

DOI:10.12403/j.1001-1498.20230502

‘44 号’抗虫黑杨基于根段组培再生和遗传转化体系的建立

杨 松¹, 宋学勤², 赵树堂², 胡建军², 卢孟柱^{1*}

(1. 浙江农林大学, 浙江 杭州 311300; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要: [目的] 以美洲黑杨和转 *BtCry1Ac* 欧洲黑杨的杂交子代‘44 号’抗虫黑杨作为试验材料, 采用无菌苗根基部为外植体, 建立高效稳定的组培再生体系和黑杨遗传转化体系。[方法] 以‘44 号’抗虫黑杨无菌苗 0.5~1.0 cm 的根基部为试验材料, 研究不同激素配比对根系不定芽的诱导和生根的影响, 探索根系对草铵膦的临界耐受浓度, 以农杆菌介导法进行遗传转化, 并通过 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 基因染色实时监控和鉴定阳性植株。[结果] 筛选出‘44 号’抗虫黑杨根系诱导不定芽最优培养基为: WPM + 20 g·L⁻¹ 蔗糖 + 7.8 g·L⁻¹ 琼脂 + 0.25 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.05 mg·L⁻¹ NAA, 分化率为 86.67%; 不定芽生根的最优培养基为: WPM + 0.075 mg·L⁻¹ NAA + 7 g·L⁻¹ 琼脂 + 0.1 g·L⁻¹ AC, 生根率为 75.00%。通过根系草铵膦抗性筛选梯度试验, 确定根系对草铵膦筛选最适遗传转化筛选浓度为 0.8 mg·L⁻¹。采用农杆菌介导法将外源基因转入到根中, 经不定芽诱导和生根两个阶段获得再生植株苗, 经特异引物进行 PCR 鉴定, 31 个外植体中阳性植株为 9 株, 转化效率为 29.0%。[结论] 建立了‘44 号’抗虫黑杨根系的再生和遗传转化体系, 为黑杨派杨树的高效基因转化提供了途径的同时, 也为以‘44 号’抗虫黑杨为基础, 通过转基因技术聚合更多的优良性状, 提供了重要的技术支撑。

关键词: ‘44 号’抗虫黑杨 (*P. deltoides* cl. ‘Danhong’ × *P. nigra*); 美洲黑杨; 欧洲黑杨; 根系侵染; 遗传转化; 组培再生; GUS 染色

中图分类号: S722; S792.11

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2024)05-0074-11

杨树 (*Populus*) 是中纬度平原地区木材产量最高、种植面积最大的速生用材树种之一, 具有生长快、成材早和产量高等特点。人工林是我国木材供应的主要来源, 从 2007 年开始, 我国杨树人工林总面已经达到 700 万 hm²^[1], 其中美洲黑杨 (*Populus deltoides* Marsh.) 占据主导地位^[2-4]。随着杨树人工林规模的不断扩大和集中种植, 以舞毒蛾 (*Lymantria dispar*)、杨尺蠖 (*Malacosoma neustria*) 和天牛 (*Coleoptera*) 等为主的多种森林病虫害开始蔓延肆虐, 对林业经济和生态系统造成重大损失^[5-6]。我国非常重视杨树病虫害研究,

1989 年获得首例转 *BtCry1Ac* (*Bt*) 基因欧洲黑杨 (*P. nigra*), 田间试验证明其对杨尺蠖等具有很好的抗性, 同时也具有生长快速的特性^[7-9]。由中国林业科学研究院林业研究所培育的转 *Bt* 基因欧洲黑杨目前已进入产业化应用阶段, 能够有效抵抗食叶害虫的危害^[10]。此外, 美洲黑杨速生良种丹红杨 (*P. deltoides* cl. ‘Danhong’) 与转 *Bt* 欧洲黑杨的杂交子代被报道能够显著抵抗舞毒蛾的虫害, 同时具有生长快速的特性^[11-12]。在这些杂交子代中, ‘44 号’抗虫黑杨 (*P. deltoides* cl. ‘Danhong’ × *P. nigra* L.) 表现尤为突出, 成为集速生、耐水湿和

收稿日期: 2023-12-27 修回日期: 2024-07-17

基金项目: 国家重点研发计划“林木多性状高效聚合育种技术”(2021YFD2200205) 国家级; 浙江省“十四五”育种专项林木协作组课题 (2021C02070-1) 省市级

* 通讯作者: 卢孟柱, 博士, 教授, 主要研究方向: 木材形成的分子基础及分子育种, E-mail: lumz@zafu.edu.cn

抗虫等多种优良性状的优良杨树品种^[12],在推广种植方面具有优势。

随着我国杨树人工林不断向困难立地扩展,并面临木材市场的多元化需求,杨树良种需要不断更新,如选育抗逆性强、经营成本低、木材密度提高或纤维含量增加等杨树新品种^[13]。常规育种效率低、周期长,而通过基因工程手段实现林木优良性状聚合育种已成为林木育种的重要技术途径^[14],也是杨树新品种创制的新趋势。基因工程育种的关键在于遗传转化体系的建立。如前所述,'44号'抗虫黑杨集合了速生、耐水湿和抗虫等多种优良特性,选择'44号'抗虫黑杨作为遗传转化受体,通过基因工程手段,进一步聚合优质、抗逆等其它优良性状,有望创制突破性杨树新品种。因此,'44号'抗虫黑杨遗传转化体系的建立对于优良性状聚合育种具有重要意义。

目前比较成熟的杨树遗传转化体系多为以84K杨等白杨派物种为遗传转化受体,采用的转化方法多是叶盘法,转化效率可以达到35.0%左右^[15]。此外,直接侵染愈伤组织的遗传转化方法也有报道^[16]。欧美杨107具有与'44号'抗虫黑杨相似的黑杨派遗传背景,它的遗传转化方法主要是通过叶盘法将组培苗的叶片、茎段和叶柄作为试验材料进行侵染来实现^[17-19]。然而其优化后的遗传转化体系的转化效率仅有10.0%^[20]。基因编辑技术在林木育种应用方面,需要获得等位基因都发生编辑的“纯合体”,由于遗传转化效率低下的原因,所以需要获得更多的转基因植株来进行筛选,确保筛选到理想的“纯合体”。因此,'44号'抗虫黑杨遗传转化体系的建立需要尝试新的遗传转化方法,以大幅提高转化效率。

