

李懿鑫, 果弘毅, 储歆彤, 等. 园林植物再生与遗传转化体系研究进展[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(14): 12–21.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.14.002

园林植物再生与遗传转化体系研究进展

李懿鑫, 果弘毅, 储歆彤, 高俊峰, 吴瑜玮, 刘国元, 张 健

(南通大学生命科学学院观赏植物遗传育种重点实验室, 江苏南通 226000)

摘要:园林植物是园林绿化的主要材料, 具有较高的观赏、生态和经济价值, 常以播种、扦插、嫁接等方式进行繁殖, 建立高效的组织培养体系有利于提高园林植物的繁育速度和品种生产的均一性, 克服传统方法周期较长且效率低的特点。植物转基因体系常以高效的再生体系为基础, 基于农杆菌转化法获得转基因植株。本文总结了外植体、培养基、激素种类、其他因素等对园林植物再生体系建立的影响。结果表明, 园林植物叶柄诱导愈伤组织的效率要高于叶片、茎段, 一般使用 MS 为基本培养基进行培养, WPM 培养基则更适用于木本园林植物, 常采用萘乙酸(NAA)和 6-苄基腺嘌呤(6-BA)的不同配比诱导愈伤组织和不定芽分化。并比较了常用的遗传转化方法及影响遗传转化的因素, 对园林植物再生与遗传转化的前景进行了展望。

关键词:园林植物; 组织培养; 外植体; 遗传转化

中图分类号: S184 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)14-0012-10

园林植物指观叶、观花、观果、观茎、观形的木本和草本植物, 是园林绿化的主要材料^[1], 在城市绿化方面起着至关重要的作用, 如调节气候、净化空气、美化城市环境等^[2]。由于土地盐碱化、荒漠化等生态问题日趋严重, 普通的园林植物已满足不了正常需求^[3]。因此, 快速开发和培育出更多的新

品种园林植物来满足生产、生活需要, 是解决这一问题的关键^[4]。遗传转化技术打破了常规育种方式, 可以高效、快速创造新种质^[5]。随着植物组织培养技术的广泛应用和遗传转化技术的不断深入发展, 研究人员在成功建立高效再生体系的基础上, 运用多种遗传转化技术, 将关联性状的耐盐、耐旱、耐高温、抗虫、抗病等相关基因用于转基因遗传育种, 已成功建立了多种植物的遗传转化体系^[6-7]。

本研究结合国内外研究进展对影响园林植物再生的关键因素、遗传转化的相关技术以及影响农杆菌遗传转化效率的因素等方面进行综述, 旨在为进一步利用遗传转化技术进行园林植物的转基因育种奠定基础。

收稿日期: 2021-09-18

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31971681); 江苏省南通市基础科学研究项目(编号: JC20200157)。

作者简介: 李懿鑫(1998—), 女, 河南许昌人, 硕士研究生, 主要从事林木遗传育种相关研究。E-mail: 1617396708@qq.com。

通信作者: 张 健, 博士, 研究员, 主要从事园林植物研究。E-mail: 56071007@qq.com。

[110] 胡建坤, 黄 蓉, 方 荣, 等. 茄子种质资源对黄萎病的抗性鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2019, 41(1): 68–73.

[111] 张鸿燕, 方 荣, 陈学军, 等. 茄子种质表型性状鉴定与黄萎病抗性评价[J]. 核农学报, 2020, 34(8): 1645–1654.

[112] Simko I, Haynes K G. Maturity-adjusted resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars to *Verticillium* wilt caused by *Verticillium dahliae* [J]. American Journal of Potato Research, 2017, 94(2): 173–177.

[113] 刘厚忠, 李 烨. 茄子新品种哈茄 V8 的选育[J]. 中国蔬菜, 2018(3): 72–74.

[114] 杨爱国, 朱 永, 霍 红, 等. 高产抗病茄子新品种‘洛茄 5 号’的选育[J]. 中国瓜菜, 2019, 32(11): 80–82.

[115] 王 勇, 姜 俊, 赵红星, 等. 茄子新品种驻茄 11 号的选育[J]. 中国蔬菜, 2018(12): 75–77.

[116] 张金树, 刘 琳. 从国外引进的几个番茄品种[J]. 中国农村科技, 2013(10): 22.

