

DOI:10.12171/j.1000-1522.20240021

基于转基因 741 杨与新疆杨杂交创制抗虫 非整倍体毛白杨新种质

齐婉芯 陈婷婷 宋佳力 安新民

(北京林业大学生物科学与技术学院, 林木遗传育种国家重点实验室, 林木育种与生态修复国家工程中心, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 树木花卉育种生物工程国家林业和草原局重点实验室, 北京 100083)

摘要:【目的】以转 *BtCry3A* 基因三倍体 741 杨为母本与二倍体新疆杨为父本进行人工杂交, 以期快速获得非整倍体毛白杨抗虫优良新种质。【方法】采集转基因 741 杨雌花枝、新疆杨雄花枝进行人工授粉杂交, 收集即将脱落的花序, 通过胚挽救技术获得杂交子代。通过聚合酶链式反应 (PCR) 检测杂交子代是否含有 *BtCry3A* 基因; 通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 对 *BtCry3A* 基因在母本与子代中的表达量进行分析。以二倍体新疆杨为参照, 通过流式细胞技术检测杂交子代的倍性; 并对子代幼苗表型进行初步观测分析。【结果】(1) 通过对未发育成熟种子进行胚挽救获得 8 个杂交子代, 其中 6 个杂交子代后续生长状态良好, 5 个子代遗传了母本的 *BtCry3A* 基因。(2) RT-qPCR 检测显示, *BtCry3A* 基因在 5 个子代中的表达量均高于母本, 其中 3# 表达量为母本 12 倍; (3) 初步判定子代 1# 为超四倍体, 子代 2#、4#、8# 为非整倍体, 子代 3# 可能为非整倍体或四倍体; (4) 杂交子代表型差异大, 5 个杂交子代叶形、叶片大小、节间距等均不相同, 其中 3# 和 8# 生长势优于亲本。【结论】通过转 *BtCry3A* 基因三倍体 741 杨与二倍体新疆杨杂交, 快速获得了具有 *BtCry3A* 抗虫基因且发生形态变异的非整倍体毛白杨新种质, 其中子代 3# 因抗虫基因表达量显著高于母本, 且生长势优于双亲, 可作为优良潜在非整倍体毛白杨新种质进行后续抗虫性测试。

关键词: 毛白杨; 抗虫; 人工杂交; 非整倍体; 新种质创制

中图分类号: S722.3⁺4; S792.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2024)12-0092-11

引文格式: 齐婉芯, 陈婷婷, 宋佳力, 等. 基于转基因 741 杨与新疆杨杂交创制抗虫非整倍体毛白杨新种质 [J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(12): 92-102. Qi Wanxin, Chen Tingting, Song Jiali, et al. Creating a new germplasm of aneuploid *Populus tomentosa* with insect-resistance based on hybridization of transgenic 741 poplar and *P. alba* var. *pyramidalis* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(12): 92-102.

Creating a new germplasm of aneuploid *Populus tomentosa* with insect-resistance based on hybridization of transgenic 741 poplar and *P. alba* var. *pyramidalis*

Qi Wanxin Chen Tingting Song Jiali An Xinmin

(School of Biological Sciences and Biotechnology, State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, National Engineering Research Center of Tree Breeding and Ecological Restoration, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of National Forestry and Grassland Administration, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] Artificial hybridization was carried out using transgenic triploid 741 poplar with *BtCry3A* as the female parent and diploid *Populus alba* var. *pyramidalis* as the male parent, in order to quickly obtain new germplasm of aneuploid *Populus tomentosa* with insect-resistance. [Method] Collecting

收稿日期: 2024-01-17 修回日期: 2024-05-18

基金项目: 科技创新 2030-重大项目课题 (2022ZD0401503)。

第一作者: 齐婉芯, 博士。主要研究方向: 杨树遗传改良。Email: qsaturn@bjfu.edu.cn 地址: 100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者: 安新民, 博士, 教授。主要研究方向: 林木基因组学与分子育种。Email: anxinmin@bjfu.edu.cn 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

female flower branches of transgenic 741 poplar and male flower branches of *P. alba* var. *pyramidalis*, hybrid progenies were obtained by embryo rescue technique from the inflorescence that was about to fall off. The seedlings with *BtCry3A* were identified by polymerase chain reaction, and further expression of *BtCry3A* was measured via real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction. Subsequently, conducted ploidy analysis of these hybrid progenies using flow cytometry method. Finally, preliminary phenotypic analysis of the offsprings was performed. [Result] (1) Eight hybrid individuals were successfully generated by combing artificial hybridization and embryo rescue techniques, among which six hybrid offsprings showed good growth status. Five offsprings inherited the *BtCry3A* gene from the mother plants. (2) The *BtCry3A* gene exhibited enhanced expression levels in the offsprings compared with maternal parent, with individual 3# demonstrating a 12-fold increase. (3) 1# was hyper-tetraploid, 2#, 4# and 8# were aneuploid, while 3# may be aneuploid or tetraploid. (4) The hybrid offsprings exhibited diverse phenotype, the five hybrid individuals were different in leaf shape, leaf size and pitch spacing, with 3# and 8# showing superior growth vigor compared with parental lines. [Conclusion] Employing artificial hybridization between triploid 741 poplar with *BtCry3A* and diploid *P. alba* var. *pyramidalis*, we create the novel germplasms of aneuploid *P. tomentosa* with *BtCry3A* and diverse phenotypic variation. Offspring 3# has significantly higher anti-insect gene expression than their mothers, and growth potential is better than parents. It can be used as an excellent potential aneuploid hair poplar new germplasm for subsequent insect resistance tests.

Key words: *Populus tomentosa*; insect-resistance; artificial hybridization; aneuploid; new germplasm creation

杨树(*Populus* spp.)生长快、适应性强、木材用途广,在我国生态防护林和工业用材林建设中发挥着重要作用^[1]。在三北防护林工程建设初期,我国营造了大量的杨树纯林,但随之而来的是病虫害的严重威胁,尤其是天牛(Cerambycidae)的危害不断加剧^[2]。为应对林木虫害问题,转基因技术作为林业生物技术的重要一环被广泛应用于林木抗虫育种工作中。而杨树作为木本植物遗传研究模式树种,其农杆菌遗传转化应用方向已涉及抗虫、抗除草剂、抗逆、抗病、木材材性改良、激素调控、开花调控和植物修复等方面^[3]。尤其是在杨树抗虫方面,我国对于苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)抗虫毒蛋白的研究位于国际前列。在 1993 年,田颖川等^[4]首次将对鳞翅目昆虫有特异毒性的 *BtCry1Ac* 基因成功转入欧洲黑杨(*Populus nigra*)。随后几年, *BtCry1Ac* 基因被成功转入欧美杨(*P. euramericana*)^[5]、美洲黑杨(*P. deltoides*)^[6]和毛白杨(*P. tomentosa*)^[7],使不同品种杨树具有对鳞翅目昆虫的抗性。为获得抗鞘翅目的优良毛白杨品种,2007 年,甄志先等^[8]通过农杆菌介导法获得抗鞘翅目害虫的转 *BtCry3A* 抗虫基因杨树品种 741 杨的不同株系。其选择的转化受体毛白杨 741 杨是由姜慧明等^[9]以(银白杨 *P. alba* × (山杨 *P. davidiana* + 小叶杨 *P. simonii*))杂种为母本,以毛白杨为父本进行杂交,经过多年筛选最终培育出的优良毛白杨三倍体株系。2011 年,牛小云等^[10]选

择 741 杨试验林中的 6 个转 *BtCry3A* 抗虫基因株系,对外源基因整合的稳定性、可溶性蛋白和毒蛋白的表达量以及对桑天牛(*Apriona germari*)的抗虫性等进行检测。结果表明:外源基因在 6 个转基因株系基因组中稳定整合,并且 6 个株系对桑天牛幼虫的生长和成虫产卵均有一定抑制作用,其中 pCC84 株系对桑天牛幼虫的致死率达到 50%,并表现出较稳定的抗虫性。