前期利用叶盘法和愈伤组织转化的方法对'44号'抗虫黑杨进行遗传转化均未成功,诱导出不定芽很困难,但在转化过程中发现利用'44号'抗虫黑杨根系进行不定芽和愈伤组织诱导效率较高。此前有报道表明,对草本植物橡胶草(*Ficus elastica* Roxb.)和小冠花(*Passiflora foetida* L.)、块茎植物甘薯(*Ipomoea batatas* L.)、木本植物臭椿(*Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle)等的外植体根系进行侵染,可以获得阳性转基因植株^[21]。因此,本研究试图通过根系再生途径,对'44号'抗虫黑杨进行转化,以建立高效的遗传转化技术体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

本研究以1月龄的'44号'抗虫黑杨组培苗的根系和剪去根尖的根基部为材料,根系剪切成1.0 cm长的小段、根基部保留0.5~1.0 cm进行试验。试验所需农杆菌菌株采用EHA105;载体为pCambia3300-GUS,携带GUS蛋白和潮霉素筛选标记;WPM固体培养基(L449);AC(活性炭);KT、NAA用1 mol·L⁻¹ KOH溶解加无菌水分别配制成2 mg·mL⁻¹母液并4℃保存;6-BA、TDZ用1 mol·L⁻¹ KOH溶解加无菌水配制成1 mg·mL⁻¹母液并4℃保存;IBA、2,4-D用无水乙醇分别配制成1 mg·mL⁻¹、2 mg·mL⁻¹母液并4℃保存;潮霉素(H370)为Phytotech的50 mg·mL⁻¹浓度的溶液,并-20℃保存;卡那霉素用无菌水配制50 mg·mL⁻¹母液并-20℃保存,特美汀用无菌水配制200 mg·mL⁻¹母液并-20℃保存;乙酰丁香酮和利福平直接用二甲基亚砷溶解分别配制成100 mmol·L⁻¹、50 mg·mL⁻¹母液并-20℃保存。所有培养基pH调至5.9~6.0,除6-BA、2,4-D、KT、NAA激素外,其余激素和抗生素均过滤除菌。

1.2 '44号'抗虫黑杨根系再生

1.2.1 外源激素对'44号'抗虫黑杨生根的影响 将1月龄'44号'抗虫黑杨的幼苗取带顶芽的1.5~2.0 cm茎段接种到含有不同NAA(0.025~0.1 mg·L⁻¹)、IBA(0, 0.05 mg·L⁻¹)配比的生根培养基(WPM + 10 g·L⁻¹蔗糖 + 7 g·L⁻¹琼脂 + 0.1 g·L⁻¹ AC, pH 5.9)上,在2 100~2 300 lx光照条件下培养1个月,统计接种材料的生根情况,每个组合9个带顶芽茎段,共进行3次实验重复。生根率计算如下:生根率公式: $R_S = (R/N) \times 100\%$, 式中: R_S 为生根率, R 为生根的不定芽数, N 为接种的不定芽数。

1.2.2 外源激素对'44号'抗虫黑杨根系不定芽诱导的影响 选取剪切成长度2 cm左右无菌苗顶芽或茎段,扦插在生根培养基上生长1个月大小的'44号'抗虫黑杨的根系,剪切成1.0 cm的小段,放置到含有不同6-BA(0.25~0.75 mg·L⁻¹)、TDZ(0, 0.05 mg·L⁻¹)配比的分化培养基(WPM + 20 g·L⁻¹蔗糖, pH 5.9)上,在2 100~2 300 lx光照条件下培养1个月,统计芽的再生效率,共进

行 3 次实验重复。出芽率计算如下： $\gamma = (n/M) \times 100\%$ ，式中： γ 为出芽率， n 为出芽的外植体数， M 为共放置培养的外植体数。

1.3 ‘44 号’抗虫黑杨除草剂浓度的选择

选取健康、生长状态一致的‘44 号’抗虫黑杨无菌组培苗根系剪切成 0.5~1.0 cm 长度大小的根段，分别接种到含有不同浓度草铵膦（0、0.4、0.8、1.2 和 1.6 mg·L⁻¹）的分化培养基上，观察根段的生长状态和诱导出不定芽的情况。每个处理接种 18 个根段，30 d 后观察根段生长状况，统计不同浓度草铵膦培养基上根段发芽数量和褐化情况，确定草铵膦最适抑制浓度，共进行 3 次实验重复。褐化率计算如下： $R_B = (B/T) \times 100\%$ ，式中： R_B 表示褐化率， B 为褐化的外植体数， T 为共放置培养的外植体数。

1.4 农杆菌介导‘44 号’抗虫黑杨的遗传转化

1.4.1 农杆菌菌液的制备 将携带 GUS 报告基因的 pCAMBIA3300 表达载体转入农杆菌菌株 EHA105 中，涂板 2 d 后挑单菌落于 1 mL 液体 LB 培养基（卡那霉素 50 mg·L⁻¹、利福平 50 mg·L⁻¹）中，28 ℃ 下 210 r·min⁻¹ 条件下震荡过夜培养，取 200 μL 接种到 50 mL 液体 LB 培养基（卡那霉素 50 mg·L⁻¹、利福平 50 mg·L⁻¹）中继续培养 10~12 h，至菌液 OD₆₀₀ 为 0.6 左右。4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，用重悬液（WPM + 20 g·L⁻¹ 蔗糖 + 1 mg·L⁻¹ 2,4-D + 0.1 mg·L⁻¹ KT，pH 5.6）悬浮农杆菌 OD₆₀₀ 至 0.3~0.5 左右。

1.4.2 侵染与共培养 选取生长 30 d 左右，状态健康的‘44 号’抗虫黑杨无菌组培苗，对无菌组培苗进行剪切，保留根茎连接处向上茎部分 2.0 cm 左右即可，茎上如有小芽可保留，去除植株下部的根系尖端，剪去根下部后剩余根基部 0.5~1.0 cm 的部分作为侵染的外植体，将外植体直接放到 LB 菌液或重悬液中，侵染 10~15 min，用无菌滤纸吸去多余菌液，放到到共培养培养基（WPM + 20 g·L⁻¹ 蔗糖 + 7.8 g·L⁻¹ 琼脂 + 1 mg·L⁻¹ 2,4-D + 0.1 mg·L⁻¹ KT + 100 μmol·L⁻¹ AS，pH 5.9）中，24~27 ℃ 暗培养 48 h。

1.4.3 抗性根系诱导 共培养结束后，用无菌滤纸吸取根系上过多的菌液，随后将茎根基外植体移至生根培养基（WPM + 10 g·L⁻¹ 蔗糖 + 7 g·L⁻¹ 琼脂 + 1 mg·L⁻¹ 草铵膦 + 800 mg·L⁻¹ 特美汀，pH