[117] 邹照贝, 徐翠容. 2021 年武汉种业博览会番茄类专家推荐品种[J]. 长江蔬菜, 2021(21): 18–20.

[118] Stevenson W R, Loria R, Weingartner D F, et al. Compendium of potato diseases [M]. 2nd ed. Paul: American Phytopathological Society, 2001: 45–46.

[119] 温晨阳, 赵英杰, 东保柱, 等. 内蒙古自治区主栽马铃薯品种对黄萎病的抗性鉴定[J]. 植物保护学报, 2018, 45(6): 1220–1226.

[120] 魏春华. 茄科物种全基因组抗病基因鉴定及其进化分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015: 15–36.

[121] 王益奎, 李文嘉, 莫贱友, 等. 茄子黄萎病及抗病遗传育种研究进展[J]. 中国蔬菜, 2011(14): 9–14.

1 园林植物再生体系的研究进展

植物的组织培养流程清晰,具体包括外植体的选择、外植体的消毒、诱导愈伤组织、诱导不定芽、诱导生根、炼苗、移栽等过程^[8]。在植物再生的过程中,要根据材料的不同取材部位,取材部位的不同发育阶段,对培养基类型、激素浓度、光照时间等进行调整^[9]。

近年来,有许多的园林植物已成功建立了组培再生体系。如菊科(Asteraceae)的万寿菊(*Tagetes erecta* L.)、向日葵(*Helianthus annuus* L.)、甜叶菊[*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.]等,兰科(Orchidaceae)的蝴蝶兰(*Phalaenopsis aphrodite* H. G. Reichenbach)、蕙兰(*Cymbidium faberi* Rolfe)、君子兰(*Clivia miniata*)等,报春花科(Primulaceae)的报春花(*Primula malacoides* Franch.)、小报春(*P. forbesii* Franch.)、鄂报春(*Primula obconica* Hance)等,凤仙花科(Balsaminaceae)的凤仙花(*Impatiens balsamina* L.)、毛茛科(Ranunculaceae)的芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)、鸢尾科(Iridaceae)的鸢尾(*Iris tectorum* Maxim.)、香雪兰(*Freesia hybrida* Klatt.)等,百合科(Liliaceae)的百合(*Lilium brownii* var. *viridulum* Baker)、郁金香(*Tulipa gesneriana* L.)等 10 余科的草本园林观赏植物组培再生体系已相当成熟^[10-19],具体如表 1 所示。

与草本植物相比,木本植物外植体的木质化程度较高,在培养过程中容易出现褐化现象,随着组培技术的提高,一批重要木本园林植物如杨柳科(Salicaceae)的杨树(*Populus* L.)、胡杨(*P. euphratica* Oliv.)等,银杏科(Ginkgoaceae)的银杏(*Ginkgo biloba* L.)、松科(Pinaceae)的油松(*Pinus tabulaeformis* Carriere)、云杉(*Picea asperata* Mast.)等,木兰科(Magnoliaceae)的玉兰[*Yulania denudata* (Desrousseaux) D. L. Fu]、鹅掌楸[*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.]等,桑科(Moraceae)的桑树(*Morus alba* L.)、蔷薇科(Rosaceae)的月季(*Rosa chinensis* Jacq.)、海棠(*Malus spectabilis*)等,芸香科(Rutaceae)的柑橘(*Citrus reticulata* Blanco)、花椒(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.)等,山茶科(Theaceae)的山茶(*Camellia japonica* L.)、油茶(*C. oleifera* Abel.)等 50 余科的木本园林植物已成功建立再生体系^[34-48],具体如表 2 所示。

