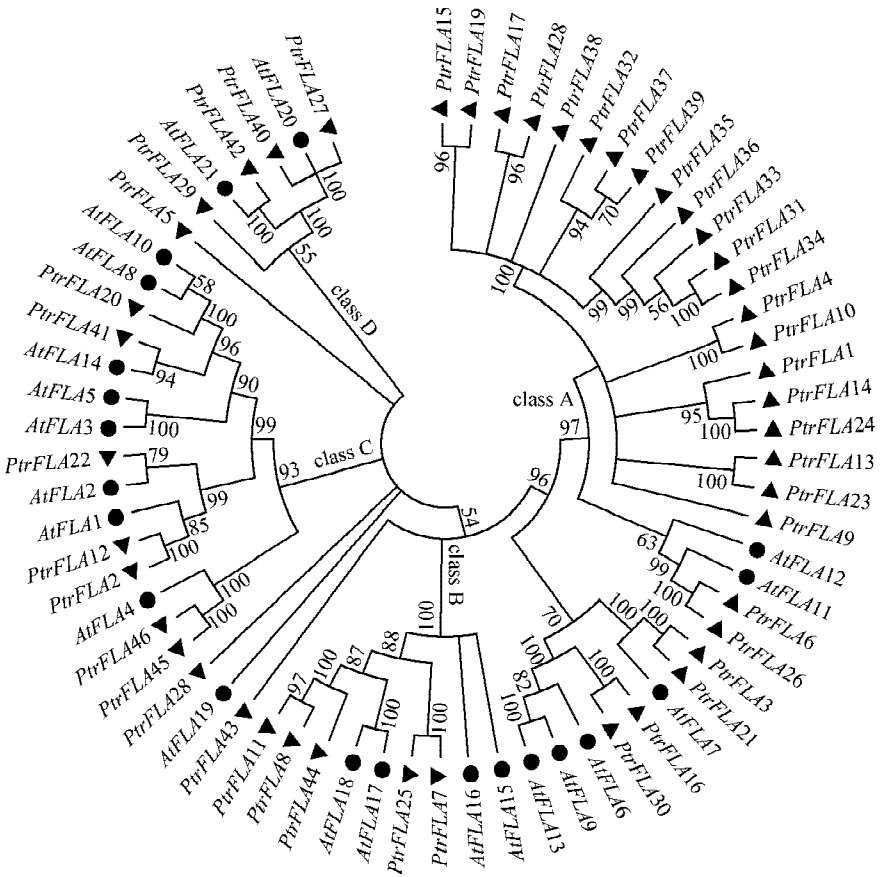


图 1 毛果杨和拟南芥 *FLA* 基因进化分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of *FLAs* from *Arabidopsis thaliana* and *P. trichocarpa*

## 2 结果与分析

### 2.1 杨树 *FLA* 家族识别

用生物信息学方法我们从毛果杨基因组上鉴定出 46 个 *FLA* 家族成员(表 2),命名为 *PtrFLA1* 到 *PtrFLA46*。在这 46 个 *PtrFLA* 家族成员中,其推测氨基酸长度从 214 到 466 个。39 个 *PtrFLA* 成员预测有信号肽,38 个成员有 1 个 Fas 结构域,8 个成员有 2 个 Fas 结构域。

为了分析 *PtrFLA* 家族成员的同源关系,构建了 21 个拟南芥 *AtFLA* 和 46 个毛果杨 *PtrFLA* 进化树(图 1)。进化树表明毛果杨 *FLA* 家族成员分处在 4 个亚类上(A、B、C 和 D),其中 A 亚类包含了毛果杨 *FLA* 家族的大多数成员(27 个),比另外 3 个亚类(分别为 6、6、7 个)的总数还多。此外,拟南芥 A 亚类 *FLA* 却只有 6 个成员,暗示这些基因可能参与木本植物高度发达的次生生长相关。

### 2.2 *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 基因组织转录表达

提取野生型毛果杨木质部、韧皮部、根、顶芽、叶柄、幼叶、老叶以及第 1 至 10 茎节的总 RNA,经反转录合成了总 cDNA。在用 *Actin2* 内标基因对各组织总 cDNA 定量后,*PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 基因半定量 RT-PCR 结果表明,*PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 均在木质部高丰度转录表达,在韧皮部也有一定的表达水平,而根、顶芽、叶柄、幼叶和老叶内几乎不表达(图 2)。此外,第 1、2 茎节中 *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 转录量极低,从第 3 至 6 节转录量表达逐渐增加,第 7 至 10 节维持在较高的表达水平(图 2)。