5.9）中，2 100~2 300 lx 光照条件下进行培养，培养 10~20 d 左右，直至新的抗性根系生长到 3.0~5.0 cm 左右。

1.4.4 抗性根系不定芽诱导 将由根基部和根系剪切伤口处生长到 3.0~5.0 cm 左右的抗性根系剪切成约 1.0 cm 左右的 3 段，并将抗性根系小段移至分化培养基（WPM + 20 g·L⁻¹ 蔗糖 + 7.8 g·L⁻¹ 琼脂 + 0.6 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.06 mg·L⁻¹ NAA + 0.8 mg·L⁻¹ 草铵膦 + 800 mg·L⁻¹ 特美汀，pH 5.9）上进行不定芽的诱导，2 100~2 300 lx 光照条件下进行培养，培养 1~2 个月左右，直至新的抗性不定芽生长到 0.5~1.0 cm 左右。

1.4.5 抗性不定芽的生根 切取 1 个或相距较远的 2 个不定芽诱导生根，以保证每一个芽都来自一个独立转化事件。抗性不定芽接种到生根培养基（WPM + 10 g·L⁻¹ 蔗糖 + 7 g·L⁻¹ 琼脂 + 0.025 mg·L⁻¹ NAA + 0.05 mg·L⁻¹ IBA + 0.1 g·L⁻¹ AC + 0.8 mg·L⁻¹ 草铵膦 + 800 mg·L⁻¹ 特美汀，pH 5.9）上，2 100~2 300 lx 光照条件下进行培养，根基部和根系剪切伤口处产生的同一条根诱导产生的不定芽分别取 1 和 2 株进行接种生根。

1.5 转基因植株的检测

1.5.1 GUS 染色鉴定 GUS 染液的配制：首先，配制 20 mmol·L⁻¹ 的 Na₃PO₄（pH 7.2）：6.2 mL 的 0.2 mol·L⁻¹ 的 Na₂HPO₄ 和 3.8 mL 的 0.2 mol·L⁻¹ 的 NaH₂PO₄ 混合，并加入 88 mL 的纯水，混合后，充分溶解；然后，1 mmol·L⁻¹ 的 5-溴-4-氯-3-吲哚葡萄糖苷（X-Gluc）的配制为：100 mg 的 X-Gluc 用 1.92 mL 的 DMF 进行溶解；最后，进行混合配置总量为 100.2 mL 的使用染液：取 20 mmol·L⁻¹ 的 Na₃PO₄（pH 7.2）97 mL；1 mmol·L⁻¹ 的 K₃Fe(CN)₆ 1 mL；1 mmol·L⁻¹ 的 K₄Fe(CN)₆ 1 mL；曲拉通 X-100 (Triton X-100) 0.2 mL；1 mmol·L⁻¹ X-Gluc 1 mL。

取完整的抗性植株和野生型植株组培苗放入不同的 50 mL 离心管进行 GUS 染色鉴定，加入配制好的 GUS 染液（完全覆盖材料），用铝箔纸覆盖包住，37 ℃ 过夜染色。将染色好的材料转入 90% 酒精中脱色 2 次，再转入 75% 酒精中脱色 1 次，直至叶绿素完全溶解到酒精中。GUS 染色实时监控和追踪观察的染色方法也是此方法。

1.5.2 PCR 鉴定 提取在抗性生根培养基上生长

了 1 个月左右的抗性幼苗,同时取野生型植株和抗性植株 1.0~2.0 cm² 大小的叶片,用 CTAB 法提取 DNA,并设计抗除草剂基因的特异性引物进行 PCR 鉴定,扩增片段长度为 242 bp (bar-F: AGT CGACCGTGTACGTCTCC; bar-R: GAAGTCC AGCTGCCAGAAAC)。转化效率的计算如下: $\eta=(W/Q) \times 100\%$, 式中, η 为转化效率, W 为获得阳性植株数, Q 为接种外植体数。

1.6 数据分析

使用 Excel 2013 软件进行数据统计,使用 IBM SPSS Statistics 27 软件进行不同处理间的差异显著性分析 ($p<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 外源激素对‘44 号’抗虫黑杨的组培再生体系的影响

2.1.1 外源激素对‘44 号’抗虫黑杨生根的影响
将生长 1 个月左右的‘44 号’抗虫黑杨的幼苗取带顶芽的 1.5~2.0 cm 茎段接种到含有不同 NAA、IBA 配比的生根培养基上进行培养。结果显示,在

培养基中只添加 NAA 的生根效率总体高于同时添加 IBA 和 NAA,并且当 NAA 浓度大于或等于 0.05 mg·L⁻¹ 时,生根率随着 NAA 浓度的升高而提高;当 NAA 浓度小于或等于 0.05 mg·L⁻¹ 时,生根率随着 NAA 浓度的升高而下降 (表 1)。但是对于不同组合的生根率存在明显差异,其中在 NAA 0.025 mg·L⁻¹ 与 IBA 0.05 mg·L⁻¹ (组合 1) 浓度下,生根率和平均侧根数在 8 个组合中均是最佳效率和数量,因此,处理 1 (NAA 0.025 mg·L⁻¹, IBA 0.05 mg·L⁻¹) 是最适宜‘44 号’抗虫黑杨生根的生长素浓度。同时,根据主根和侧根的生长情况,发现,当 NAA 浓度小于 0.075 mg·L⁻¹ 时,侧根数量随着 NAA 浓度的升高而升高 (表 1)。在处理 1 条件下,侧根数量达到最多,同时生根率也达到最高,达到 75.00% (表 1)。在处理 7 条件下,主根数量达到最多,并且侧根数量也相对较高 (表 1)。以上结果表明,最优的生根培养基为 WPM + 10 g·L⁻¹ 蔗糖 + 0.025 mg·L⁻¹ NAA + 0.05 mg·L⁻¹ IBA + 0.1 g·L⁻¹ AC 和 WPM + 10 g·L⁻¹ 蔗糖 + 0.075 mg·L⁻¹ NAA + 0.1 g·L⁻¹ AC, pH=5.9 (表 1)。