虽然农杆菌介导的遗传转化已经在杨树中广泛应用,但该技术需要建立遗传转化和再生体系,特定基因型、不同组织和外植体类型都需要特定体系。而杨树种类繁多,不同基因型建立遗传转化体系的工作量大^[11],且转基因植物存在外源基因插入位点随机,基因表达不稳定等问题,需要经过长期田间试验评估,筛选出稳定高表达的株系,通过转基因安全评定后,才能达到推广应用的标准^[12]。为获得更丰富的抗虫杨树资源,将同一个外源基因转化到不同杨树品种这个方法耗时太长。于是,本研究选择已经通过田间试验和抗虫性测试,并获得安全证书的转 *BtCry3A* 基因稳定高表达的 741 杨 pCC84 株系作为母本,新疆杨(*P. alba* var. *pyramidalis*)作为父本进行杂交,希望通过人工杂交技术将母本基因组中的外源基因遗传给子代。

同时,由于母本 741 杨为三倍体,只有在减数分裂后期 I 均以 2:1 比例分离时,才能得到整倍性的

$2n$ 和 n 配子(n 代表 1 个染色体组中非同源染色体的数量), 其概率为 $(1/2)^{x-1}$ 左右(x 代表染色体组基数)^[13]。有研究表明, 三倍体植株由于减数时期不均等分裂, 其产生花粉的染色体数目呈正态分布, 花粉染色体数目在 $3x/2$ 时达到最大值, 仅产生少量的整倍性花粉(3% 单倍性, 2% 二倍性, 5.2% 三倍性)^[14]。所以, 三倍体产生的配子大多数为非整倍性, 极少数为整倍性; 而由三倍体与二倍体杂交得到的后代也多为非整倍体植株。在植物中, 非整倍体对发育的影响相对较小, 植物中存在的基因表达的剂量补偿机制使得植物对非整倍体有更好适应性^[15-16]。植物非整倍体不仅具有极大的遗传研究价值, 可以方便基因和分子标记的物理定位, 确定连锁群与染色体的对应关系, 有利于目标基因转移等, 具有极大的遗传研究价值; 植物非整倍体的培育也丰富了种质资源^[17]。目前, 葡萄(*Vitis* spp.)^[18]、枇杷(*Eriobotrya japonica*)^[19-20]、百合(*Lilium* spp.)^[21-22]、小麦(*Triticum aestivum*)^[23]等均已开展对非整倍体的创制与研究。在杨树中, 旻昱等^[24]对毛白杨杂种三倍体的 $2n$ 配子诱导途径进行鉴定研究。2019 年, 李代丽等^[25]分析了青黑杨杂种三倍体的花粉母细胞减数分裂特征和配子的变异规律。Wang 等^[26]以三倍体银中杨(*P. alba* × *P. berolinensis* ‘Yinzong’)为父本, 以二倍体毛新杨(*P. tomentosa* × *P. alba* var. *pyramidalis*)为母本进行人工杂交获得 65 个杂交子代。然而, 以杨树三倍体为母本, 以二倍体为父本, 杂交培育非整倍体的研究较少。因而, 本研究以转 *BtCry3A* 基因三倍体 741 杨为母本, 以二倍体新疆杨为父本, 进行人工杂交, 最终通过对杂交子代筛选, 快速获得非整倍体毛白杨抗虫优良新种质, 旨在为杨树抗虫研究和杨树非整倍体的培育提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

杂交母本为转 *BtCry3A* 抗虫基因的二倍体 741 杨 pCC84 株系, 2023 年 2 月 21 日于河北省洪崖山七里亭林场采集生长健壮的 15 年生 741 杨雌株花枝。杂交父本为种植于北京市东城区教学植物园生长状况良好的 12 年生二倍体新疆杨, 花枝采集时间为 2023 年 2 月 22 日。

1.2 研究方法

1.2.1 杂交

以转基因 741 杨为母本, 新疆杨为父本进行杂交。对采集的花枝枝干底部进行斜口修剪, 雌花枝每一枝条保留 3~5 个饱满完整花芽, 并去掉多余叶芽; 雄花枝去除基部花枝和叶芽。雌雄花枝先后于

温室中水培, 期间每 2 天更换清水。水培 4 d 后, 待新疆杨花粉完全成熟, 用毛笔收集花粉, 放入干燥管中于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。用毛笔沾取适量花粉于花粉活力测定培养基(12 g/L 蔗糖 + 50 mg/L 氯化钙 + 120 mg/L 硼酸 + 7 g/L 琼脂)上, 放置 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下暗培养 12 h 后, 在光学显微镜下观察花粉萌发情况, 随机观察 3 个视野, 每个视野花粉粒不少于 30 个。将花粉管长度大于花粉粒直径视为萌发, 统计花粉萌发数, 萌发率为花粉萌发数与花粉总数的比值乘以 100%。741 杨花枝培养至雌蕊柱头完全张开并开始分泌黏液, 用毛笔沾取适量新疆杨花粉, 对柱头进行授粉, 早、中、晚重复授粉 3 次。

1.2.2 胚挽救

741 杨为三倍体高度败育雌株, 果序小且数量少, 在种子完全成熟前果序便会整个脱落, 导致胚不能发育成熟, 所以我们采用胚挽救方法得到杂交子代。在果序脱落前直接取下杂交获得的果序, 在超净台中进行消毒, 70% 酒精浸泡 30 s, 无菌水清洗 30 s, 2% NaClO 溶液浸泡 2 min, 无菌水清洗 30 s, 共 2 次。用滤纸吸干果序表面水分后, 用尖头镊子拨开果皮, 取出所有种子置于培养瓶(1/2MS 培养基 + 20 g/L 蔗糖 + 5 g/L 琼脂)中培养, 每个培养瓶中可以放 5~8 粒种子。待种子萌发培养 2 个月后, 利用 741 杨生根培养基(1/2 MS + 15 g/L 蔗糖 + 5.5 g/L 琼脂 + 0.3 mg/L IBA)对存活子代进行扩繁, 获得组培苗。

1.2.3 *BtCry3A* 基因分子检测

分别取子代组培苗、母本转基因 741 杨、野生型 741 杨和新疆杨的叶片 100 mg, 利用多糖多酚植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP360, 天根)提取叶片基因组 DNA。通过 Primer Preimer 6 软件对目标基因 *BtCry3A* 设计检测引物, 正向引物序列(F1)为 5'-ATGACTGCTGATAACAACAC-3'; 反向引物序列(R1)5'-TGAAGGTAATCTGAGAGGTAG-3'。对子代、转基因 741 杨和野生型 741 杨叶片基因组 DNA 进行 PCR 检测, 反应程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min 预变性; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 变性, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 退火, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 90 s 延伸, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

分别取 100 mg 上述叶片, 利用 RNA Easy Fast 植物组织 RNA 快速提取试剂盒(DP452, 天根)提取样品 RNA, 对提取 RNA 立即用 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒(去基因组)(KR116, 天根)进行反转录, 得到样品 cDNA。通过 Primer Preimer 6 软件设计目标基因 *BtCry3A* 检测引物, 正向引物序列(F2)为 5'-TAGCTCTACCACCAAGGATG-3', 反向引物序列(R2)为 5'-CGTAATCGGCAATCTTCTGA-3'。并以 cDNA 为模板, *PtoActin* 为内参基因进行半

定量 PCR(RT-PCR)检测, 检测 cDNA 是否可用, 反应程序为: 95 °C 5 min 预变性; 95 °C 30 s 变性, 58 °C 30 s 退火, 72 °C 30 s 延伸, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

