

杨树组织培养研究进展

白玉娥, 乌日罕, 代金玲, 乌云塔娜

(内蒙古农业大学林学院, 呼和浩特 010019)

摘要: 杨属树种具有分布广、适应性强、生长迅速、再生能力强、木质好及基因组相对较小等特性, 是我国重要的造林树种。组织培养技术作为现代生物技术的重要组成部分, 在杨属树种中应用广泛, 为其遗传转化, 产业化繁殖提供了有效的途径。综述杨树组织培养的研究概况和应用进展, 提出杨树组织培养研究和应用过程中存在的问题和研究展望, 以期为杨树的林业生产、园林绿化和育苗工作提供参考。

关键词: 杨树; 植物组织培养; 外植体; 培养条件

中图分类号: S792.11

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)03-0466-05

Research progress on tissue culture of poplar

BAI Yu'e, WU Rihan, DAI Jinling, WUYUN Tana

(College of Forestry, Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019)

Abstract: *Populus* species are important afforestation tree species characterized by high suitability, rapid growth rate, strong regeneration, good woodiness and relatively small genome. As an important component of biotechnology, tissue culture is widely employed in cultivating *populus* species, which provide the possibility for their genetic improvement and industrializing propagation. The paper reviewed research overview and application progress, and pointed out problems in inducing process of tissue culture of poplar, so as to provide references for forestry production, landscaping and seedling breeding of poplar.

Key words: poplar; plant tissue culture; explants; culture conditions

杨树是杨柳科 (Salicaceae) 杨属 (*Populus* L.) 树种的统称, 具有分布广泛、生长迅速、适应性强、再生能力强及基因组相对较小等特性^[1]。目前, 我国杨树人工林种植面积居世界首位, 已有 30 个优良品种被规模化应用于全国 26 个省市。杨树已成为中国乃至世界上重要的造林绿化、工业用材树种^[2]。杨树组织培养技术萌芽于 1934 年, 法国学者 Gautheret 等最先通过培养欧洲黑杨 (*P. nigra* L.) 形成层, 成功获得了其愈伤组织^[3]。1964 年, 美国学者 Mathes 通过接种美洲山杨 (*P. tremuloides* Michx.) 茎外植体获得了愈伤组织, 并诱导出根和茎^[4]。1968 年, 英国学者 Wolter^[5]和 Chalupa^[6]先后通过改良培养基也成功诱导出美洲山杨的根和茎。20 世纪 70 年代中国开始了杨树组织培养的研究, 目前该技术已达到一定水平, 在五大派系黑杨派 (Sect *Aigeiros*

Duby)、白杨派 (Sect *Leuce* Duby)、青杨派 (Sect *Tacamahaca* Spech)、大叶杨派 (Sect *Leucoides* Spech) 和胡杨派 (Sect *Turanga* Bag) 中建立了多个树种的离体再生体系^[7]。为此, 作者综述近年来杨树组织培养技术的研究概况及应用进展, 以期为杨树的林业生产、园林绿化和育苗工作提供参考。

1 外植体的选择

1.1 外植体的来源

杨树组织培养中, 叶片、茎段、根、腋芽、顶芽、胚珠、原生质体等均可作为外植体材料。辛培尧等^[8]研究发现, 以滇杨 (*P. yunnanensis* Dode.) 叶片、叶柄、嫩茎为外植体诱导不定芽时, 叶柄所需诱导时间短且诱导率最高。张平冬等^[9]用胡杨 (*P. euphratica* Oliv.) 的茎段、叶片、嫩根和茎段愈伤组

收稿日期: 2018-10-23

基金项目: 西北地区杨树主栽品种高效、安全、规模化遗传转化体系研究 (2018ZX08020002-005-005) 项目资助。

共同第一作者简介: 白玉娥, 教授, 博士生导师。E-mail: bye666@163.com 乌日罕, 硕士研究生。E-mail: 1609302811@qq.com