表 1 生根培养基筛选
Table 1 Selection of optimal rooting induction media

处理 Treatments	外源激素 Exogenous hormone/(mg·L ⁻¹)		生根率/% Rooting frequency	平均主根数量/支 Average quantity of primary root/branches	平均侧根数量/支 Average quantity of lateral root/branches
	NAA	IBA			
1	0.025	0.05	75.00 ± 0.25	1.67 ± 0.47ab	22.67 ± 10.21a
2	0.050	0.05	50.00 ± 0.35	1.00 ± 0.00ab	1.33 ± 0.94b
3	0.075	0.05	25.00 ± 0.25	0.67 ± 0.47ab	0.00 ± 0.00b
4	0.100	0.05	37.50 ± 0.41	1.00 ± 0.82ab	3.00 ± 2.16b
5	0.025	0	62.50 ± 0.22	1.67 ± 0.94ab	2.00 ± 1.41b
6	0.050	0	37.50 ± 0.41	0.67 ± 0.47b	1.67 ± 1.25b
7	0.075	0	62.50 ± 0.41	2.67 ± 0.94a	18.33 ± 9.57a
8	0.100	0	75.00 ± 0.25	1.67 ± 0.47ab	16.67 ± 6.94a
	<i>F</i>		0.949	3.079	5.001
	<i>P</i>		0.489	0.019	0.001

注: 基于 LSD 显著性差异分析, 数据为 3 组生物学重复的平均值 ± 标准误差; 不同字母表示在 $p<0.05$ 水平差异显著。下同
Note: Significant difference analysis based on LSD, Values represent means ± standard error of three replicates, Different letters indicate statistically significant differences at the $p<0.05$ level. The same below

2.1.2 外源激素对‘44 号’黑杨根段诱导不定芽分化的影响
选取剪切成长度 2 cm 左右无菌苗顶芽或茎段, 扦插在生根培养基上生长 1 个月大小的‘44 号’抗虫黑杨的根系, 剪切成 1.0 cm 大小的小段, 放置到含有不同 6-BA、NAA、TDZ 配比的

化培养基上进行培养。试验显示: 在不同激素配比的培养基上, 不定芽出芽效率最高的是 4 号配比 (6-BA 为 0.25 mg·L⁻¹, TDZ 为 0 mg·L⁻¹, NAA 为 0.05 mg·L⁻¹), 其出芽率达到了 86.67%; 其次是 5 号, 其出芽率为 73.33% (表 2)。同时通过实

验发现不添加 TDZ 更有利于‘44 号’抗虫黑杨根系的不定芽诱导，TDZ 的添加并没有出现出芽率提升的结果，并且出芽率降低，并且随着 6-BA 的升高出芽率不断降低，可能是由于根系细胞已经具有很强的生长和分裂活性，不需要外源添加细胞分裂

素来促进根系的不定芽的诱导。综合以上结果，‘44 号’抗虫黑杨最佳不定芽诱导培养基为 WPM + 20 g·L⁻¹ 蔗糖 + 7.8 g·L⁻¹ 琼脂 + 0.25 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.05 mg·L⁻¹ NAA，pH=5.9。

表 2 激素配比对‘44 号’黑杨根段芽诱导率的影响
Table 2 Effects of different culture media on shoot induction

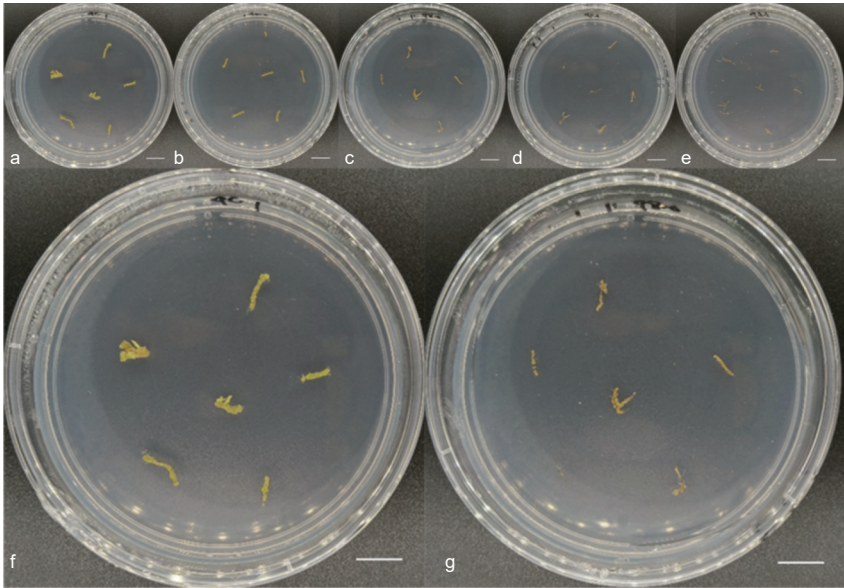
处理 Treatment	外源激素/(mg·L ⁻¹) Exogenous hormone			出芽率/% Shoot regeneration frequency
	6-BA	NAA	TDZ	
1	0.25	0.05	0.05	60.00 ± 0.16abc
2	0.50	0.05	0.05	46.67 ± 0.09bc
3	0.75	0.05	0.05	26.67 ± 0.09c
4	0.25	0.05	0.00	86.67 ± 0.19a
5	0.50	0.05	0.00	73.33 ± 0.09ab
6	0.75	0.05	0.00	46.67 ± 0.25bc

注：基于出芽率进行显著性差异分析；出芽率为3组生物学重复的平均值 ± 标准误差
Notes: Significant difference analysis based Shoot regeneration frequency, Values represent means ± standard error of three replicates

2.2 除草剂草铵膦浓度的选择

在含有 0.4、0.8、1.2 和 1.6 mg·L⁻¹ 草铵膦的分化培养基上培养 30 d 以筛选不定芽诱导的最适草铵膦浓度。结果显示：在不定芽诱导阶段，当草铵膦浓度在 0.8 mg·L⁻¹ 以下时，根段会发生膨

大，可以正常诱导出不定芽（图 1a、f）；当草铵膦为 0.8 mg·L⁻¹ 时，根段膨大被明显抑制（图 1c、g），同时不定芽诱导也受到明显抑制，不能诱导出芽（图 1b~e）；而当草铵膦浓度大于 0.8 mg·L⁻¹ 时，外植体根段几乎不膨大，无法正常诱导出不定



注：a:未添加草铵膦培养基培养 30 d；b~e：在草铵膦浓度分别为 0.4, 0.8, 1.2 和 1.6 mg·L⁻¹ 的培养基培养 30 d；f：图 a 的局部放大；g：图 c 的局部放大。比例尺表示 1 cm

Notes: a: Induction of adventitious shoots in medium without glufosinate-ammonium supplementation for 30 days; b-e: Roots was cultured for 30 days with concentrations of 0.4, 0.8, 1.2 and 1.6 mg·L⁻¹ glufosinate-ammonium; f: Magnified portion of image a; g: Magnified portion of image c.Bar = 1 cm

图 1 不同草铵膦浓度条件下不定芽的诱导情况
Fig. 1 Induction of adventitious shoots at different glufosinate-ammonium concentrations