使用高特异性 qPCR 试剂盒(Takara)进行实时荧光定量反应(RT-qPCR), 使用仪器为实时定量基因扩增仪 PCR(7500 FAST)。反应体系为 10 μ L 体系: 5 μ L TB Green Premix Ex TaqII(2 \times), 前后引物各 0.4 μ L, 1 μ L cDNA(20 ng/ μ L), 0.2 μ L Reference ROX Reference Dye II(50 \times), 3 μ L ddH₂O, 每个反应重复 3 次。反应程序为: 95 °C 30 s 预变性; 95 °C 5 s 变性, 60 °C 34 s 退火延伸, 40 个循环; 95 °C 15 s; 60 °C 1 min 溶解曲线采集; 95 °C 30 s。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 式计算样品间的相对差异, 以野生型 741 杨为对照, 使用 SPSS 软件进行方差分析, 将分析结果导入 Prism 软件绘制柱状图。

1.2.4 子代倍性检测

以已知倍性的二倍体新疆杨为对照样本, 进行流式细胞测定。选取同一时期 60 mg 子代组培苗新鲜叶片, 放入直径 9 cm 的一次性培养皿中, 加入 1 mL 预冷的细胞裂解液, 立即用锋利的双面刀片快速切碎。轻微晃动培养皿, 将汇集的悬浮液利用 400 目的滤膜将悬浮液过滤, 滤液收集至 5 mL 流式管中, 冰上静置 10 min。

加入 200 μ L 预冷的 DAPI 染液(5 μ g/mL)到待测样品中, 对细胞核进行荧光染色。随后避光孵育 2 min, 使用仪器 CyFlow[®] Ploidy Analyser 检测, DNA 含量峰值的变异系数(variation coefficients, CV)值控制在 8% 以内, 每个样品测定 3 次生物学重复。检测结束后, 输出 FCS 格式文件, 导入 FlowJo 10 软件作图分析, 在得到各样品的峰值直方图后, 分析检测样品峰, 获得 CV 值和样品相对荧光强度, 以 CV 值作为评价流式测定结果的参数。然后将待测样本与参照样本的相对荧光强度比值作为倍性系数, 进而计算得到待测样本的倍性估算值。倍性公式为^[27]

$$F = \frac{I_s}{I_{ck}} \times n$$

式中: F 表示样本的倍性估算值, I_s 表示待测样本的相对荧光强度, I_{ck} 表示参照样本的相对荧光强度, n 表示参照样本的倍性。

1.2.5 杂交子代幼苗表型测定

组培苗培养 2 个月后, 置于水中洗掉培养基后移栽至土壤中。幼苗刚移栽时, 第一次浇水浇透土壤, 并用培养杯罩住幼苗进行缓苗。待幼苗培养 10 d 后长出新叶, 及时去掉培养杯。幼苗置于温室中培养, 温度为 25 °C, 光照时间为 10 h/d, 2 d 浇水一次。随后, 对移栽 15 d 后的组培苗的株高、节间数、节间距、叶长、叶宽、叶长宽比等表型进行测量统计。同时, 分别取父、母本及杂交子代植株从顶端往下数的第 3 片功能叶, 进行石蜡切片和染色处理, 以观察叶片厚度和内部结构。

2 结果与分析

2.1 杂交与胚挽救

依照花粉萌发标准, 对 3 个视野分别进行总花粉数和萌发花粉数的统计, 再进行花粉萌发率计算。统计结果显示: 采集的新疆杨花粉萌发率达到 $(30.16 \pm 1.68)\%$, 花粉萌发状态良好, 说明新疆杨花粉活力正常(图 1a)。

温室水培 5 d 后, 741 杨花枝雌花柱头完全张开并开始分泌黏液, 达到最佳授粉状态, 总计成功授粉得到 26 个果序。三倍体 741 杨育性差, 在种子完全成熟前果序便会整个脱落。授粉 15 d 后, 在接近脱落前采摘全部杂交果序, 其中 6 个果序直接用尖头镊子取出全部种子, 采用常规杂交播种方式播种到土壤中, 后续观察未见种子萌发。将其余 20 个果序全部进行胚挽救, 绝大多数种子表现为干扁枯黄, 在培养基中不萌发, 剩余极少数种子萌发。经过一段时间培育后得到 8 个萌发成苗的杂交子代, 依次编号为 1# ~ 8#, 后续利用 741 杨生根培养基对 8 个子代实生苗进行无性化扩繁。然而, 子代 5# 在展开绿色子叶后, 植株根系开始枯萎, 生长停滞, 后续死亡; 子代 7# 茎秆为浅绿色, 叶片白化十分严重, 在后续扩繁中不生根, 将实生苗移栽至土壤中仍无法正常生长。因而最终

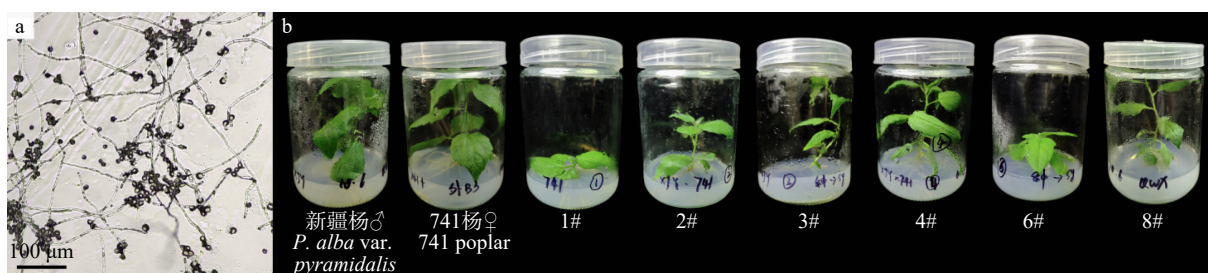


图 1 花粉萌发(a)与胚挽救获得的杂交子代(b)

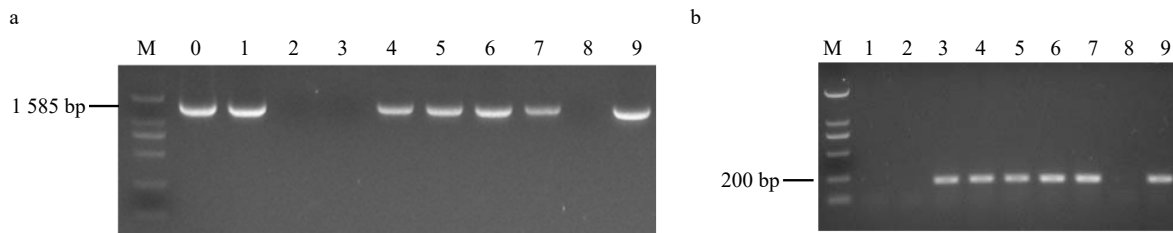
Fig. 1 Pollen germination (a) and hybrid offsprings obtained from embryo rescuing (b)

得到 1#、2#、3#、4#、6#和 8#, 共 6 个整体生长状况良好, 能够正常无性扩繁的杂交子代(图 1b)。

2.2 *BtCry3A* 基因分子检测

以质粒载体和母本转基因 741 杨为阳性对照, 新疆杨和 741 杨野生型为阴性对照, 对子代目标基因 *BtCry3A* 基因进行 PCR 检测。结果显示: 阳性对照和杂交子代 1#、2#、3#、4#和 8#DNA 基因组中均可以扩增出约 1 585 bp 长度的特异性条带, 而阴性对照和子代 6#未扩增出任何条带。这表明新疆杨与野生型 741 杨 DNA 基因组中均不含有 *BtCry3A* 基因, 而母本转基因 741 杨基因组中的 *BtCry3A* 基因

仍存在, 有 7 个杂交子代通过杂交过程遗传获得母本 DNA 基因组中的 *BtCry3A* 基因(图 2a)。利用 *PtoActin* 内参基因引物对样品 cDNA 进行质量检测, 结果显示所有样品 cDNA 均可以扩增出长度为 120 bp 的特异条带, 说明 cDNA 较完整可用于 RT-qPCR 检测。RT-PCR 显示: 杂交子代 1#、2#、3#、4#、8#和转基因 741 母本均可扩增出长度为 200 bp 的特异条带, 而 741 杨野生型、新疆杨和子代 6#均未扩增出条带(图 2b)。这与 DNA 水平检测结果一致, 并且扩增条带单一, 说明该对检测引物特异可用于 RT-qPCR 检测。



a 图中 0 为质粒, 1 为转基因 741 杨, 2 为新疆杨, 3 为野生型 741 杨, 4~9 为 1#、2#、3#、4#、6#、8#子代。b 图中 1 为新疆杨, 2 为野生型 741 杨, 3 为转基因 741 杨, 4~9 为 1#、2#、3#、4#、6#、8#子代。In figure a, 0 means plasmid, 1 means transgenic 741 poplar, 2 means *P. alba* var. *pyramidalis*, 3 means wild type 741 poplar, 4-9 mean 1#, 2#, 3#, 4#, 6#, and 8# hybrids. In figure b, 1 means *P. alba* var. *pyramidalis*, 2 means wild type 741 poplar, 3 means transgenic 741 poplar, 4-9 mean 1#, 2#, 3#, 4#, 6#, and 8# hybrids.