织诱导不定芽, 试验结果显示茎段诱导效果最佳, 诱导率为 100%。邢亚娟等^[10]在中美山杨 (*P. davidiana* × *P. tremuloides*) 的芽分化研究中, 发现带腋芽的嫩茎是最佳的外植体, 分化率高达 97.5%。也有研究发现, 即使同一植株相同器官, 由于其生理状态及发育年龄不同, 诱导分化的效果存在很大的差异, 通常外植体越幼嫩, 再生能力越强^[11]。而汪玲和项艳^[12]的研究结果表明, 725 杨 (*P. deltoides* cl. '725') 幼叶比刚抽出来的嫩叶产生愈伤组织的能力强, 可能是由于嫩叶发育不完全, 易被消毒剂毒害, 且容易褐化, 导致了出愈率的降低。因此, 外植体的选择需要从植物取材部位、外植体的生理状态及发育年龄等多方面加以考虑。

1.2 外植体的消毒

组织培养过程中外植体的消毒是影响组织培养成败的一个关键环节。选择的消毒剂既要使表面的微生物彻底杀死, 又要易于清洗或能够自行分解, 还要尽可能的保护外植体组织和表层细胞。常见的消毒剂有酒精 (70%~75%, 5~60 s)、次氯酸钠溶液 (2% NaClO, 5~30 min)、氯化汞溶液 (0.1%~1% HgCl₂, 2~10 min) 和双氧水 (3%~10% H₂O₂, 5~15 min) 等。沈周高等^[13]对中林 2001 杨 (*P. deltoides* cv. 'zhonglin')、南林 95 杨 (*P. deltoides* Bartr. cv. Lux × *P. euramericana* (Dode) Guineir cv. I-45/51) 和南抗杨 (*P. deltoides* cl. Nankang) 3 个品种的杨树用 0.1%、0.2% 及 0.3% 的 HgCl₂ 溶液分别消毒 2、4、6 和 8 min, 最后得出 HgCl₂ 浓度与材料的污染率、出愈率呈反比, 使用 0.1% HgCl₂ 溶液, 消毒 4 min 效果最佳。黄枝英等^[14]以台湾速生杨 (*P. Taiwan*) 嫩茎为材料, 用 0.1% 和 0.15% 的 HgCl₂ 溶液分别消毒 10 和 15 min, 最后得出使用 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 10 min 时, 消毒效果最好, 此时污染率为 23.3%, 出芽率为 75.3%。不同外植体材料对消毒剂的敏感性不同, 通常茎尖、茎段消毒时间比叶片所用时间长^[7]。因此, 在实际操作过程中, 要根据外植体大小、采集部位及发育年龄等因素选择适合的消毒剂和消毒时间。

2 培养基和培养条件的选择

2.1 培养基

选择适合的培养基是组织培养成功的前提。李慧等^[15]在试验中比较了毛白杨 (*P. tomentosa*) 30 号和 02-9-22 号在 MS、1/2 MS 和 1/4 MS 培养基上芽的诱导情况, 结果显示 MS 培养基上两种毛白杨腋芽诱导率最高。付成华^[16]以南方常绿杨 (*P. del-*

toids 60/160 × *P. nigra* 'chile') 叶柄为外植体接种到 MS、1/2 MS 和 WPM 3 种基本培养上, 试验结果表明, 在 3 种培养基上不定芽的分化率差异极显著, MS 培养基分化率最高, 为 83.3%。赵清爽^[17]的研究结果表明, 1/2 MS 培养基上 84K 杨 (*P. alba* × *P. glandulosa*) 生根效果好于 1/4 MS 和 MS, 其生根速度快、生根率高且不定芽基部生根处愈伤组织块小。王春荣等^[18]研究发现培养基类型对枫杨 (*P. terocarya stenoptera* C. DC.) 试管苗根诱导的影响非常大, 甚至大于生长素的影响, 1/2 DKW 培养基的生根率和根量均显著优于 1/2 MS 培养基。