芽, 并开始出现褐化的情况 (图 1c~e)。以上研究结果表明, 不定芽诱导过程中草铵膦最适筛选浓度为 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右 (表 3)。

表 3 草铵膦浓度对根段出芽的影响

Table 3 Effect of phosphine oxalammonium on sprout growth in root segment

草铵膦浓度/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	不定芽产生效率/%	根段褐化率/%
Phosphine oxalammonium concentration	Adventitious bud production efficiency	Browning root segments frequency
0.0	27.8 ± 0.08	$0.00 \pm 0.00\text{ d}$
0.4	0.00 ± 0.00	$0.00 \pm 0.00\text{ d}$
0.8	0.00 ± 0.00	$61.1 \pm 0.08\text{ c}$
1.2	0.00 ± 0.00	$88.9 \pm 0.08\text{ b}$
1.6	0.00 ± 0.00	$100.00 \pm 0.00\text{ a}$

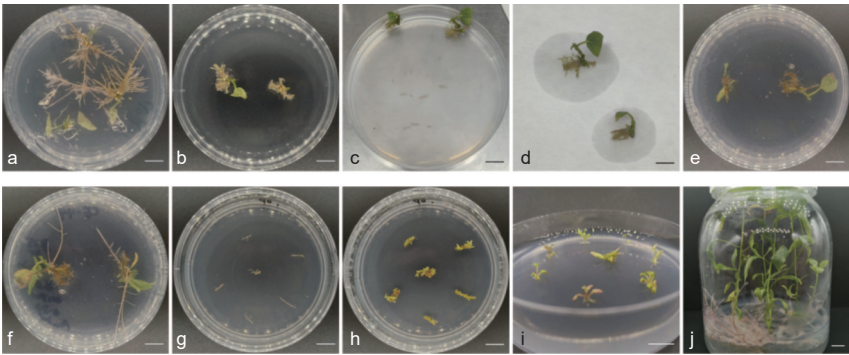
注: 基于出芽率进行显著性差异分析; 出芽率为3组实验重复的平均值 $\pm$ 标准误差; 不同字母表示在 $p<0.05$ 水平差异显著
Notes: Significant difference analysis based on shoot regeneration frequency. Values represent means $\pm$ standard error of three replicates. Different letters indicate statistically significant differences at the $p<0.05$ level

2.3 农杆菌介导的‘44 号’抗虫黑杨遗传转化及转基因植株分子检测

如图 2 所示选取生长至 1 个月左右的‘44 号’抗虫黑杨, 剪掉根系尖端, 留 $0.5\sim1.0\text{ cm}$ 的根基部进行农杆菌侵染; 侵染 $10\sim15\text{ min}$ 后, 无菌滤纸吸干净材料上残留的菌液; 共培养基上暗培养 48 h 后, 外植体边缘长出农杆菌, 用无菌滤纸吸除多余的农杆菌后放到到 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的草铵膦生根培养基中再生抗性根; 培养 $10\sim20\text{ d}$ 后, 抗性根系长度达到 $3.0\sim5.0\text{ cm}$; GUS 染色实时监控和追踪观察能够快速的判断转化情况, 如在完成侵染后的染色或共培养结束后的染色或侵染完成后进行再生根后新生根系的染色等, 新生的根系为阳性时, 整个

根系表现为阳性, 快速确定侵染条件优劣 (图 3); 抗性根系剪切成 1.0 cm 左右大小的根段, 转移到 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的草铵膦分化培养基中, $1\sim2$ 个月后可产生不定芽; $0.5\sim1.0\text{ cm}$ 左右大小的不定芽转移至 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的草铵膦生根培养基, 1 周左右生根。从农杆菌侵染根基部至产生抗性不定芽需要约 $2\sim3$ 个月时间。

采用 GUS 染色检测了阳性转化植株, 如图 4 所示, GUS 染色后, 转基因植株可以观测到明显的 GUS 信号, 与之相反, 未转基因植株没有检测到 GUS 信号 (图 4a、b)。随后, 利用特异性引物通过 PCR 扩增草铵膦抗性基因的片段, 进一步鉴定转基因阳性植株。共检测了 31 个外植体

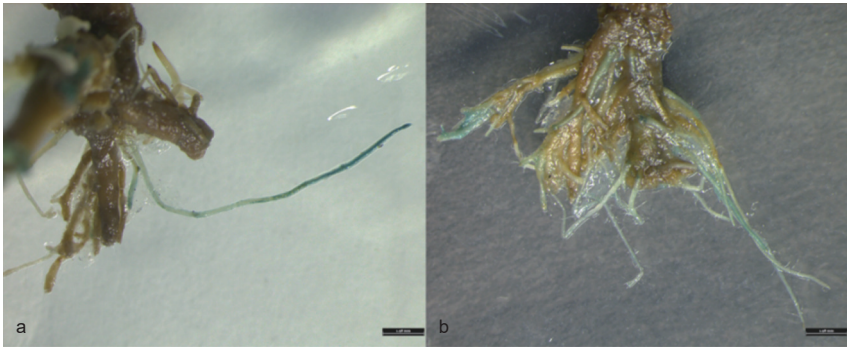


注: a: ‘44 号’抗虫黑杨组培苗的根部; b: 作为外植体的茎根连接处; c: 农杆菌悬液侵染根系; d: 侵染完成后用滤纸吸干水分; e: 放置到诱导生根培养基上进行培养; f: 抗性根产生; g: 抗性根段诱导不定芽; h: 不定芽产生; i: 抗性不定芽上生根; j: 再生植株。比例尺表示 1 cm

Notes: a: Root of *P. deltoides* cl. ‘Danhong’ $\times$ *P. nigra* ‘44’; b: The adjacent segment of stem and root tips were cut while the $0.5\sim1.0\text{ cm}$ root was left; c: The root was infected with *Agrobacteria* cells; d: After infection, the water was blotted with filter paper; e: The root was placed onto rooting induction media; f: Resistance root generation; g: Resistant root placed onto differentiation culture media; h: Adventitious bud production; i: Root regeneration; j: Positive adventitious buds. Bar = 1 cm

图 2 农杆菌介导的‘44 号’抗虫黑杨遗传转化流程

Fig. 2 *Agrobacterium* mediated genetic transformation process of *P. deltoides* cl. ‘Danhong’ $\times$ *P. nigra* ‘44’



注：a:根茎连接处长出的新根；b：根切口处长出的新根。比例尺表示 1.98 mm

Notes: a: new roots grown from the connection of root and stem; b: New roots from the cut roots. Bar = 1.98 mm