目前,国内外关于园林植物再生体系的研究报

道很多,大量研究报道证明了外植体类型、基础培养基、激素种类及配比等均影响园林植物的再生。

1.1 外植体类型

外植体类型是影响园林植物再生的关键因素之一,同一外植体的不同取材部位或同一取材部位的不同发育阶段,其不定芽的分化能力均不相同^[56]。再生培养时,要根据植物的生长特性、繁殖方式来选取合适的外植体。一般选择幼嫩的器官或组织,如幼叶、茎尖、嫩茎、种胚等,也可选择种子、幼根、下胚轴、子叶、花器官等^[57]。吴青青等将百合的组培苗进行 4℃ 低温处理,发现处理后的组培苗生长点活动旺盛,适宜进行茎尖培养,并成功获得了再生的脱毒苗^[25];而张西英等采用热处理与茎尖培养结合的方式得到了脱毒的郁金香,同时研究了不同茎尖大小对郁金香茎尖培养的影响,发现茎尖大小为 1.5~2.0 mm 时便于剥取,也能取得一定的脱毒效果^[23]。何艳等通过对叶片的部位及叶龄进行研究,将叶片切成 0.50 cm×0.50 cm 的小片,发现试管苗下段叶片较上端更易形成愈伤组织,试管苗发育状态良好的叶基比未完全发育的叶尖、叶中部愈伤组织诱导效率高^[29]。孙瑞芬等对甜叶菊带腋芽的茎段和茎尖进行丛生芽的诱导,发现在相同培养条件下,带芽茎段作为外植体诱导丛生芽的效率更高,成功培育出成活率达 70% 的再生植株^[21]。杨柳科的木本园林植物已经建立了较完整的再生体系,研究者常以叶片、茎尖、茎段、腋芽等为外植体,诱导不定芽,获得再生植株^[58]。张瑞芝等以欧美杨的叶柄、叶片、茎段为外植体,发现叶柄产生愈伤组织的时间较短,诱导率高,而茎段相比较叶柄、幼叶愈伤产率较低,利用带有腋芽的茎段来诱导产生无菌苗的效率则更高^[54]。

在园林植物中,常采用茎段进行快繁得到无菌苗,以缩短植物的发育时间。在诱导愈伤组织时,叶柄的诱导率要优于叶片和茎段。因此,在选择外植体时,要根据植物的生长特性、取材部位及发育阶段等多方面进行考虑。

1.2 培养基类型

在组织培养中,培养基对外植体的培养具有非常重要的作用,MS、1/2MS、WPM、B5、N6 等是植物组织培养中常用的培养基,这些培养基中均含有丰富的无机营养物质和部分有机营养成分^[59-60]。不同植物在脱分化、再分化、生长等过程中适宜的培养基各不相同。

表 1 草本园林植物组培再生体系的构建

植物名称	外植体类型	基本培养基	培养阶段	激素及其他添加物
百合 ^[20]	茎段	MS	直接分化	6-苄基腺嘌呤(6-BA)1.0 mg/L + 萘乙酸(NAA) 0.5 mg/L
		MS	增殖	6-BA 0.1 mg/L + NAA 1.0 mg/L
		1/2MS	生根	NAA 0.3 mg/L
甜叶菊 ^[21]	茎段	MS	诱导	6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L
		MS	继代	6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + 激动素(KT) 4.0 mg/L + 赤霉素(GA ₃)0.2 mg/L
		1/2MS	生根	NAA 0.2 mg/L
大丽花 ^[22]	茎段	MS	诱导	6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L
		MS	增殖	6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L
		WPM	生根	6-BA 0.1 mg/L + NAA 1.0 mg/L
郁金香 ^[23]	茎尖	MS	诱导	6-BA 0.5 mg/L + 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)1.0 mg/L + NAA 5.0 mg/L
		MS	继代	6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.5 mg/L + GA ₃ 0.5 mg/L
半夏 ^[24]	茎尖	MS	诱导	6-BA 1.5 mg/L + 2,4-D 2.0 mg/L
百合 ^[25]	茎尖	MS	诱导	6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L
		MS	分化	6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 活性炭 1 000 mg/L
增城蜜菊 ^[26]	茎尖	MS	诱导	6-BA 0.1 mg/L + 椰子汁 100 mL/L
		MS	增殖	6-BA 2.0 mg/L
		MS	生根	NAA 0.1 mg/L
多花黄精 ^[27]	叶片	MS	诱导	6-BA 3.0 mg/L + NAA 4.0 mg/L
		MS	增殖	6-BA 2.0 mg/L + NAA 3.0 mg/L
		MS	分化	6-BA 2.0 mg/L + NAA 4.0 mg/L
		MS	生根	NAA 1.0 mg/L
丽格海棠 ^[28]	叶片	MS	分化	6-BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L 或 6-BA 1.0 mg/L + 噻苯隆(TDZ)0.1 mg/L
		MS	增殖	6-BA 2.0 mg/L + TDZ 0.1 mg/L
		MS	生根	吲哚丁酸(IBA)0.1 ~0.3 mg/L
多花黄精 ^[29]	叶片	MS	诱导	6-BA 1.5 mg/L + 2,4-D 0.2 mg/L
		MS	分化	6-BA 4.0 mg/L + 2,4-D 0.2 mg/L
		MS	增殖	6-BA 2.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L/6-BA 2.0 mg/L + 2,4-D 0.2 mg/L
		1/2MS	生根	IBA 2.0 mg/L
北美海棠 ^[30]	叶片	MS	分化	TDZ 0.15 mg/L + NAA 1.5 mg/L
		1/2MS	增殖	6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.5 mg/L
		1/2MS	壮苗	6-BA 1.0 mg/L + IBA 1.0 mg/L
		1/4MS	生根	IBA 1.0 mg/L + 活性炭 1 500 mg/L
鸢尾 ^[31]	球茎	MS	诱导/分化	6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L
		MS + 1/2MS	生根	NAA 0.1 mg/L
菊花 ^[32]	花梗	MS	诱导	肌醇 100 mg/L + 吲哚乙酸(IAA)1 mg/L
		MS	分化	无激素
三叶草 ^[33]	子叶	MS	直接分化	TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L