2.2 培养条件

碳水化合物、光照、温度等培养条件对杨树再生系统建立有着重要影响。碳水化合物不仅为外植体提供能量, 而且可以调节植物细胞的渗透势。刘红梅^[19]在银中杨 (*P. alba* × *P. berolinensis*) 的组织培养试验中发现, 在一定范围内, 叶片的分化率随蔗糖浓度的增加而升高, 20 g·L⁻¹ 蔗糖是银中杨生长的最适碳源, 而葡萄糖、麦芽糖均不利于不定芽的诱导。适宜的光照不仅可以延长愈伤组织的保存期, 又可以防止继代苗玻璃化。在杨树的组织培养中, 光照培养时间通常为 16 h·d⁻¹, 而琼岛杨 (*P. qiongdaoensis* T. Honget P. Luo) 和箭胡毛杨 (*Populus* × *Jianhumao*) 适宜的光照时间为 14 h·d⁻¹^[21-22], 四季杨 (*P. canadensis* spp.) 适宜的光照时间为 12 h·d⁻¹^[22]。有时候全黑或者弱光更有利于愈伤组织的形成和根的再生^[23]。贾小明等^[24]在新疆杨 (*P. alba* L. var. *pyramidalis*) 叶片诱导不定芽时发现, 暗培养 3~5 d 后再进行 16 h·d⁻¹ 光照培养比全程 16 h·d⁻¹ 光照培养产生愈伤组织和不定芽的时间要早。培养温度过高过低都不利于组培苗生长, 过高易产生玻璃化现象, 过低使组培苗生长缓慢, 因此一般控制在 25℃ 左右。

3 植物生长调节剂对组织培养的影响

植物组织培养中, 为了促进植物不同组织和器官的生长, 需要在基本培养基中加入不同种类和浓度的植物生长调节剂, 如生长素、细胞分裂素等。杨树组织培养基中常用的生长素有 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D)、萘乙酸 (NAA)、吲哚乙酸 (IAA)、吲哚丁酸 (IBA) 等, 细胞分裂素有 6-苄基氨基嘌呤 (6-BA)、激动素 (KT) 和塞苯隆 (TDZ) 等。

3.1 初代培养

在杨树初代培养中, 多以茎尖或茎段为外植体诱导芽。Han 等^[25]以山新杨 (*P. davidiana* Dode × *P. bollena* Lauche) 叶片为外植体诱导不定芽, 研究表

明添加 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.08 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 时诱导率最高, 为 90%。付成华^[16]以常绿杨叶柄为外植体诱导不定芽, 研究发现同时添加 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 时诱导率最高, 当 6-BA 的浓度大于 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 会出现畸形芽或玻璃化现象。Hai 等^[26]在 84K 杨叶片诱导不定芽试验中发现, 6-BA 和 TDZ 混合使用诱导效果最好, TDZ 浓度以 $0.002 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为宜。刘曦珏^[27]以西丰杨 (*P. deltoides* Bar \times *P. cathayana* Rehd. Cl. 'Xifeng-25') 25 号茎段为外植体, 添加 $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ 和 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 时腋芽诱导率最高, 为 86%。说明细胞分裂素 TDZ 和低浓度的 NAA 配合使用, 对腋芽的萌发和生长效果显著。

3.2 增殖培养

在增殖培养过程中, 一般细胞分裂素和生长素配合使用。陈淑华等^[28]研究表明, 银新杨 (*P. alba* \times *p. alba pyramidalis*) 不定芽增殖时 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 配合使用效果最佳。付成华^[16]研究认为, 在南方常绿杨增殖培养基中添加 $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃ 时增殖效果最好, 丛生芽平均数为 11.6 个, 苗平均高 2.8 cm, 但是 GA₃ 浓度过高时, 会出现玻璃化现象。王春荣等^[18]研究结果表明, 在同时添加 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA、 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT 和 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 的培养基上枫杨芽增殖效果高, 说明 6-BA 与 KT 配合使用比单独使用的效果好。李开隆等^[29]在香杨 (*P. koreana* Rehd.) 丛生芽增殖试验中发现, 在添加 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 的培养基中, 增殖芽数平均达 25 倍。Aggarwal 等^[30]在喜马拉雅杨 (*P. ciliate* Wall. ex Royle) 不定芽增殖试验中发现, 在添加 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ 和 $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 的培养基中, 增殖效果最好, 增殖率为 69.28%。