图 3 侵染后长出新根的 GUS 染色图

Fig. 3 GUS staining of new roots after infection

获得的再生植株，其中，能够 GUS 染色和扩增出草铵膦抗性基因片段的植株为 9 株，可确认为转化成功植株。每次接种的根段数为 16 个，根据所获

得的阳性植株的株数来计算转化效率^[22]，转化效率为 29.0%（图 4c）。



注：a:阳性植株 GUS 染色；b：野生型植株作为阴性对照的 GUS 染色；c：PCR 检测结果；M：2 000 bp Marker；1：pCambia3300 质粒为模板作为阳性对照；2~10：抗性植株叶片 DNA 为模板；11：野生型的叶片 DNA 为模板作为阴性对照；12：ddH₂O 为模板的阴性对照。比例尺表示 1 cm

Notes: a: The transformed plants; b: Non-transgenic plant; c: PCR detection results; M: 2000 bp marker; 1: Sample using pCambia3300 as PCR template; 2~10: Sample using leaf DNA from bialaphos-resistant plants as PCR template; 11: Sample using leaf DNA from non-transgenic plant as PCR template; 12: Sample using ddH₂O as PCR template. Bar=1 cm

图 4 GUS 染色结果与 DNA PCR 检测

Fig. 4 GUS staining and PCR detection

3 讨论

3.1 高效稳定的‘44 号’抗虫黑杨组培再生体系

分子育种经过多年的发展，已经在品种改良和优良性状聚合方面展现出良好的发展势头，如水稻淀粉品质的改良^[23-25]，林木抗病、抗虫、耐干旱和木材性质改良^[26-27]，抗食叶害虫转基因杨树品种进

入环境释放及商业化应用阶段^[5]等等。黑杨作为我国杨树人工林主要造林树种^[2-4]，具有多种优良性状。但是黑杨的遗传转化困难、效率低下、周期长^[28-30]，限制了黑杨基因工程育种的发展。本研究以‘44 号’抗虫黑杨根为外植体，先诱导不定根再诱导不定芽，建立了高效的遗传转化体系，为后期通过基因工程技术将外源基因整合到已经具有多种优

良性状的'44号'抗虫黑杨中,实现多种优良性状聚合奠定了基础。

在植物组织培养中,植物激素发挥重要作用,如 NAA 能够有效诱导生根,KT、ZT、IBA、IAA 等对不定芽的诱导有一定作用,6-BA、NAA 和 GA 则对珠心、胚珠培养物的生根有良好的作用,相反,2,4-D 对芽和根的诱导有抑制作用^[31]。同时,还有一些不常用的激素,如乙烯和脱落酸(ABA)可以控制生根过程,乙烯和 ABA 可以抑制植物细胞的伸长^[32-35]。在本研究中,通过设置不同激素配比的培养基来探索适合'44号'抗虫黑杨根系不定芽诱导和转基因苗生根的培养基。TDZ 是一种人工合成的多功能植物激素,被广泛应用于木本植物,认为能够促进不定芽的增殖和愈伤组织的形成^[36-37]。在不定芽的诱导过程中,保持 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 的比例不变,通过是否添加 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ 搭配 0.25、0.5、 $0.75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 的浓度梯度筛选最佳的不定芽诱导培养基。本研究发现添加 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ 不仅不能促进不定芽的诱导反而有抑制作用,推测原因可能是培养基中添加的 6-BA 和 NAA,或者根中内源激素水平,已经可以满足根段不定芽诱导的需求,再添加 TDZ 后致使激素浓度过高,打破不定芽诱导的激素需求平衡,过多的细胞分裂素导致细胞增值反而不利于芽的分化。在不添加 TDZ 的情况下,出芽率随着 6-BA 浓度的提高而降低,且 $0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 6-BA 可以有效促进不定芽的产生,效率可高达 86.7%。不定芽生根是完整植株的最后一步,该过程中细胞分裂素与生长素具有相反的作用,前者抑制而后者促进,两者之间比例关系的变化会产生不同的作用^[38-40]。如在矾根扦插生根过程中,单一的 IBA 就能够很好的促进生根^[41],而半夏组培苗的生根则是 IBA 和 NAA 按照一定比例才能够达到最理想的生根效果^[42]。本研究通过是否添加 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 配合 0.025、0.05、 0.075 、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 的浓度梯度来筛选最佳的诱导不定芽生根培养基。发现不管是否添加 IBA,不定芽生根均随 NAA 含量的增加先降低后升高。但在 IBA 存在时, $0.025\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 就能有效促进生根,而当 IBA 不存在时, $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 才能促进不定芽高效生根,反映出 IBA 的存在能够促进'44号'抗虫黑杨根系 NAA 诱导的不定芽生根。值得一提的是,优

化后'44号'抗虫黑杨根系不定芽的生根率可提高到 75.0%。

3.2 '44号'抗虫黑杨遗传转化体系的建立

植物的遗传转化要高效获得转基因阳性植株,抗性筛选压的确定至关重要,抗性筛选试剂浓度过高不利于不定芽的诱导及芽的正常生长,过低不能有效筛选出抗性植株。草铵膦是一种在世界范围内广泛使用的内吸型除草剂,具有广谱、高效和低毒的特点,利用草铵膦进行抗性筛选已经在油菜、蓖麻和杨树等多种植物上进行,不同植物对草铵膦的抗性存在较大差异^[43-45],如在 84k 杨中筛选压浓度范围在 $2\sim 8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[44],相较于黑杨浓度 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 偏高。本研究中所用载体携带的 BAR 基因是一种抗草铵膦的基因,来自于土壤细菌吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*),可以使植物体内的草铵膦自由氨基乙酰化从而降低草铵膦毒性^[46]。本研究发现草铵膦对根段不定芽的诱导具有显著的抑制作用,在浓度 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,添加了草铵膦的根段均未出芽。表明草铵膦对根段不定芽的诱导具有很强的抑制作用,这与已报道的草铵膦对 84K 杨叶片不定芽诱导的影响具有相似性,但不像对根段抑制的这么强烈,当浓度升到 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时才会出现完全抑制的情况^[44]。