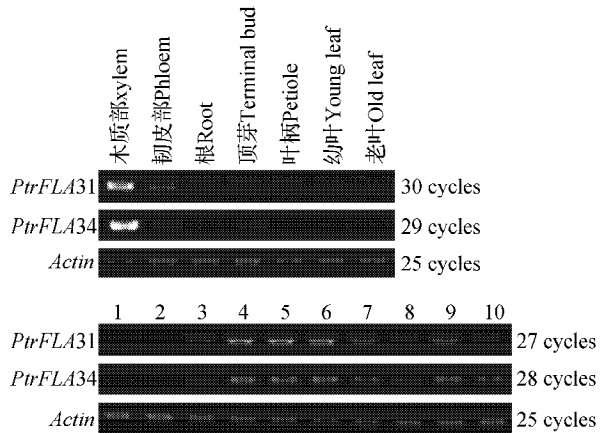


图 2 *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 的组织表达分析 1~10。第 1~10 茎间  
Fig. 2 Analysis of *PtrFLA31* and *PtrFLA34* gene expression in *Populus* 1~10. Internodes 1~10

### 2.3 *PtrFLA31/34* 基因 *Cas9*/gRNA 载体构建

*PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 在进化树的一个小分支,且两者氨基酸序列一致性达 86.9%,显示这两个基因功能可能存在冗余。为了鉴定其敲除的功能,我们采用 *Cas9*/gRNA 编辑技术敲除 *PtrFLA31/34* 基因。先设计 2 个 *PtrFLA31/34* 基因特异靶位点的 gRNA(图 3a),*T1-PtrFLA31/34*(gRNA)针对 *PtrFLA31/34* 基因,而 *T2-PtrFLA34*(gRNA)仅针对 *PtrFLA34*。经 PCR 扩增出含这 2 个 gRNA 的片段,在酶切后连接到植物基因编辑载体 pHSE401(图 3b)。将构建的 pHSE401-*PtrFLA31/34*(gRNA)载体进行 DNA 测序,确认 *Cas9*/gRNA 载体构建成功。

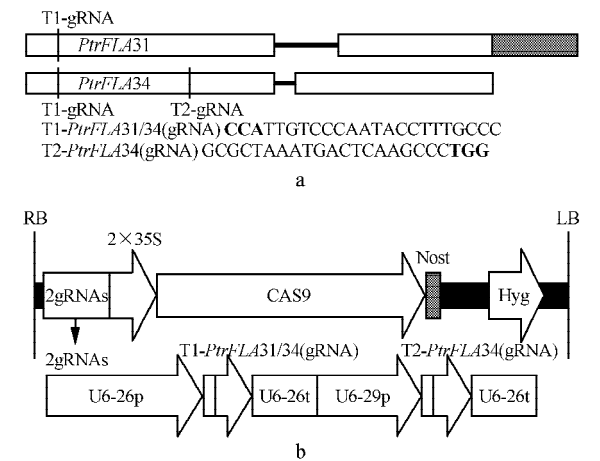
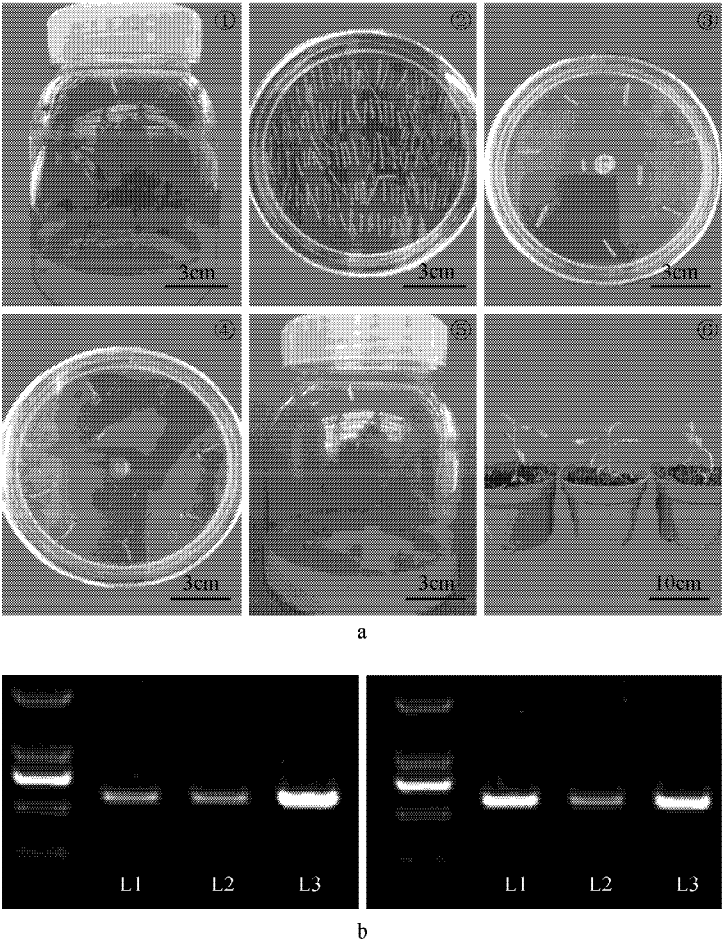