陈长征对影响金线莲愈伤组织增殖的培养基进行了选择,使用 MS、1/2MS 和 N6 这 3 种培养基,证明 MS 培养基的效果显著优于 1/2MS 和 N6 培养基^[61]。而冯宁使用 MS、1/2MS 和 1/3MS 这 3 种基本培养基,研究了带有腋芽的蝴蝶兰茎段的生长和褐化情况,发现适当降低培养基中大量元素的含

量,蝴蝶兰组培的褐化率也随之降低,蝴蝶兰腋芽的萌发率则随之升高,在 1/2MS 培养基上的茎段,其腋芽萌发率超过 90%,且长势良好^[62]。周熙莹等使用 MS、WPM 培养基诱导 84K 杨的叶片和茎段的愈伤组织,发现叶片以 MS 为基础培养基,愈伤组织的诱导效率更高、更加稳定,而茎段

表 2 木本园林植物组培再生体系的构建

植物名称	外植体类型	基本培养基	培养阶段	激素及其他添加物
柳枝稷 ^[49]	种子	N6	诱导	2,4 - D 7.0 mg/L + 脯氨酸 500 mg/L + 水解酪蛋白 500 mg/L
		MS	增殖	脯氨酸 2.0 mg/L
		MS	分化	6 - BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + GA ₃ 0.5 mg/L
簸箕柳 ^[50]	种子	MS	诱导	6 - BA 0.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L
		MS	继代	6 - BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 或 6 - BA 0.5 mg/L + NAA 0.8 mg/L
		MS	分化	6 - BA 0.5 mg/L + TDZ 0.2 mg/L
		MS	生根	NAA 0.01 mg/L
檀香木 ^[51]	茎段	WPM	诱导	TDZ 0.6 mg/L + 2,4 - D 1.5 mg/L
		WPM	分化	6 - BA 2.5 mg/L + NAA 0.4 mg/L
		WPM	生根	IBA 1.5 mg/L
毛果杨 ^[52]	茎段	WPM	分化	6 - BA 0.03 mg/L + IBA 0.02 mg/L + TDZ 0.000 8 mg/L
	叶片	WPM	分化	6 - BA 0.02 mg/L + IBA 0.02 mg/L + TDZ 0.001 mg/L
		WPM	生根	IBA 0.1 mg/L
杨树 ^[53]	茎段	MS	诱导	2,4 - D 0.2 mg/L
		MS	分化	TDZ 0.02 mg/L
		MS	生根	IBA 2.0 mg/L
白杨 ^[34]	叶片	MS	直接诱导不定芽	6 - BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L
		1/2MS	生根	NAA 0.02 mg/L + IBA 0.05 mg/L
油松 ^[38]	下胚轴	1/2MS	诱导	6 - BA 3.0 mg/L + 2,4 - D 1.0 mg/L
		DCR	增殖	6 - BA 1.13 mg/L + 2,4 - D 2.21 mg/L
柑橘 ^[47]	上胚轴	MS	诱导	6 - BA 4.0 mg/L + IAA 0.3 mg/L
		1/2MS	生根	IBA 1.0 mg/L
欧美杨 ^[54]	叶柄	MS	诱导	6 - BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L
		MS	继代	6 - BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L
		MS	分化	6 - BA 0.1 mg/L + NAA 0.05 mg/L
		1/2MS	生根	NAA 0.25 mg/L
马尾松 ^[55]	腋芽	WPM	不定芽	6 - BA 5.0 mg/L
	腋芽	WPM	伸长	IBA 0.2 mg/L
	腋芽	WPM	生根	IBA 2.0 mg/L
	成熟合子胚	WPM	不定芽	6 - BA 5.0 mg/L