3.3 生根培养

杨树生根培养过程中选择适当的生长调节剂是根系生长的关键因子。杜晓艳^[31]研究了 IBA 和 NAA 对青海青杨 (*P. cathayana* Rehd. Var. *Qinghai*) 无菌苗生根的影响, 结果表明 IBA 的生根效果好于 NAA, 生根率可达 100%。张瑞芝等^[32]在欧美杨 (*P. nigra* \times *P. deltoides*) 生根的研究中发现, NAA 浓度为 $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 生根率最高为 85%。有些研究则表明, 两种生长素配合使用要比单一使用效果好。Wei 等^[33]在毛白杨生根培养试验中发现, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 和 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 混合使用比单独使用诱导出的根粗壮, 生根率可达 100%。黄枝英等^[14]在台湾速生杨生根培养试验中研究发现, 在生根培养基中添加适当浓度的活性炭或者矮壮素 (CCC) 生根效果更好。

4 杨树组织培养中存在的问题

4.1 污染

污染是组织培养中常见的一种问题。污染主要来自两个方面: 一是由于外植体材料表面消毒不彻底, 由植物材料带入培养过程, 或是植物的内生菌随培养材料带入培养过程; 二是无菌操作过程中初代培养的外植体带菌、培养基和接种工具消毒不彻底^[34]。因此, 尽可能选择温室或人工气候室培养的材料、选择适合的消毒方法严格消毒灭菌、按程序规范操作以降低污染率。郑进等^[35]在进行中嘉 8 号杨 (*P. deltoides*, I-63 \times I-69) 的组织培养时, 为了减少污染和快速获得无菌的繁殖材料, 先从苗圃地里剪取健康的杨树枝条进行室内水培复幼, 用枝条上长出的嫩枝和叶片作外植体, 再进行消毒剂处理, 可显著降低外植体的污染率。

4.2 褐化

在林木组织培养过程中, 外植体的褐化是普遍存在的问题。在一定范围内, pH 值越低 (达到轻微的酸性环境) 越有利于抑制褐化的发生。李树丽^[36-37]在研究中华红叶杨 (*P. \times euramericana* cv. 'Zhonghua-hongye') 外植体褐变影响因素中发现, MS 培养基上的外植体褐化率比 1/2 MS 培养基上的高, 说明适当降低无机盐浓度可降低褐化率。在培养基中加入吸附剂活性炭可影响外植体的褐化率, 在一定范围内 ($0\sim 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 加入的活性炭量越多, 褐化率越低, 但加入 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭时, 褐化率反而上升。琼脂的用量影响培养基的硬度, 用量多时硬度大, 则褐化率小, 但硬度过大, 不利于外植体吸收营养, 造成生长不良^[37]。许继飞^[38]在欧美杨 108 (*P. euramericana* 'Guariento') 再生体系建立的试验中发现, 浓度较低的蔗糖, 有利于减轻外植体的褐化现象。因此, 防止材料的褐化应从外植体的选择、消毒、培养基以及培养条件等多方面考虑。

4.3 玻璃化

培养基中无机盐、激素种类及比例不适, 蔗糖和琼脂浓度低, 培养条件不适宜均会导致组培苗玻璃化的产生。TDZ 虽然对腋芽的萌发和生长效果较好, 但浓度过高会导致玻璃化现象。因此, 在使用时浓度最好低于 $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[28]。赵鑫闻^[39]在甜杨 (*P. suaveolens* Fisch.) 组织培养中通过增加光照强度和琼脂浓度逆转了玻璃化苗, 从而获得了健壮的组培苗。秦静远等^[40]报道, 琼脂浓度与玻璃化苗发生率呈极显著负相关, 提高琼脂浓度是控制玻璃化的有效途径。另外, 继代次数过多、幼苗营养不良

及呈饥饿状态也会导致组培苗的玻璃化^[16]。

5 杨树组织培养的应用及展望

随着组织培养技术的发展, 通过离体组织培养的方式来诱导植物染色体加倍技术变得越来越成熟。而杨树多倍体品种在林业生产中具有巨大的潜力。蔡肖^[41]以小青杨 (*P. pseudo-simonii* Kitag.) 离体叶片为材料, 在建立离体再生体系和悬浮细胞培养体系的基础上, 诱导染色体加倍, 成功培育了小青杨四倍体植株, 并且其倍性水平表现稳定。陈杰^[42]以滇杨叶柄为材料, 以秋水仙素结合组织培养的方法进行多倍体诱导, 最终得到四倍体植株。王沛琦^[43]采用秋水仙碱浸泡法处理白杨杂种三倍体“北林雄株 1 号”和“北林雄株 2 号”离体叶片, 进行染色体加倍, 成功获得六倍体植株, 为创造白杨六倍体新种质奠定了理论和实践基础。