图 3 pHSE401-*PtrFLA31/34*(gRNA)载体构建 a. 靶点位置及序列 b. CRISPR/Cas9 植物基因编辑载体  
Fig. 3 Construction of pHSE401-*PtrFLA31/34*(gRNA) a. Position and sequence of target site; b. Physical map of CRISPR/Cas9 vectors

### 2.4 pHSE401-*PtrFLA31/34*(gRNA)转基因杨树及分子鉴定

选择生长至一个月的无菌组培幼苗(图 4a①),切取第 2 至 4 茎节成 1 cm 茎段,农杆菌侵染转化后茎段暗室培养 48 h(图 4a②),脱菌清洗后放入选择培养基(图 4a③),培养 30 d 后愈伤组织分化出抗性芽(图 4a④),转移到生根培养基继续培养(图 4a⑤),等抗性芽长至 3~5 cm 盆栽到土壤中(图 4a⑥)。实验得到 3 棵转基因植株(L1、L2 和 L3),分别提取这三棵转基因植株基因组 DNA,PCR 扩增 *Cas9* 和 gRNA 这 2 个目标基因,结果表明该基因已经转入到毛果杨基因组上(图 4b)。



**图 4 转 pHSE401-PtrFLA31/34( gRNA )基因杨树制备及分子鉴定** a. 杨树转基因过程简图 ①毛果杨无菌组培幼苗 ;②转化后 48 h 共培养茎段 ;③转化后筛选培养基的茎段 ;④长出转基因抗性芽的茎段( 箭头所示 ) ;⑤抗性植株的生根 ;⑥转基因植株盆栽 b. 转基因植株分子鉴定

**Fig.4 Transformation of pHSE401-PtrFLA31/34( gRNA ) in *Populus* and its molecular determination** a. Transgenic process of pHSE401-PtrFLA31/34( gRNA ) in *Populus* : ①Young plantlets of tissue culture ;②Cocultured stem segments after transformation ;③The stem segments in selective medium ;④Hygromycin-resistant shoots( arrows ) ;⑤Hygromycin-resistant plants on rooting medium ;⑥Transgenic plants on soil b. Molecular determination of transgenic plants

2.5 *PtrFLA31/34* 基因靶位点编辑分析

*PtrFLA31/34* 基因位点编辑结果如图 5a 所示 ,对于 T1-*PtrFLA31/34*( gRNA ) L1 和 L3 转基因植株 *PtrFLA31* 基因靶位点被编辑、减少 1 个 T 碱基 ,L2 中 *PtrFLA31* 靶位点减少 2 个 T 碱基。*PtrFLA34* 靶位点在 L1 和 L2 中也被编辑减少 1 个 T 碱基 ,而 L3 中 *PtrFLA34* 呈现双等位编辑 ,分别增加和减少 1 个 T。对于 T2-*PtrFLA34*( gRNA ) ,L1 和 L2 植株体内 *PtrFLA34* 靶位点分别被减少 199 和 20 个碱基 ,而 L3 植株体内 *PtrFLA34* 靶位点未被编辑。分析 *PtrFLA31/34* 基因两个靶位点编辑后的序列 ,推测其氨基酸结果如图 5b 所示 ,因移码而产生目标基因编码的终止子提前出现 ,导致了 L1、L2 和 L3 体内 *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 均被敲

除 ,形成了 *fla31/34* 双基因突变体。

3 讨论

随着植物基因组资源增多 ,多个植物 FLA 基因家族被识别报道 ,如 :拟南芥、水稻和棉花分别有 21、24 和 19 个 *FLA* 基因<sup>[ 2 ,19 ~20 ]</sup>。我们从毛果杨中识别出 46 个 *PtrFLA* 基因( 表 1 ) ,基因数量明显比已报道的草本植物 *FLA* 的多 ,这暗示林木 *FLA* 基因家族产生了显著扩张。FLA 是植物细胞壁的成分蛋白 ,这种基因数量的扩张很可能是满足树木从草本进化成本本植物的需要 ,因为树木进化出高度发达的次生壁组织。我们进化树分析进一步表明毛果杨 *FLA* 家族成员同样分为 4 个亚类( 图 1 ) ,与草本植物 *FLA* 分类相同。然而 ,引人