诱导愈伤组织及愈伤组织诱导不定芽使用 WPM 培养基则更合适^[63]。孙永莲以簸箕柳的茎段为外植体,用 B5、MS、WPM、1/2MS 这 4 种基本培养基诱导腋芽,筛选出 MS 为簸箕柳组织培养的最适基本培养基^[64]。而 Jardak 等使用 MT 培养基,以柑橘的胚轴为外植体,成功建立了柑橘的再生体系^[47]。

综上,MS 培养基对木本园林植物和草本园林植物均适用,一般用于诱导愈伤组织,而 WPM 培养基常用于木本园林植物,适用于愈伤组织的诱导和不定芽的分化,1/2MS 培养基也可用于园林植物不定芽的分化生和根^[65]。在实际的组织培养过程中,要根据培养阶段来选择合适的培养基,同时植物激

素、其他培养物的添加也十分重要。

1.3 植物生长调节剂种类

在组织培养中,为了促进外植体的生长发育,常添加不同浓度、不同种类和配比的植物生长调节剂。尽管植物生长调节剂用量非常微小,但其在植物生长中却起着不可替代的作用^[66]。一般常用的有生长素、细胞分类素、赤霉素、脱落酸等。

生长素有萘乙酸、吲哚乙酸、吲哚丁酸、2,4 - D 等,它们不仅可以促进细胞分裂,还能诱导愈伤组织形成和生根,具有极其重要的作用。2,4 - D 常用于愈伤组织的诱导,但高浓度的 2,4 - D 有一定的毒害作用。NAA、IBA 常用于生根培养,单一或者混

合使用均可^[67]。王善娥使用单一激素 NAA、BA、ZT、2,4-D、KT 对诱导柳树叶片愈伤组织率进行了探究,发现 NAA、2,4-D 产生愈伤组织的速度较快,其他几种激素诱导愈伤组织则较慢,且很快便褐化死亡^[68]。在诱导愈伤组织时,生长素和细胞分裂素的搭配使用,诱导出的愈伤组织状态更佳。张大鹏等以 KT、TDZ、6-BA、IBA、IAA、2,4-D、NAA 为不同的激素处理,分析油棕叶片在不同激素诱导下的褐化率,发现 6-BA 和 IBA 处理下的褐化率明显高于其他 5 种激素,KT 处理下叶片的褐化率则显著低于其他激素,而 2,4-D、NAA、IAA 对叶片的褐化率影响在各个水平上均无显著差异,因此在愈伤诱导率相近的情况下,可优先使用 KT 对油棕叶片进行诱导^[69]。

6-苄氨基嘌呤、玉米素(ZT)、激动素、噻苯隆等细胞分裂素用于促进细胞分裂和分化,促进愈伤组织分化不定芽^[70-71]。其中,6-BA 和 KT 使用较广泛。例如,孙永莲等研究发现,6-BA 对簸箕柳愈伤组织的诱导率要高于 KT,而 6-BA 和 TDZ 结合使用时不定芽的分化数目最多且生长旺盛,分化率达 100%。而与 KT 相比,相同浓度下的 6-BA 更易使试管苗玻璃化^[50]。于非等使用 6-BA 和 TDZ 直接将柞木叶片诱导出不定芽^[28]。还有研究表明,在诱导不定芽的过程中,极其微量的 TDZ 可能是芽分化的关键。例如,甄成得到的毛果杨茎段分化最佳培养基中,加入的 TDZ 仅为 0.000 8 mg/L^[52]。