图 2 杂交子代中 *BtCry3A* 基因 PCR(a)和 RT-PCR(b)检测

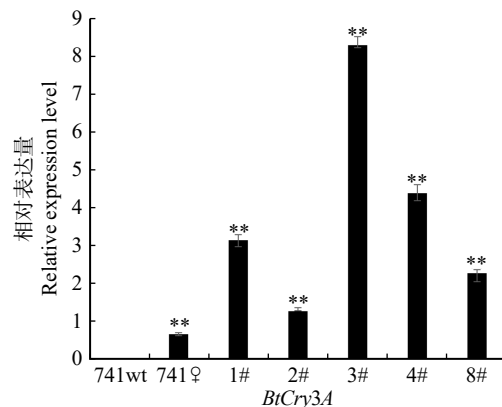
Fig. 2 Identification of *BtCry3A* in hybrid offsprings by PCR (a) and RT-PCR (b)

以野生型 741 杨为对照, 通过 RT-qPCR 测定母本 741 杨以及子代 1#、2#、3#、4#、8#组培苗叶片中 *BtCry3A* 基因的表达量。每个样品反应重复 3 次, 8 个样品反应误差值均小于 0.25, 说明反应重复性好, 结果可信度较高。结果表明, 野生型 741 杨叶片中 *BtCry3A* 基因表达量趋近于 0, 与前期检测结果一致。以野生型 741 杨为对照, 母本 741 杨和杂交子代中 *BtCry3A* 基因均有不同程度表达且差异显著。同时, 与母本 741 杨中 *BtCry3A* 基因表达量相比, 5 个子代该基因表达量均高于母本, 表明杂交子代不仅遗传了 *BtCry3A* 基因, 还提高了该基因的表达量。其中, 子代 3#的 *BtCry3A* 基因表达量最高, 约为母本 741 杨的 12 倍, 其余子代表达量从高到低依次是 4#、1#、8#和 2#。其中 4#、1#、8#中 *BtCry3A* 基因表达量均为母本 3 倍以上, 2#为母本约 1.8 倍(图 3)。

2.3 杂交子代倍性分析

以同一生长时期的父本新疆杨、母本转基因 741 杨和子代组培苗嫩叶为材料, 制备细胞核悬浮液进行流式细胞检测。检测数据通过 FlowJo 10 软件分析, 得到样品直方图。所有样品主峰相对荧光强度均高于其他杂峰, 证明该裂解液对于本次杨树样品的细胞核的提取效果较好, 整体检测背景较为干净。其中 4#的主峰峰型整体细高, 并且峰宽很窄,

表明细胞碎片少, 粘连细胞数低, 整体解离效果较好(图 4f)。1#和 3#主峰附近杂峰均较低且背景碎片较少(图 4c, e), 但主峰峰型较 4#稍宽。而父本、母本的主峰整体峰型虽然也呈现细高形状, 但主峰的左侧均存在较为明显的背景碎片(图 4a, b)。此外, 父本新疆杨收集的有效细胞核数目最大值超过 500(图 4a), 其次是母本、1#和 4#收集的有效细胞核数目均超过 300(图 4b, c 和 f), 而 2#和 3#收集的有效



表示与野生型 741 杨相比, 在 0.01 水平上存在极显著差异。 means extremely significant difference at 0.01 level compared with wild type 741 poplar.

图 3 不同株系 *BtCry3A* 基因 RT-qPCR 分析

Fig. 3 Analysis of *BtCry3A* in different strains by RT-qPCR

细胞核数目较少, 不足 150(图 4d, e)。结合主峰峰型、杂峰数量、背景碎片情况以及有效细胞核数目情况, 4#和父本细胞核提取效果最佳。

计算结果显示, 所有样品 CV 值均小于 8% (表 1)。根据 CV 值判断标准^[28], 结果准确, 峰图效果好。其中, 1#的 CV 值最小, 为 $(5.41 \pm 0.28)\%$ 。表 1 显示: 1#相对荧光强度值最大, 为 $(28\ 297.33 \pm 36.97)$, 其次是 3#和 8#, 这 3 个子代的相对荧光强度值均大于三倍体母本 741 杨 $(19\ 731.00 \pm 129.25)$ 。而二倍体父本新疆杨的相对荧光强度值最低 $(13\ 251.00 \pm 21.23)$ 。以二倍体父本为参照样本, $n=2$, 计算得到母本 F 值为 2.98, 与本身倍性值 3 十分相近, 说明该估测方法的可靠性和相对准确性。子代中, 1#的 F 值最大为 4.27, 倍性估计值 >4 , 推测其染色体数目在 $4x \sim 5x$ 之间, 可能为超四倍体植株。子代 8#(3.74)的 F 值于 $3 \sim 4$ 之间, 说明 8#可能为非整倍体植株, 并且染色体数目在 $3x \sim 4x$ 之间。

而 2#(2.53)和 4#(2.36)的 F 值均于 $2 \sim 3$ 之间, 说明这两个杂交子代是染色体数目在 $2x \sim 3x$ 之间的非整倍体植株。3#的 F 值为 3.93, 接近 4, 结合检测误差, 推测 3#可能是四倍体或近四倍体的非整倍体植株。

2.4 杂交子代幼苗表型测定

对父本新疆杨、母本 741 杨以及杂交子代组培苗进行移栽种植, 并对移栽苗进行株高、节间数量和平均节间距离进行测量, 生长状况如图 5 所示。与父本株高相比, 1#和 2#株高极显著低, 4#株高无明显差异, 母本株高显著高, 3#和 8#株高极显著高, 同时 3#和 8#株高超过母本; 与父本节间数相比, 母本、3#和 4#的节间数无显著差异, 1#和 2#节间数极显著低, 8#节间数极显著高于父本, 并且节间数最多; 节间距离结果(图 6)。以上结果表明: 子代 3#和 8#均表现出较好的生长优势, 而 1#出现生长迟缓、极度矮化的生长劣势, 2#同样存在生长较为缓慢的