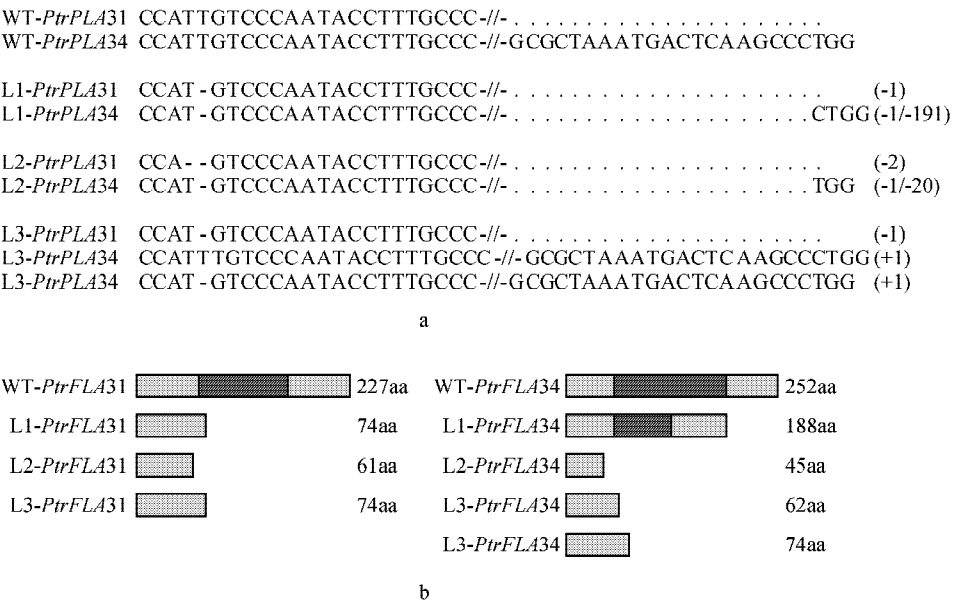


图5 *PtrFLA31/34* 基因编辑分析 a. *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 的编辑情况 b. *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 基因编辑后推测氨基酸

Fig.5 Analysis of *PtrFLA31/34* gene editing in transgenic *Populus* a. *PtrFLA31* and *PtrFLA34* gene editing identified from the cloned PCR fragments ; b. The presumed amino acids of *PtrFLA31* and *PtrFLA34* after editing

关注是 *PtrFLA* 家族 A 亚类包含 27 个基因 ,约占其整个家族成员的一半 ,这种基因扩张可能与毛果杨某种生长性状(例如发达的次生壁组织)密不可分。

FLA 作为一种植物细胞壁蛋白参与植物细胞伸长、感应外界环境因子信号等 ,而 *AtFLA11* 和 *AtFLA12* 已被报道与植物次生壁形成相关<sup>[7]</sup>。在本研究中我们通过基因转录表达分析确定 *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 主要在毛果杨次生长发达的组织内高丰度表达 ,如茎节和木质部(图 2) ,这个结果提示此亚类 FLA 成员很可能参与杨树木材的生长和发育。有一个研究报道 ,在桉树 FLA 家族中 A 亚类的 3 个成员 *EniFLA1/2/3* 也在木质部高丰度表达<sup>[6]</sup>。然而 *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 在木材形成上的功能 ,需要利用其突变体来准确鉴定。

Cas9/gRNA 植物基因组编辑技术已应用在多个植物物种 ,包括 :拟南芥、大豆、烟草、玉米等<sup>[11~14]</sup> ,对林木物种来说 ,非常适合应用 Cas9/gRNA 基因编辑技术帮助鉴定其基因功能和辅助分子育种 ,然而这方面的研究报道甚少。本研究中我们创建模式树毛果杨的 Cas9/gRNA 基因编辑技术体系 ,尝试并实现了对毛果杨 *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 双基因同时编辑(图 5) 。编辑后的 *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 基因序列产生终止子提前 ,形

成这两基因被敲除的双突变体。Cas9/gRNA 技术在毛果杨中被有效的建立 ,解决了用传统方法几乎很难制作林木基因突变体的困境 ,这个技术将加速林木功能基因组鉴定的进展。此外 ,我们获得的 3 株毛果杨 *fla31/34* 敲除突变体 ,为下一步深入研究 *PtrFLA31* 和 *PtrFLA34* 基因功能提供了遗传材料。

参 考 文 献

1. Moody R G ,Williamson M P. Structure and function of a bacterial Fasciclin I domain protein elucidates function of related cell adhesion proteins such as TGFBIp and perostin[ J ]. FEBS Open Biology 2013 ,3( 1 ) :71 - 77.