赤霉素和脱落酸(ABA)有时也用于植物组织培养中。赤霉素对枝条生长和伸长区节间的发育具有一定的作用,对根的生长没有促进作用,能显著促进茎叶的生长,有时也用于诱导愈伤组织^[72]。脱落酸则对植物生长有抑制作用^[73]。

在培养基中添加植物激素时,常以生长素和细胞分裂素不同浓度的配比进行搭配。一般认为,细胞分裂素和生长素比值低时,有利于愈伤组织的形成,如生长素的浓度范围一般为 0.01 ~ 1.00 mg/L NAA 或 0.1 ~ 2.0 mg/L 2,4-D,与细胞分裂素 0.1 ~ 3.0 mg/L 6-BA 搭配使用,用于诱导愈伤组织;而细胞分裂素和生长素比值高时,则有利于不定芽的分化,0.1 ~ 1.0 mg/L NAA 和 0.1 ~ 4.0 mg/L 6-BA 常被用于不定芽的分化,有时也使用 2 种以上的激素组合,如 NAA + 6-BA + 0.000 1 ~ 0.100 0 mg/L TDZ,微量的 TDZ 在分化过程中起着不可替代的作用^[31,49,74-76]。但这并非绝对的,如乌

日罕使用河北杨叶片诱导不定芽时,使用的激素浓度为 0.3 mg/L TDZ + 0.4 mg/L IBA^[77]。

1.4 其他因素

温度、光照、继代次数、培养时间、封口材料等因素也会影响组织培养的效果。如王馨使用不同光质的 LED 灯(蓝光、绿光、红光、白光和蓝绿红混合光),对东北红豆杉的愈伤组织进行照射,探究不同光照条件下愈伤组织紫杉烷类化合物的积累,发现 5 种光质均可促进化合物的积累,红光为最佳光质^[78]。尚瑀琪等对连续继代培养中马尾松的芽生根能力进行了分析,发现继代次数的增加对马尾松的生根能力有显著影响,继代次数在 15 ~ 20 次时,继代芽生根能力最强,生根率达 98.7%,而继代 40 次以后,生根能力显著下降^[55]。而有些植物却能够长期继代,如玫瑰等在多次继代后仍能保持原来的增殖能力和分化能力,还有些植物在继代过程中发生变异的概率会增加。

2 园林植物遗传转化体系研究进展

植物遗传转化也称转基因技术,以植物的原生质体、器官、组织、细胞等材料为受体,通过不同的方法将外源基因转入到受体中,从而获得外源基因稳定表达的再生植株^[79]。在园林植物再生体系的基础上,已在菊花、兰花、百合、郁金香等草本园林植物及银杏、杨树、油松、柑橘、黄杨等木本园林植物上成功实现了遗传转化^[80]。草本园林植物的生长周期短,与生长周期长的木本园林植物相比,不论是传统育种方式还是转基因育种都相对容易。而木本园林植物常以传统的育种方式进行育种,其遗传性状改良较复杂、周期长,通过基因工程育种能够极大地缩短育种年限^[81-82]。

目前,多数园林植物利用植物的叶片、种子、茎段、下胚轴等都能实现遗传转化,通过脱分化形成愈伤组织后再分化不定芽、体细胞胚发生、外植体直接再生不定芽等途径,得到稳定的遗传转化体系,从而达到验证基因功能的目的^[83]。在柑橘遗传转化研究中,常用根癌农杆菌介导幼苗上胚轴片段,由于种子具有季节依赖和基因型依赖等特点,使得柑橘的遗传转化效率大幅降低,因此利用细胞悬浮培养进行遗传转化可能是一种更好的选择,具有更高的器官发生潜力,细胞悬浮液的转化更有利于非嵌合转基因柑橘植株的产生,转化效率为 35%,而且细胞悬浮培养能有效地维持细胞的活力