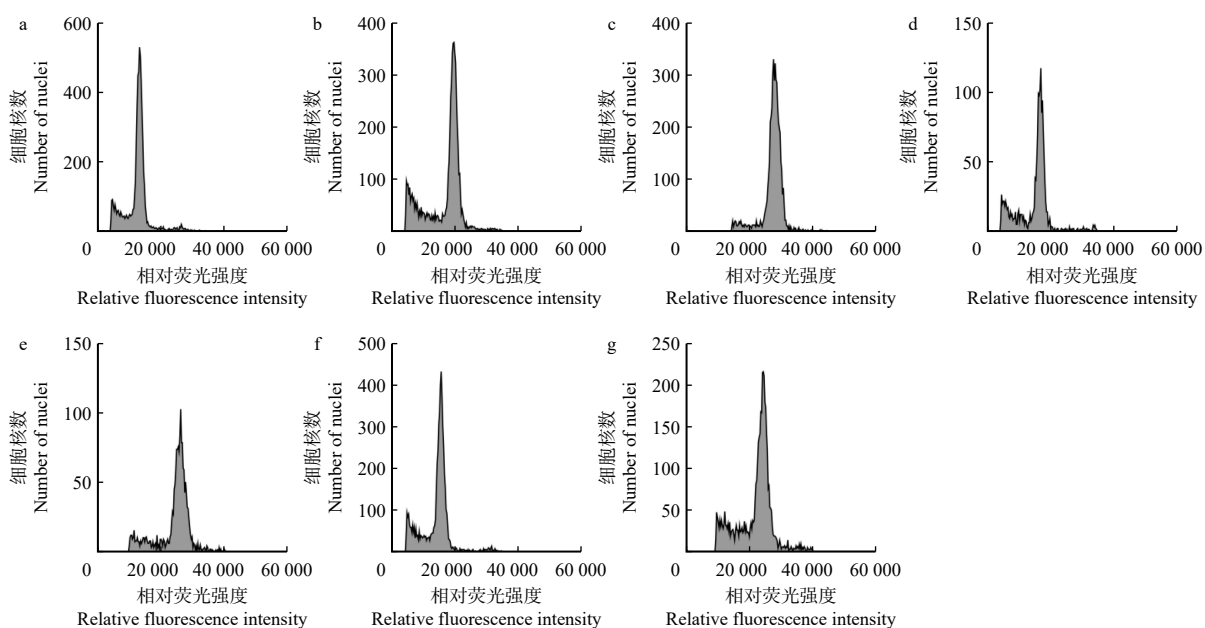


图 4 父母本与杂交子代核 DNA 流式细胞检测
a. 新疆杨; b. 转基因 741 杨; c~g. 杂交子代 1#、2#、3#、4#、8#。a, *P. alba* var. *pyramidalis*; b, transgenic 741 poplar; c~g, 1#, 2#, 3#, 4#, 8# hybrid offsprings.

图 4 父母本与杂交子代核 DNA 流式细胞检测

Fig. 4 Detection of nuclear DNA of offspring and its parents by flow cytometer

表 1 流式细胞分析法对杂交子代的倍性检测结果

Tab. 1 Detection results of nuclear ploidy of hybrid offsprings by flow cytometry method

样本 Sample	CV/%	相对荧光强度 Relative fluorescence intensity	F 值 F value
新疆杨 <i>P. alba</i> var. <i>pyramidalis</i>	6.96 ± 0.12	$13\ 251.00 \pm 21.23$	2.00
741 杨 741 poplar	6.07 ± 0.21	$19\ 731.00 \pm 129.25$	2.98
1#	5.41 ± 0.28	$28\ 297.33 \pm 36.97$	4.27
2#	5.86 ± 0.14	$16\ 786.67 \pm 129.60$	2.53
3#	5.67 ± 0.19	$26\ 006.67 \pm 86.44$	3.93
4#	6.56 ± 0.79	$15\ 659.00 \pm 259.90$	2.36
8#	5.95 ± 0.22	$24\ 763.00 \pm 270.82$	3.74



图5 亲本与杂交子代幼苗表型前视图(a)和俯视图(b)

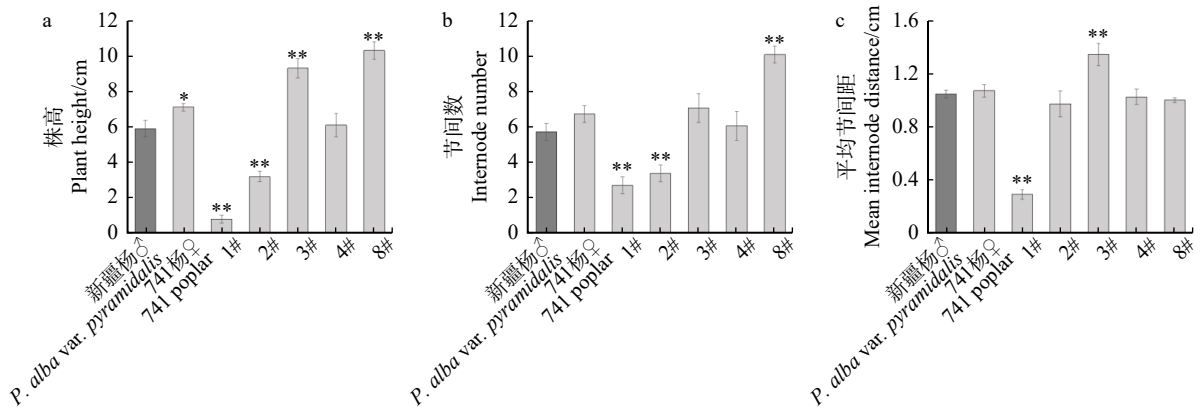
Fig. 5 Phenotypes of parents and hybrid offspring front view (a) and vertical view(b)

情况。

测量父本新疆杨、母本 741 杨和杂交子代移栽苗的叶长、叶宽和叶长宽比,并对叶形等特征进行观测记录。与父本的叶长相比,3#叶长无显著差异,2#叶长显著低,8#叶长极显著低,1#和4#叶长显著高,母本叶长极显著高。与父本叶宽相比,1#叶宽显著低,2#、3#、4#和8#叶宽均极显著低,母本叶宽极显著高(图7)。与父本叶长宽比相比,母本和2#叶长宽比无显著差异,8#叶长宽比显著低,1#、3#和4#叶长宽比极显著高。观察亲本与子代叶形:3#和

4#叶形接近于披针形,4#叶片大小较3#叶片更大;2#和8#叶片大小明显小于亲本及其他子代,且两者叶片表面均覆盖白色表皮毛;1#叶形接近于长椭圆形,叶边缘向叶背部发生一定程度卷曲,4#叶边缘同样存在轻微的卷曲(图5b)。

取同一时期亲本和杂交子代从顶端往下数的第3片功能叶进行石蜡切片及染色处理,观察叶片厚度和内部结构,选取最接近中心叶脉处的叶片结构进行观察分析。切片结果显示,母本和父本叶片已开始形成栅栏组织,叶片结构较为完整,与父本相



*表示与新疆杨相比在 0.05 水平上存在显著差异,**表示与新疆杨相比在 0.01 水平上存在极显著差异。下同。* means significant difference at 0.05 level compared with *P. alba* var. *pyramidalis*, ** means extremely significant difference at 0.01 level compared with *P. alba* var. *pyramidalis*. The same below.

图6 亲本与杂交子代幼苗表型差异分析

Fig. 6 Analysis of phenotypic difference between parents and hybrid offsprings

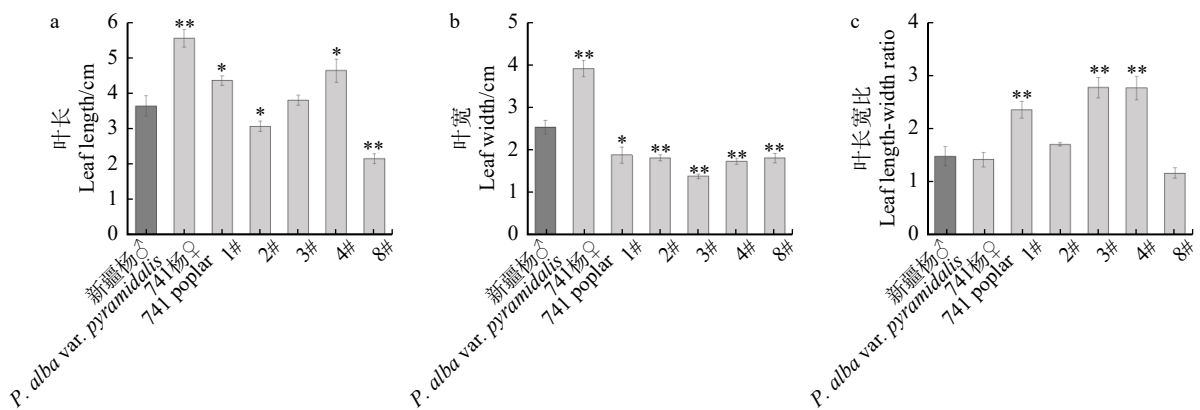


图7 亲本与杂交子代幼苗叶片表型差异分析

Fig. 7 Analysis of leaf phenotypic difference between parent and hybrid offsprings