杨树作为林木基因工程的模式植物, 在 2004 年全基因组测序完成后, 基因转化方面的研究已成为杨树育种的热点, 特别是在耐盐碱、抗虫、抗病等抗性育种方面。Zuo 等^[44]利用 Cry1Ac 和 Cry3A 基因构建表达载体, 通过农杆菌介导的方法转化到 741 杨树 [*P. alba* L. × (*P. davidiana* Dode + *P. simonii* Carr.) × *P. tomentosa* Carr.] 克隆体中, 经过一系列筛选, 获得了对鳞翅目和鞘翅目害虫具有高度抗性的转基因品系, 命名为 Pb29 和 CC84。研究杨树开花时间的控制能力和特定花相关基因的鉴定具有重要的意义。Yang 等^[45]以小叶杨和欧洲黑杨杂种 (*P. simonii* × *P. nigra*) 中后期无核花粉粒为外植体, 对单倍体杨树早期开花 AP1 基因转化进行了研究, 结果显示, 转 AP1 基因杨树的开花期与对照相比显著提前。这是关于 AP1 转基因杨树开花时间变化的首次报道, 这些结果为杨树的遗传改良和育种开辟了新的可能性。

杨树组织培养的建立与完善为其在短时间内繁殖大量优质种苗提供了可能性, 在此基础上利用基因工程和分子技术, 可进行杨树抗性育种与品种改良等相关研究, 这将极大地促进杨树的生应用, 继而为推动林业的可持续发展做出更大贡献。

参考文献:

- [1] 马丽, 沈昕, 陈少良, 等. 群众杨组培体系的研究[J]. 河北林果研究, 2005, 20(2): 114-116, 119.
- [2] 赵自成, 韩一凡, 苏雪辉, 等. 杨树抗虫速生新品种特异性及其功能[J]. 中国林业产业, 2006(11): 30-32.
- [3] GAUTHERET R J. Plant tissue culture: A history[J]. Bot Mag Tokyo, 1983, 96(4): 393-410.
- [4] MATHES M C. The *in vitro* formation of plantlets from isolated aspen tissues[J]. Phyton, 1964, 21: 137-141.
- [5] WOLTER K E. Root and shoot initiation in aspen callus cultures[J]. Nature, 1968, 219(5153): 509-510.
- [6] CHALUPA V. Control of root and shoot formation and production of trees from poplar callus[J]. Biol Plant, 1974, 16(4): 316-320.
- [7] 刘岩, 周军, 段安安, 等. 杨树组织培养的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(4): 2116-2119.
- [8] 辛培尧, 刘岩, 段安安, 等. 滇杨不同外植体分化培养研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2011, 26(6): 828-832, 860.
- [9] 张平冬, 康向阳, 高鹏, 等. 胡杨离体培养分化增殖途径的比较研究[J]. 北京林业大学学报, 2003, 25(6): 50-54.
- [10] 邢亚娟, 杨传平, 白卉. 中美山杨组织培养芽分化影响因素研究[J]. 林业科技, 2005, 30(5): 1-4.
- [11] 朱大宝. 国外杨树组培微繁殖技术的进展[J]. 北京林业大学学报, 1990, 12(1): 84-91.
- [12] 汪玲, 项艳. 725 杨树组培繁殖技术研究[J]. 安徽农业大学学报, 2013, 40(4): 612-617.
- [13] 沈周高, 项艳, 蔡诚, 等. 3 个杨树品种叶片再生体系的建立[J]. 中国农学通报, 2006, 22(11): 90-96.
- [14] 黄枝英, 庄卫东, 汤红玲, 等. 台湾速生杨树离体再生体系的建立[J]. 福建农业学报, 2018, 33(4): 386-390.
- [15] 李慧. 两个白杨派树种组织培养快繁技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [16] 付成华. 黑杨派杨树再生体系建立的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [17] 赵清爽. 84K 杨组织培养及基因转化的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2003.
- [18] 王春荣, 毕君, 张往祥, 等. 枫杨组织培养快繁技术研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(25): 42-48.
- [19] 刘红梅. 银中杨的组织培养与遗传转化研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.
- [20] 周双清, 梁居红. 琼岛杨愈伤组织培养的初步研究[J]. 热带林业, 2014, 42(2): 15-17.
- [21] 李毅, 邸利, 洪涛, 等. 箭胡毛杨愈伤组织诱导、保存与再分化[J]. 西北植物学报, 2002, 22(3): 656-660.
- [22] 沈迪玉. 四季杨茎段组织培养初步研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(11): 5549-5550, 5573.
- [23] 李慧, 陈晓阳, 李云, 等. 银白杨叶片不定芽再生影响因素的研究[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(3): 46-50.
- [24] 贾小明, 樊军锋, 王娟娟, 等. 河北杨和新疆杨离体叶片诱导不定芽研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(12): 110-114, 120.
- [25] HAN X, MA S R, KONG X H, et al. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of hybrid poplar *Populus davidiana* dode × *Populus bollena* lauche[J]. IJMS, 2013, 14(2): 2515-2528.
- [26] HAI G H, JIA Z G, XU W J, et al. Characterization of the *Populus* PtrCesA4 promoter in transgenic *Populus alba* ×