和再生潜能^[45]。因此,建立高效的遗传转化系统对植物基因功能的研究和新品种选育有非常重要的作用。

在遗传转化过程中,除了高效的再生体系外,遗传转化方法也很重要。目前,遗传转化的方法主要有农杆菌介导法、基因枪法、聚乙二醇(PEG)介导法、显微注射法、电击法、花粉管通道法、离子束法等^[4-7]。其中,将 DNA 直接转移的方法有电击法和显微注射法等,利用植物的原生质体作为转化受体,此方法对原生质体的再生要求比较高,对于一些原生质体再生困难的物种研究难度较大^[84]。利用花粉管通道法的研究也有相关报道,如茶树利用花粉管通道法成功获得了转基因植株,但转基因植株的结实率明显低于正常植株,技术仍需进一步改进^[85]。目前,常用的转化方法有农杆菌介导法、基因枪法和聚乙二醇(PEG)介导法。

2.1 农杆菌介导法

农杆菌介导法是通过农杆菌将外源目的基因导入植物基因组的方法,以此形成含有外源基因的再生植株,实现遗传性状的改良。用于转化的农杆菌主要是根癌农杆菌和发根农杆菌^[86]。在自然条件下,根癌农杆菌的 Ti 质粒上有 1 段 T-DNA,农杆菌通过感染多数裸子植物和双子叶植物的伤口部位,将 T-DNA 插入到植物的基因组中,在植物基因组中进行整合表达;而发根农杆菌则能够诱导产生高度分支的毛状根^[87]。目前根癌农杆菌遗传转化系统理论机制最清楚、技术方法最成熟,是当前研究中使用最多的方法,具有操作简便易行、转化方法简单高效、转化效率高、重组后的外源 DNA 结构完整且不易变异等优点^[88-89]。

在遗传转化研究过程中,外植体类型、农杆菌菌株类型、浓度和侵染时间、共培养时间、抗生素种类等也是影响农杆菌遗传转化的重要因素。

2.1.1 外植体类型 不同类型的外植体是农杆菌遗传转化过程中的重要影响因素之一。一般选取分裂能力强、生长旺盛的材料,使获得的转化材料效率高,转化后再生植株的活力较强^[90-91]。用于遗传转化材料主要有体细胞胚、嫩茎、嫩叶、下胚轴、茎尖等。对于不同品种的植物、选择不同的外植体进行转化,转化效率也存在显著差别。在柳树的转化体系中,以种子为外植体,由胚顶芽直接诱导出多芽,农杆菌转化效率为 7.2%^[92]。利用体细胞胚为外植体,在牡丹、百合、火炬松、日本柳杉等品种

中,均获得了较好的遗传转化效果^[82]。还有以嫩叶为外植体通过直接诱导不定芽进行转化的,如杨树叶片的遗传转化效率为 32.2%^[34]。此外,柑橘的胚性悬浮细胞能够有效维持细胞活力和再生潜力,也可以作为遗传转化材料,转化效率为 35%^[45]。还有毛状根作为外植体也成功建立了遗传转化体系。

2.1.2 菌株类型、浓度和侵染时间 在农杆菌转化过程中,农杆菌菌株的类型、菌液浓度和侵染时间也是影响遗传转化的重要因素之一^[6-7]。农杆菌菌株 LBA4404、EHA105、AGL1、GV3101 等常用来侵染植物外植体。Wang 等对白杨和山杨叶片进行农杆菌侵染,发现农杆菌 EHA105 的转化频率最高,而 GV3101 的致病力很小或没有毒力,因此选择农杆菌 EHA105 进行试验,在共培养基中添加 50 mg/L 乙酰丁香酮,获得了较好的 GUS 表达效果^[35]。

在适宜的菌液浓度下,合适的侵染时间有利于提高转化效率,降低染菌率。菌液密度越高,侵染时间越长,农杆菌在培养过程中长势越旺盛,外植体发生染菌、褐化的可能性会大幅提高;而菌液密度越低、侵染时间越短,外植体伤口与菌液接触不充分,使得农杆菌难以附着在外植体上^[8-9]。Wu 等使用根癌农杆菌 GV3101 和 LBA4404 对桑树叶片进行侵染,设置 3 种菌液浓度(D 为 0.5、1.0、1.7),发现 3 种菌液之间的 GUS 信号并没有明显差别,因此,选择 $D_{600\text{ nm}} = 0.5$ 浓度进行试验^[41]。大量研究表明,在以叶片为外植体进行转化时,菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 一般为 0.4 ~ 1.0,转化效果最佳的侵染时间为 5 ~ 20 min^[59-60]。