比, 母本栅栏组织发育情况更为完整(图 8a, b)。3#叶片的栅栏组织和海绵组织均已形成, 并且栅栏组织宽度明显高于亲本及其他子代, 叶片厚度最厚, 叶片结构发育最完整(图 8e)。8#叶片厚度略低于 3#, 但高于双亲本, 栅栏组织和海绵组织同样已经形成, 栅栏组织宽度明显大于双亲本(图 8g)。2#和 4#叶片未见明显栅栏组织, 仅见海绵组织, 叶片结构尚未发育完成, 并且叶片结构中存在着较大的细胞间隙, 叶肉结构松散(图 8d, f)。1#叶片未见明显的栅栏组织, 海绵组织结构较 2#和 4#更为紧密(图 8c)。总体分析表明: 3#和 8#的叶片结构发育最为完整, 叶片厚度明显大于亲本; 1#、2#和 4#均未形成明显的栅栏组织, 其中 2#和 4#叶片海绵组织中存在较大的细胞间隙, 叶肉结构松散。

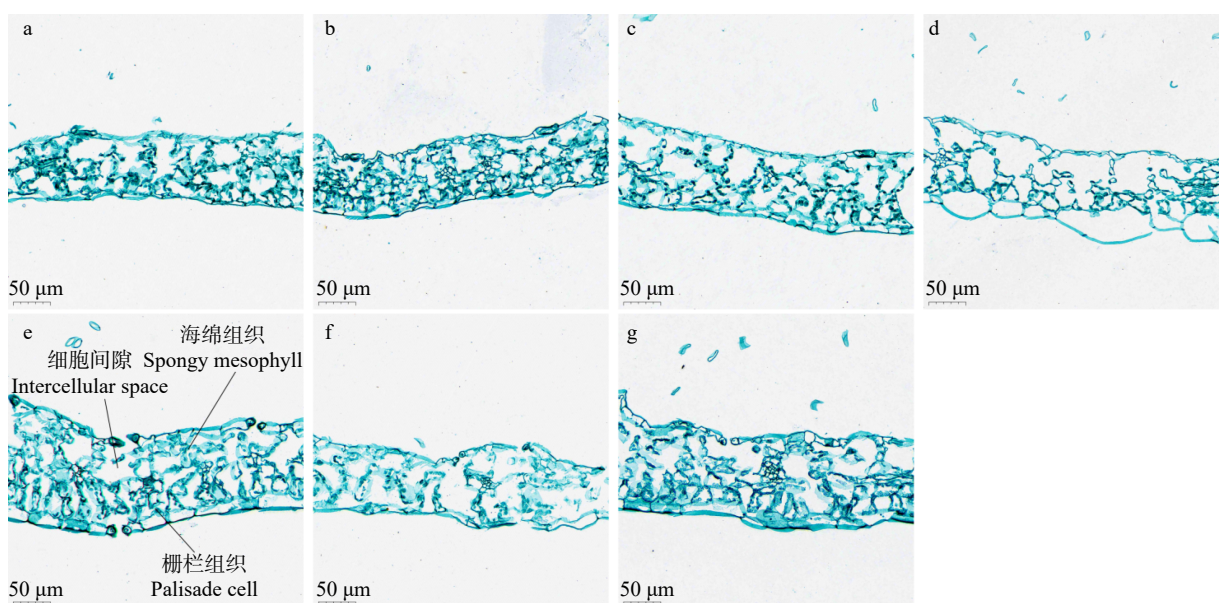
3 讨 论

我国现有人工林面积达 6 169 万 hm^2 , 大面积纯林易受到虫害的威胁, 严重影响林业高产、优产和稳产^[29]。在 20 世纪 90 年代中期, 杨树天牛危害在三北地区大规模爆发, 发生面积超过 18 万 hm^2 。危害杨树的的天牛主要是光肩星天牛(*Anoplophora glabripennis*)、黄斑星天牛(*Anoplophora nobilis*)等, 在杨树天牛危害严重的地区, 杨树受害率达到了 85% 以上, 最大受害率超过 90%^[30]。因此抗虫性研究具有重要的生产意义, 强抗虫性也是林木育种和造林生产的重要指标之一。

本实验通过将转抗鞘翅目的 *BtCry3A* 基因三倍

体 741 杨与二倍体新疆杨进行杂交, 以培育抗鞘翅目害虫的非整倍体毛白杨新种质。实验中常规播种的种子均枯黄干瘪不萌发, 通过胚挽救技术获得 8 个萌发种子。李林光等^[31]对三倍体苹果(*Malus pumila*)的种子分别进行常规播种和胚培养, 发现胚培养得到的实生苗子代数量是常规播种的 2 倍, 说明三倍体植株大多数种子自然萌发率较低, 需要经过胚培养辅助萌发, 可能是染色体数目变异导致功能退化, 种子不能自然形成完整发育结构。在后续培养中, 5#和 7#子代植株不能正常生长。梁武军等^[32]对自然授粉的三倍体葡萄柚(*Citrus paradisi*)种子进行培养发现: 大部分种子败育, 经过胚挽救获得的非整倍体植株大多生长缓慢, 并在后续培养中部分死亡。植物具有同源基因的剂量补偿效应, 对于非整倍化具有更强的适应性, 但非整倍体植株存活率仍然较低^[33]。

BtCry3A 基因分子检测结果显示, 在母本和子代 1#、2#、3#、4#和 8#中均检测到 *BtCry3A* 基因。*BtCry3A* 基因遗传概率极高。这可能是由于该基因在母本基因组中为多拷贝, 同时由于在减数分裂时不均等分裂, 子代染色体数目增加, 使得遗传到该基因的可能性也增大。在后续 RT-qPCR 检测中, 子代 *BtCry3A* 基因的表达量均显著高于母本, *BtCry3A* 基因在母本中存在的多位点和多拷贝可能会影响表达量, 杂交子代由于染色体重组, 将减少该基因拷贝数, 从而提高表达量^[34]。另外, 母本 741 杨检测材料是由组培幼化得到的组培苗叶片, 而子代为实生苗



a. 新疆杨; b. 转基因 741 杨; c~g. 杂交子代 1#/2#/3#/4#/8#。a. *P. alba* var. *pyramidalis*; b. transgenic 741 poplar; c-g. 1#, 2#, 3#, 4#, 8# hybrid offsprings.

图 8 亲本与杂交子代幼苗叶片纵切面

Fig. 8 Leaf longitudinal section of parents and hybrid offsprings

叶片,不同来源的组培苗初期生长状况不同,这可能会影响基因表达量。后续应当将母本与子代在田间种植,待植株生长状况稳定后进行采样,再次测定 *BtCry3A* 基因的表达量,并检测植株中 *BtCry3A* 蛋白的含量。

母本三倍体在减数分裂时染色体不均等分离,常产生大量非整倍体配子,产生整倍体配子的概率极低。实验中倍性测定结果显示,5个子代可能均为非整倍体,子代染色体数目分布于 $2x \sim 5x$ 之间,其中 1# 的染色体数目在 $4x \sim 5x$ 之间,推测为超四倍体。Wang 等^[35]将三倍体枇杷母本与二倍体枇杷父本进行杂交,共获得 147 株杂交子代,其中 136 株均为非整倍体,并且 86.39% 的非整倍体染色体数目位于 $2x \sim 3x$ 之间,仅 6.12% 的非整倍体染色体数目位于 $3x \sim 4x$ 之间。杨树中,Wang 等^[26]以三倍体银中杨为父本,二倍体毛新杨为母本进行人工杂交,获得 65 个杂交子代,其中 2 个二倍体,10 个四倍体,26 个染色体数目位于 $2x \sim 3x$ 之间,24 个染色体数目位于 $3x \sim 4x$ 之间,以及 3 个染色体数目超过 $4x$ 。本实验结果与以三倍体杨为父本,二倍体杨为母本得到的杂交子代倍性结果范围一致,但以三倍体 741 杨为母本得到的杂交子代较少,推测杨树中雄性三倍体的育性可能高于雌性三倍体的育性。