本研究成功建立了抗虫'44号'黑杨根段侵染的遗传转化方法。杨树中常用的叶盘法和愈伤组织转化方法,在叶和愈伤组织获取阶段就需要 1~2 个月时间,而根段侵染遗传转化方法所用的根系材料丰富,仅需茎诱导 7~10 d。根段还具有较强的补充损伤或干细胞再生的潜力^[47],细胞全能性的特性突出,可以作为较好的受体材料。另外,在侵染完成后,根段不定芽产生较快,在分化培养基上仅需 1~2 个月就可产生不定芽,整个遗传转化周期可控制在 3 个月左右,且较之前报道的黑杨遗传转化方法^[19]平均阳性率提升接近 30.0%。黑杨通常被认为难以进行遗传转化、转化效率低下^[20],本研究建立的遗传转化方法克服了这一难题,可以为后续其他黑杨品种以及难转化的木本植物遗传转化体系的建立和优化提供思路。值得一提的是,根系侵染具有不受外植体材料生长环境限制、转化后生长快、鉴定和检测方便以及不定芽产生快等优势。

本研究中使用 GUS 基因作为转化材料的指示,能够稳定高效表达,且不需要借助特定的设备^[48-49]。表达蛋白的表达载体以方便在遗传转化的

前期和后期对转基因材料进行鉴定,快速获取转化的根用于芽的诱导,即在遗传转化的早期,就可采用 GUS 染色对侵染后的根系进行鉴定,不仅可以对转化效率进行随时判断,而且可以取一部分侵染根段 GUS 染色进行初筛,选择阳性的根开展后续的不定芽诱导及植株再生,有效减少了转基因植株的假阳性。因此,在‘44 号’黑杨遗传转化体系建立中 GUS 报告基因的应用不仅保证了转化的效率,而且为阳性鉴定提供了快速、方便的方法。

4 结 论

本研究建立了‘44 号’抗虫黑杨基于根段的组培再生体系,诱导茎段生根率达到 75.00%,根段出芽率达到 86.67%,为黑杨和其他难以进行组织培养的木本植物提供新的外植体选取思路和有效的技术支撑。同时,建立了农杆菌介导的‘44 号’抗虫黑杨遗传转化体系,确定了最适的草铵膦筛选浓度,转化效率达到 29.0%,为黑杨的基因功能研究、基因聚合育种提供了关键技术体系,也为其他木本植物在克服遗传转化瓶颈的关键环节提供了参考。

参考文献:

- [1] 方升佐. 中国杨树人工林培育技术研究进展 [J]. 应用生态学报, 2008, 19(10): 2308-2316.
- [2] 苏晓华, 丁昌俊, 马常耕. 我国杨树育种的研究进展及对策 [J]. 林业科学研究, 2010, 23(1): 31-37.
- [3] 陈 存, 丁昌俊, 黄秦军, 等. 美洲黑杨表型和生理性状多样性及群体结构分析 [J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(6): 1-12.
- [4] FAHRENKROG A M, NEVES L G, RESENDE M F R Jr, *et al.* Population genomics of the eastern cottonwood (*Populus deltoides*) [J]. *Ecol Evol*, 2017, 7(22): 9426-9440.
- [5] 郑均宝, 梁海永, 高宝嘉, 等. 转双抗虫基因 741 毛白杨的选择及抗性 [J]. 林业科学, 2000, 36(2): 13-19 + 129.
- [6] 高 萍, 贝纳新, 李浩戈. 抗虫转基因杨树的培育及其抗性初步研究 [J]. 林业科技, 2008, 33(5): 25-27.
- [7] 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.
- [8] WANG G J, CASTIGLIONE C, CHEN Y, *et al.* Poplar (*Populus nigra*L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genomic analysis [J]. *Transgenic Research*, 1996, 5(5): 289-301.
- [9] HU J J, WANG L J, YAN D H, *et al.* Research and application of transgenic poplar in China [M]. Netherlands: Springer, 2014.
- [10] 胡建军, 杨敏生, 卢孟柱. 我国抗虫转基因杨树生态安全性研究进展 [J]. 生物多样性, 2010, 18(4): 336-345.
- [11] 张春玲, 李淑梅, 赵自成, 等. 杨树新品种‘丹红杨’ [J]. 林业科学, 2008, 44(1): 169.
- [12] 贾会霞, 孙 佩, 李建波, 等. 丹红杨 × 转 *BtCry1Ac* 欧洲黑杨杂交子代抗虫性及生长量测定 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(10): 4101-4109.
- [13] 苏晓华, 黄秦军, 张冰玉, 等. 中国杨树良种选育成就及发展对策 [J]. 青海农林科技, 2004(S1): 30-32 + 54.
- [14] 王桂英, 杨敏生, 霍雪梅, 等. 741 杨双 Bt 基因的遗传转化及转基因株系的抗虫性 [J]. 林业科学, 2012, 48(9): 42-49.
- [15] 李科友, 樊军锋, 赵 忠, 等. 84K 杨再生和遗传转化体系的优化 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2007, 35(7): 90-96.
- [16] 张炜林, 赵岩秋, 卢孟柱. 杨树愈伤组织转化体系优化及 *PtKNLPa* 遗传转化 [J/OL]. 分子植物育种, 2023, 1-11 [2024-06-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20221104.1808.019.html>.
- [17] 牛庆霖, 王 迎, 罗 磊, 等. 欧美杨 107 杨 β -1, 3-葡聚糖酶 (BG2) 基因遗传转化及对溃疡病的抗性分析 [J]. 林业科学, 2013, 49(11): 60-66.
- [18] REN Y C, ZHOU X L, DONG Y, *et al.* Exogenous gene expression and insect resistance in dual bt toxin *Populus × euramericana* ‘Neva’ transgenic plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 660226.
- [19] ZHOU X L, REN Y C, WANG S J, *et al.* T-DNA integration and its effect on gene expression in dual *Bt* gene transgenic *Populus × euramericana* cv. Neva [J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 178: 114636.
- [20] 王 玲, 段红平, 田 敏. 美洲黑杨遗传转化系统优化的研究 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 2011, 26(4): 519-523.
- [21] CAO X S, XIE H T, SONG M L, *et al.* Cut-dip-budding delivery system enables genetic modifications in plants without tissue culture [J]. *The Innovation*, 2023, 4(1): 110345.
- [22] SONG C W, LU L, GUO Y Y, *et al.* Efficient *agrobacterium*-mediated transformation of the commercial hybrid poplar *Populus Alba × Populus glandulosa* Uyekii [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(10): 2594.
- [23] 刘巧泉, 王宗阳, 陈秀花, 等. 反义 *waxy* 基因转化水稻降低胚乳直链淀粉含量的研究 [C]. 中国农学会水稻遗传育种国际学术讨论会. 中国农学会, 1999.
- [24] RIE T, MIDORI N, MASAYUKI I, *et al.* Antisense *Waxy* genes with highly active promoters effectively suppress *Waxy* gene expression in transgenic rice [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2000, 41(7): 881-888.
- [25] 陈秀花, 刘巧泉, 王宗阳, 等. 反义 *Wx* 基因导入我国籼型杂交稻重点亲本 [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47(9): 684-688.
- [26] 周贤武, 高玉磊, 苏明奎, 等. 基因工程改良木材性质研究进展 [J]. 林业科学, 2018, 54(3): 152-160.
- [27] HU W J, HARDING S A, LUNG J, *et al.* Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees [J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(8): 808-