- P. glandulosa*[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2016, 124(3): 495-505.
- [27] 刘曦珏. 三种杨树再生体系的建立及三倍体银中杨转 *YUCCA1* 基因的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [28] 陈淑华, 王彦, 刘晓慧, 等. 银新杨组织培养快繁技术的研究[J]. *吉林林业科技*, 2011, 40(4): 4-6.
- [29] 李开隆, 靳春莲, 李明德, 等. 香杨的组织培养和植株再生[J]. *植物生理通讯*, 2009, 45(3): 281.
- [30] AGGARWAL G, GAUR A, SRIVASTAVA D K. Establishment of high frequency shoot regeneration system in Himalayan poplar (*Populus ciliata* Wall. ex Royle) from petiole explants using Thidiazuron cytokinin as plant growth regulator[J]. *J For Res*, 2015, 26(3): 651-656.
- [31] 杜晓艳. 三种杨树再生体系的建立及青海青杨遗传转化的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [32] 张瑞芝, 王峰, 李丹蕾, 等. 欧美杨再生体系的建立[J]. *中国农学通报*, 2017, 33(4): 48-53.
- [33] WEI F, ZHAO F F, TIAN B M. In vitro regeneration of *Populus tomentosa* from petioles[J]. *J For Res*, 2017, 28(3): 465-471.
- [34] ORLIKOWSKA T, NOWAK K, REED B. Bacteria in the plant tissue culture environment[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2017, 128(3): 487-508.
- [35] 郑进, 康薇, 洪华珠, 等. 中嘉 8 号杨的组织培养和植株再生[J]. *黄石理工学院学报*, 2007, 23(5): 19-23
- [36] 李树丽. 中华红叶杨无菌繁殖体系建立的影响因素研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2008.
- [37] 李树丽. 培养基中不同因素对中华红叶杨外植体褐变的影响[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(1): 44-46.
- [38] 许继飞. 欧美杨 108 再生体系的优化及转天花粉蛋白基因的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2006.
- [39] 赵鑫闻. 甜杨叶片高频率植株再生体系的建立[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(34): 6-9.
- [40] 秦静远, 王军利, 王富容. 植物组织培养中的玻璃化现象[J]. *杨凌职业技术学院学报*, 2004, 3(2): 51-53.
- [41] 蔡肖. 青杨原生质体培养及叶片离体染色体加倍研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- [42] 陈杰. 滇杨多倍体种质的诱导及鉴定[D]. 昆明: 西南林业大学, 2013.
- [43] 王沛琦. 白杨杂种三倍体离体快繁与六倍体诱导[D]. 北京: 北京林业大学, 2014.
- [44] ZUO L H, YANG R L, ZHEN Z X, et al. A 5-year field study showed no apparent effect of the Bt transgenic 741 poplar on the arthropod community and soil bacterial diversity[J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 1956.
- [45] YANG J L, LI K, LI C Y, et al. In vitro anther culture and *Agrobacterium*-mediated transformation of the AP1, gene from *Salix integra* Linn. in haploid poplar (*Populus simonii* × *P. nigra*)[J]. *J For Res*, 2018, 29(2): 321-330.