后续杂交子代移栽苗表型初步测定结果显示,5个子代中 2 个子代出现植株矮化现象,表明非整倍体出现植株矮化现象的概率较大,而子代 3# 和 8# 株高大于双亲。Wang 等^[26]对三倍体银中杨杂交子代进行观测,发现大部分的非整倍体植株株高、地径等生长指标,与亲本和整倍体子代相比处于劣势,但仍存在少量生长状况优良的非整倍体杂交子代。对叶片表型观测,发现 5 个杂交子代表型均发生不同程度变异,这与四倍体木槿 (*Hibiscus syriacus*) 的非整倍体子代研究结果相似,木槿非整倍体子代叶片大小、叶形、叶缘类型、叶裂片数等发生显著变异^[36]。观察叶片内部结构发现:3# 和 8# 叶肉中已形成明显栅栏组织,叶片结构发育最为完整,叶片厚度明显大于亲本;而 1#、2# 和 4# 均未形成明显的栅栏组织,并且 2# 和 4# 叶片海绵组织中存在较大的细胞间隙,叶肉结构松散。Dang 等^[37]将非整倍体枇杷叶片与二倍体和三倍体亲本叶片进行比较,发现非整倍体的叶片形态上表现出叶片宽度增大、长度减小、叶片厚度减小、叶肉的栅栏组织显著变少等特征。由于染色体数量和组成的变化,非整倍体表现出较大表型差异,这极大增加了物种多样性,丰富了遗传基础研究资源。

植物的非整倍化事件,在遗传育种研究中对于物理定位基因及分子标记,确定染色体与连锁群的

对应关系,克隆应用目标基因等都有着重要意义^[38]。目前,对于杨树倍性方面的研究主要还是集中于诱导与选育优良的多倍体植株,研究整套染色体组变化对于植株的影响^[39]。对杨树三倍体育性研究,主要也集中在诱导三倍体产生 $2n$ 配子机制,分析三倍体的花粉母细胞减数分裂特征以及配子的变异规律等方面^[24-25]。而对于杨树非整倍体不同染色体组成对于植株生长发育和表型的影响,以及通过三倍体中间育种材料培育非整倍体杨树的研究较少。本研究以雌性三倍体毛白杨培育非整倍体杂交子代,对杨树非整倍体研究进行探索,研究结果将为培育抗鞘翅目害虫杨树品种途径提供重要参考,并丰富了杨树非整倍体种质资源,对后续杨树非整倍体育种研究提供了重要的理论依据。由于流式细胞术测定存在一定误差,后续还将对子代进行深入的核型分析,精准确定子代倍性,并通过重测序确认染色体数目和组成情况。杂交子代中 3# 的 *BtCry3A* 基因表达量最高,并且生长性状均优于双亲,后续将把亲本与子代移栽至田间并观察记录表型变化。待植株表型特征稳定后,再次进行 *BtCry3A* 基因表达量检测、*BtCry3A* 蛋白含量检测、光肩星天牛幼虫的抗性测试以及生长量等表型数据测定,从而筛选到性状优良的抗虫的非整倍体毛白杨新种质。

4 结 论

本研究以转 *BtCry3A* 基因的三倍体 741 杨为母本,以二倍体新疆杨为父本进行杂交,通过胚挽救技术获得 6 个生长正常的杂交子代。其中 5 个子代携带有母本的 *BtCry3A* 基因,并且子代中该基因表达量均高于母本,3# 中表达量最高,为母本 12 倍。对 5 个杂交子代进行流式细胞检测,分析倍性,初步判定 1# 为超四倍体,2#、4#、8# 为非整倍体,3# 可能为非整倍体或四倍体。子代表型差异大,叶形、叶片大小、节间距、株高等均存在差异,其中 3# 和 8# 生长势均优于双亲。3# 因植物体中 *BtCry3A* 基因高表达且生长性状优于双亲,可作为优良的潜在抗虫非整倍体毛白杨新种质,进一步展开抗虫性测试及生长情况监测工作,以获得优良新种质。

参 考 文 献

- [1] 李善文,张志毅,何承忠. 中国杨树杂交育种研究进展 [J]. 世界林业研究, 2004, 17(2): 37-38.
- Li S W, Zhang Z Y, He C Z. Progress on hybridization breeding of poplar in China [J]. World Forestry Research, 2004, 17(2): 37-38.
- [2] 李秀华. 三北防护林杨树天牛的危害及防治策略 [J]. 防护林科技, 2021(4): 77-78, 80.
- Li X H. Harm and control strategy of poplar in three north