- 812.
- [28] HAN K H, MEILAN R, MA C, *et al.* An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*)[J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19(3): 315-320.
- [29] 陈赢男, 胡传景, 诸葛强, 等. 杨树农杆菌遗传转化研究 30 年 [J]. *林业科学*, 2022, 58(12): 114-129.
- [30] CONFALONIERI M, BALESTRAZZI A, CELLA R. Genetic transformation of *Populus deltoides* and *P. x euramericana* clones using *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 1997, 48(1): 53-61.
- [31] 胡 蓉. 植物激素在组织培养中的作用 [J]. *川北教育学院院刊*, 1989(1): 44-47.
- [32] GONZÁLEZ A, RODRÍGUEZ R, SÁCHEZ TAMÉS R. Ethylene and in vitro rooting of hazelnut (*Corylus avellana*) cotyledons[J]. *Physiologia Plantarum*, 1991, 81(2): 227-233.
- [33] MUDGE, KENNETH W. Effect of ethylene on rooting[J]. *Advances in Plant Sciences*, 1988: n. pag.
- [34] 杨思佳, 于晓跃, 史宝胜. 紫叶李嫩枝扦插生根过程中生理生化指标分析 [J]. *新疆农业大学学报*, 2018, 41(1): 18-24.
- [35] BLAKE T J, ATKINSON S M. The physiological role of abscisic acid in the rooting of poplar and aspen stump sprouts[J]. *Physiologia Plantarum*, 1986, 67(4): 638-643.
- [36] CHENG Z J, ZHU S S, GAO X Q, *et al.* Cytokinin and auxin regulates *WUS* induction and inflorescence regeneration in vitro in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(8): 927-333.
- [37] AHMAD N, FAISAL M. Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator[M]. 2018: 61-94.
- [38] 许智宏, 张宪省, 苏英华, 等. 植物细胞全能性和再生 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(10): 1282-1300.
- [39] LIU J L, MOORE S, CHEN C L, *et al.* Crosstalk complexities between auxin, cytokinin, and ethylene in arabidopsis root development: from experiments to systems modeling, and back again[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(12): 1480-1496.
- [40] MAO C J, HE J M, LIU L N, *et al.* OsNAC2 integrates auxin and cytokinin pathways to modulate rice root development[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(2): 429-442.
- [41] 李冠男, 王宝春, 张庆霞, 等. 半夏组培苗的生根与移栽技术 [J]. *农业技术与装备*, 2023(1): 5-6 + 9.
- [42] 杨 贞, 张永春, 李 心, 等. 不同浓度生长调节剂对砧根扦插生根的影响 [J]. *上海农业学报*, 2023, 39(1): 66-71.
- [43] 吴潞梅, 覃 萍, 闫 彤, 等. 抗草铵膦除草剂转基因油菜新种质的创制及鉴定 [J]. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(6): 1696-1708.
- [44] 张 静. 杨树再生体系的建立及 *Bar* 基因转化的研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2005.
- [45] 李思琪, 王怡婷, 于 耸, 等. 抗草铵膦基因 *bar* 遗传转化蓖麻 [J]. *分子植物育种*, 2023, 21(6): 1899-1905.
- [46] THOMPSON C J, MOVVA N R, TIZARD R, *et al.* Characterization of the herbicide- resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*[J]. *The EMBO Journal*, 1987, 6(9): 2519-2523.
- [47] BISHT A, EEKHOUT T, CANHER B, *et al.* PAT1-type GRAS-domain proteins control regeneration by activating DOF3.4 to drive cell proliferation in Arabidopsis roots[J]. *The Plant Cell*, 2023, 35(5): 1513-1531.
- [48] HASELOFF J, SIEMERING K R. The uses of green fluorescent protein in plants, In: Chalfie M, Kain S R. eds. *Green fluorescent protein: properties, applications and protocols* [M]. 2 rd. New York: Wiley-Liss, 1998: 191-220.
- [49] 杨丹丹, 王俊杰, 梁卫红. GUS 报告系统在植物基因功能研究中的应用和优化 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(8): 761-768.

Establishment of Regeneration Tissue Culture and Genetic Transformation System by Roots of *P. deltoides* cl. 'Danhong' × *P. nigra* cl. '44'

YANG Song¹, SONG Xue-qin², ZHAO Shu-tang², HU Jian-jun², LU Meng-zhu¹

(1. Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: [Objective] *P. deltoides* cl. 'Danhong' × *P. nigra* cl. '44' was used to establish an efficient and stable regeneration tissue culture system and genetic transformation system for black poplars (*P. deltoides* × *P. nigra*), based on the roots as explants. [Method] The 0.5~1.0 cm root segments from clone '44' seedlings were used to induce adventitious buds. The effects of different hormone ratios on the induction and rooting of adventitious buds were investigated and the critical screening concentration of phosphine oxalate for genetic transformation of the root segments was explored. *Agrobacterium*-mediated method was employed to introduce foreign genes into the clone '44' root cells, and the transformed seedlings were identified by β -glucuronidase staining. [Result] The optimal medium for bud differentiation of clone '44' was WPM + 20 g·L⁻¹ sucrose + 7.8 g·L⁻¹ agar + 0.25 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.05 mg·L⁻¹ NAA, and the differentiation rate was 86.67%. The optimal medium for seedling rooting was WPM + 0.075 mg·L⁻¹ NAA + 7 g·L⁻¹ agar + 0.1 g·L⁻¹ AC, and the rooting rate was 75.00%. The optimal genetic transformation screening concentration for glyphosate resistance in roots was determined to be 0.8 mg·L⁻¹ through a gradient test. Exogenous genes were introduced into roots by *Agrobacterium*-mediated method, and the specific PCR primers were designed for identification of the transgenic lines. Nine transgenic plants were obtained from 31 explants, with a transformation efficiency of 29.0%. [Conclusion] The efficient regeneration and genetic transformation system for clone '44' has been established, which provides a technical support for transformation of black poplar species and adding excellent traits through genetic transformation to clone '44' in particular.

Keywords: insect-resistant *P. deltoides* cl. 'Danhong' × *P. nigra* cl. '44'; *P. deltoides*; *P. nigra*; root infection; genetic transformation; regeneration tissue culture; GUS staining

(责任编辑: 张 研)