2. Johnson K L ,Jones B J ,Bacic A ,et al. The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis*. A multigene family of putative cell adhesion molecules[ J ]. Plant Physiology , 2003 ,133( 4 ) :1911 - 1925.

3. Lafarguette F ,Leplé J C ,Déjardin A ,et al. Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood[ J ]. New Phytologist 2004 ,164 ( 1 ) :107 - 121.

4. Brown D M ,Zeef L A H ,Ellis J ,et al. Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics[ J ]. The Plant Cell 2005 ,17( 8 ) :2281 - 2295.

5. Ito S ,Suzuki Y ,Miyamoto K ,et al. AtFLA11 ,a fasciclin-

- like arabinogalactan-protein ,specifically localized in screlenchyma cells[ J ]. Bioscience ,Biotechnology ,and Biochemistry 2005 ,69( 10 ) :1963 – 1969.
6. Persson S ,Wei H R ,Milne J ,et al. Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets[ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , 2005 ,102( 24 ) :8633 – 8638.
7. Macmillan C P ,Mansfield S D ,Stachurski Z H ,et al. Fasciclin-like arabinogalactan proteins :specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*[ J ]. The Plant Journal ,2010 ,62( 4 ) :689 – 703.
8. Dahiya P ,Findlay K ,Roberts K ,et al. A fasciclin-domain containing gene *ZeFLA11* is expressed exclusively in xylem elements that have reticulate wall thickenings in the stem vascular system of *Zinnia elegans* cv Envy[ J ]. Planta 2006 223( 6 ) :1281 – 1291.
9. Macmillan C P ,Taylor L ,Bi Y D ,et al. The fasciclin-like arabinogalactan protein family of *Eucalyptus grandis* contains members that impact wood biology and biomechanics [ J ]. New Phytologist 2015 206( 4 ) :1314 – 1327.
10. Deltcheva E ,Chylinski K ,Sharma C M ,et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III[ J ]. Nature 2011 471( 7340 ) :602 – 607.
11. Li J F ,Norville J E ,McCormack M ,et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9[ J ]. Nature Biotechnology 2013 31( 8 ) :688 – 691.
12. Jacobs T B ,Lafayette P R ,Schmitz R J ,et al. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9[ J ]. BMC Biotechnology 2015 ,15 :16.
13. Baltes N J ,Gil-Humanes J ,Cermak T ,et al. DNA replicons for plant genome engineering[ J ]. The Plant Cell 2014 26( 1 ) :151 – 163.
14. Liang Z ,Zhang K ,Chen K L ,et al. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system[ J ]. Journal of Genetics and Genomics 2014 41( 2 ) :63 – 68.
15. Letunic I ,Doerks T ,Bork P. SMART 7 :Recent updates to the protein domain annotation resource[ J ]. Nucleic Acids Research 2012 40 :D302 – D305.
16. Petersen T N ,Brunak S ,Von Heijne G ,et al. SignalP 4.0 : discriminating signal peptides from transmembrane regions [ J ]. Nature Methods 2011 8( 10 ) :785 – 786.
17. Xing H L ,Dong L ,Wang Z P ,et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants[ J ]. BMC Plant Biology 2014 ,14 :327.
18. Li S J ,Zhen C ,Xu W J ,et al. Simple ,rapid and efficient transformation of genotype Nisqually-1 :a basic tool for the first sequenced model tree[ J ]. Scientific Reports 2017 7 :2638.
19. Faik A ,Abouzouhair J ,Sarhan F. Putative fasciclin-like arabinogalactan-proteins ( FLA ) in wheat ( *Triticum aestivum* ) and rice ( *Oryza sativa* ) :identification and bioinformatic analyses[ J ]. Molecular Genetics and Genomics , 2006 276( 5 ) :478 – 494.
20. Huang G Q ,Xu W L ,Gong S Y ,et al. Characterization of 19 novel cotton *FLA* genes and their expression profiling in fiber development and in response to phytohormones and salt stress[ J ]. Physiologia Plantarum 2008 ,134( 2 ) :348 – 359.