- shelterbelt[J]. Protection Forest Science and Technology, 2021(4): 77-78, 80.
- [3] 丁莉萍, 王宏芝, 魏建华. 杨树转基因研究进展及展望 [J]. 林业科学研究, 2016, 29(1): 124-132.
- Ding L P, Wang H Z, Wei J H. Progress and prospect of research in transgenic poplar[J]. Forest Research, 2016, 29(1): 124-132.
- [4] 田颖川, 李太元, 莽克强, 等. 抗虫转基因欧洲黑杨的培育 [J]. 生物工程学报, 1993, 9(4): 291-297, 395.
- Tian Y C, Li T Y, Mang K Q, et al. Insect tolerance of transgenic *Populus nigra* plants transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin gene[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 1993, 9(4): 291-297, 395.
- [5] 王学聘, 韩一凡, 戴连韵, 等. 抗虫转基因欧美杨的培育 [J]. 林业科学, 1997, 33(1): 69-74.
- Wang X P, Han Y F, Dai L Y, et al. Studies on insect-resistant transgenic (*P. × euramericana*) plants[J]. Scientia Silvae Sinicae, 1997, 33(1): 69-74.
- [6] 饶红宇, 陈英, 黄敏仁, 等. 杨树 NL-8010 转 *Bt* 基因植株的获得及抗虫性 [J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(2): 1-5.
- Rao H Y, Chen Y, Huang M R, et al. Genetic transformation of poplar NL-80106 transferred by *Bt* gene and its insect-resistance[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2000, 9(2): 1-5.
- [7] 李科友, 樊军锋, 赵忠, 等. 转双价抗虫基因毛白杨无性系 85 号抗虫性研究 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(8): 1537-1543.
- Li K Y, Fan J F, Zhao Z, et al. Resistance to insect of transgenic *Populus tomentosa* clone-85 plants with two insect-resistant genes[J]. Acta Bot Boreal Occident Sin, 2007, 27(8): 1537-1543.
- [8] 甄志先, 李静, 梁海永, 等. 转 *BtCry3A* 基因杨树毒蛋白表达及对桑天牛抗性的研究 [J]. 蚕业科学, 2007(4): 538-542.
- Zhen Z X, Li J, Liang H Y, et al. Expressions of *BtCry3A* gene in transgenic polar and its resistance against *Apriona germari*[J]. Science of Sericulture, 2007(4): 538-542.
- [9] 姜惠明. 白杨杂种优势的初步分析及白杨杂种优良无性系 741 号杨选育 [J]. 河北农学报, 1983, 8(2): 75-80.
- Jiang H M. Preliminary analysis of hybrid vigor of poplar and selection of high-quality poplar hybrid clone-741[J]. Hebei Agricultural Journal, 1983, 8(2): 75-80.
- [10] 牛小云, 黄大庄, 杨敏生, 等. 转 *BtCry3A* 基因杨树 6 个株系体内毒蛋白表达及对桑天牛的抗性鉴定 [J]. 蚕业科学, 2011, 37(4): 593-599.
- Niu X Y, Huang D Z, Yang M S, et al. Expression of toxic protein in six transgenic poplar strains with *BtCry3A* gene and identification of their resistance against *Apriona germari*[J]. Science of Sericulture, 2011, 37(4): 593-599.
- [11] Ran Y D, Liang Z, Gao C X. Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing[J]. Science China-Life Sciences, 2017, 60(5): 490-505.
- [12] Satheesh V, Zhang H, Wang X T, et al. Precise editing of plant genomes-prospects and challenges[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2019, 96: 115-123.
- [13] 苏静, 王向东, 王俊, 等. 植物三倍体育种研究进展 [J]. 南方农业, 2012, 6(5): 78-80.
- Su J, Wang X D, Wang J, et al. Advances of triploid breeding in plant[J]. South China Agriculture, 2012, 6(5): 78-80.
- [14] Ramsey J, Schemske D W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1998, 29: 467-501.
- [15] Siegel J J, Amon A. New insights into the troubles of aneuploidy[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2012, 28(1): 189-214.
- [16] Shi X, Chen C, Yang H, et al. The gene balance hypothesis: epigenetics and dosage effects in plants[J]. Methods in Molecular Biology, 2020, 2093: 161-171.
- [17] 朱斌, 田贵福, 贺路英, 等. 植物非整倍体研究进展 [J]. 广西植物, 2018, 38(10): 1404-1410.
- Zhu B, Tian G F, He L Y, et al. Advances of aneuploidy in plant[J]. Guihaia, 2018, 38(10): 1404-1410.
- [18] Jeong C S, Park S M, Wakana A, et al. Male and female fertility in triploid grapes (*Vitis* complex) with special reference to the production of aneuploid plants[J]. Vitis Journal of Grapevine Research, 2002, 41(1): 11-19.
- [19] Kikuchi S, Iwasuna M, Kobori A, et al. Seed formation in triploid loquat (*Eriobotrya japonica*) through cross-hybridization with pollen of diploid cultivars[J]. Breeding Science, 2014, 64(2): 176-182.
- [20] Wang P, Yang Y, Lei C, et al. A female fertile triploid loquat line produces fruits with less seed and aneuploid germplasm[J]. Scientia Horticulturae, 2023, 319(11): 21-41.
- [21] Suzuki T, Yamagishi M. Aneuploids without bulbils segregated in F1 hybrids derived from triploid *Lilium lancifolium* and diploid *L. leichlinii* crosses[J]. The Horticulture Journal, 2016, 85(3): 224-231.
- [22] 崔罗敏, 万麟, 周树军. 三倍体观赏百合与二倍体食用龙牙百合的杂交分析 [J]. 西北植物学报, 2021, 41(6): 971-976.
- Cui L M, Wan L, Zhou S J. Analysis of the hybridization between triploid ornamental lily (*Lilium*) and diploid Edible *Lilium brownii* var. *viridulum*[J]. Acta Bot Boreal Occident Sin, 2021, 41(6): 971-976.
- [23] Zhang A, Li N, Gong L, et al. Global analysis of gene expression in response to whole-chromosome aneuploidy in hexaploid wheat[J]. Plant Physiology, 2017, 175(2): 828-847.
- [24] 旻昱, 康宁, 索玉静, 等. 毛白杨杂种三倍体的 $2n$ 雌配子形成途径鉴定 [J]. 北京林业大学学报, 2017, 39(5): 17-24.
- Min Y, Kang N, Suo Y J, et al. Origin identification of $2n$ female gamete of *Populus tomentosa* triploid hybrids[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2017, 39(5): 17-24.
- [25] 李代丽, 商静, 田菊, 等. 青黑杨杂种三倍体花粉母细胞减数分裂染色体行为及其花粉变异研究 [J]. 北京林业大学学报, 2019, 41(7): 75-82.
- Li D L, Shang J, Tian J, et al. Meiotic chromosome behavior of pollen mother cells and pollen variation in triploid hybrid between section Tacamahaca and sect. Aigeiros of *Populus*[J]. Journal of

- Beijing Forestry University, 2019, 41(7): 75–82.
- [26] Wang J, Huo B, Liu W, et al. Abnormal meiosis in an intersectional allotriploid of *Populus L.* and segregation of ploidy levels in $2x \times 3x$ progeny[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e181767.
- [27] Pellicer J, Leitch I J. The application of flow cytometry for estimating genome size and ploidy level in plants[J]. Methods in Molecular Biology, 2014, 1115: 279–307.
- [28] Puite K J, Broeke W R R T. DNA staining of fixed and non-fixed plant protoplasts for flow cytometry with hoechst 33342[J]. Plant Science Letters, 1983, 32(1–2): 79–88.
- [29] 李薇, 李淑娴. 林木抗虫性研究进展 [J]. 西南林业大学学报, 2018, 38(5): 180–190.
- Li W, Li S X. Advances in insect resistance of forest trees[J]. Journal of Southwest Forestry University, 2018, 38(5): 180–190.
- [30] 贾殿坤. 三北防护林中杨树天牛的危害特点及防治措施 [J]. 林业勘查设计, 2023, 52(3): 48–51.
- Jia D K. Hazard characteristics and prevention measures of Cerambycidae in the Three-North Shelter Forest Program forest investigation design[J]. Forest Investigation Design, 2023, 52(3): 48–51.
- [31] 李林光, 何平, 欧春青, 等. 苹果三倍体后代培养及倍性鉴定 [J]. 果树学报, 2008, 25(3): 400–403.
- Li L G, He P, Ou C Q, et al. Culture and identification of seedlings from triploid apple[J]. Journal of Fruit Science, 2008, 25(3): 400–403.
- [32] 梁武军, 解凯东, 谢宗周, 等. 三倍体葡萄柚实生后代多倍体的发掘与 SSR 遗传鉴定 [J]. 果树学报, 2015, 32(1): 13–18.
- Liang W J, Xie K D, Xie Z Z, et al. Exploitation of polyploids from open-pollinated triploid grapefruit progenies and their genetic identification by SSR molecular markers[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(1): 13–18.
- [33] Kojima S, Cimini D. Aneuploidy and gene expression: is there dosage compensation?[J]. Epigenomics, 2019, 11(16): 1827–1837.
- [34] 常丽娟, 刘勇, 宋君, 等. 转基因植物中外源基因的沉默及应对策略 [J]. 生物技术通讯, 2013, 24(6): 881–885.
- Chang L J, Liu Y, Song J, et al. Silence of exogenous genes in transgenic plants and the coping strategies[J]. Letters in Biotechnology, 2013, 24(6): 881–885.
- [35] Wang P, Yang Y, Lei C, et al. A female fertile triploid loquat line produces fruits with less seed and aneuploid germplasm[J]. Scientia Horticulturae, 2023, 319: 112141.
- [36] Chen H, Contreras R N. Near-hexaploid and near-tetraploid aneuploid progenies derived from backcrossing tetraploid parents *Hibiscus syriacus* \times (*H. syriacus* \times *H. paramutabilis*)[J]. Genes, 2022, 13(6): 1022.
- [37] Dang J, Wu T, Liang G, et al. Identification and characterization of a loquat aneuploid with novel leaf phenotypes[J]. Hortscience, 2019, 54(5): 804–808.
- [38] 轩淑欣, 李明, 张成合, 等. 植物非整倍体及其在遗传研究上的应用 [J]. 河北农业大学学报, 2002(增刊 1): 47–50.
- Xuan S X, Li M, Zhang C H, et al. Plant aneuploids and their use in the genetic studies and breeding[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2002(Suppl. 1): 47–50.
- [39] 费希同, 唐军荣, 周军, 等. 中国杨树多倍体诱导研究现状 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53(18): 4252–4256.
- Fei X T, Tang J R, Zhou J, et al. Research status of polyploid induction on poplar in China[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2014, 53(18): 4252–4256.

(责任编辑 吴娟 赵田芸
责任编辑 卢孟柱)