2.1.3 共培养时间 外植体与菌株的共培养时间对转化效率有显著影响。共培养时间过短,会导致农杆菌在外植体上不能充分生长,降低了 T-DNA 的整合效率;而共培养时间过长,则会导致农杆菌过度繁殖,抑菌难度大大增加,增加了接种次数^[80-81]。Song 等将白杨幼叶共培养 3、4、5 d,发现共培养 3 d 最为合适,且随着共培养时间的延长,芽诱导效率逐渐降低,而转化效率则无明显差别^[34]。研究表明,农杆菌在外植体伤口处共培养 16 h 以上诱导形成冠瘿瘤,才会发生转化,通常以暗培养 2 ~ 3 d 为最佳^[82]。

遗传转化过程中,共培养后的植物材料表面有大量农杆菌附着,因此抑菌处理成为一个重要的环节。合适的抗生素不仅可以筛选出抗性植株,还能

抑制和杀死农杆菌的生长。

抑菌抗生素能够有效抑制农杆菌的活性,且抑菌抗生素的浓度在外植体的生长过程中也起着重要的作用^[80]。如果浓度过低,起不到抑制农杆菌生长的作用,会导致农杆菌过度繁殖;而浓度过高,则会抑制外植体的生长甚至导致外植体褐化死亡^[81]。常用的抑菌抗生素主要有头孢霉素(Cef)、特美汀(Tim)、羧苄青霉素(Carb)等,在遗传转化体系中加入特美汀,愈伤组织的抑菌效果和再生效果比头孢霉素和羧苄青霉素效果要好,且对植物材料的影响更小^[82]。可以根据植物外植体的特点,选择合适的抑菌抗生素及浓度。Hayta 等在培养基中添加硝酸银,能够明显抑制农杆菌的生长和促进植株再生^[15]。Bruegmman 等将白杨叶片共培养后,用 500 mg/L 头孢霉素无菌水溶液对外植体进行冲洗,抑制农杆菌的生长^[36]。

农杆菌转化过程中,只有少数外植体能将外源 DNA 整合到自身的基因组中,大多数则未能转化成功^[88]。利用转化质粒或载体带有的选择标记,通过筛选抗生素来筛选转化成功的外植体,抑制未转化外植体的生长,从而高效地筛选转化成功的抗性材料^[89]。常用的筛选抗生素有潮霉素(Hyg)和卡那霉素(Kana)。根据转化过程中所用质粒载体的不同,来选择合适的抗生素。如报春花属植物在遗传转化过程中常使用新霉素磷酸转移酶 II(*Npt II*) 基因,*Npt II* 基因对氨基糖苷类抗生素卡那霉素、新霉素和 G-418 具有耐药性,得出卡那霉素是最常用的选择性药物,在 125 mg/L 的浓度下,卡那霉素抑制未转化细胞的生长,而使转化细胞从花梗愈伤组织中再生^[15]。

2.2 基因枪法

基因枪法又称粒子轰击技术,是利用高速微弹将外源 DNA 导入植物组织或细胞的方法。在微小的金粒或钨粒表面包裹着外源 DNA,然后加速穿透细胞壁进入目标植物。当微注射体进入细胞时,转移的 DNA 从粒子中分离出来,整合到宿主基因组中并稳定表达。基因枪法不仅可以将目的基因转入双子叶植物,也能导入到单子叶植物,克服了农杆菌转化过程中寄主的限制问题,几乎所有的器官、组织都可以作为转化受体^[90]。此外,还能将多个质粒共同转化至受体细胞,缩短了工作时间,提高了试验效率。但是,在转化过程中,使用的金粉或钨粉价格较高,增加了试验成本,且获得的转基因植株嵌合体比率较高、转基因效率低、转化不稳定,仍需要进一步改进^[91]。

2.3 聚乙二醇介导法

PEG 是一种细胞融合剂,能引起细胞膜表面电荷的紊乱,干扰细胞间正常的信息交流,从而促进细胞之间的融合,诱导外源 DNA 分子进入原生质体^[91]。该方法操作简便、不受品种的局限、成本低,但需要原生质体作为受体,而许多植物原生质体再生困难,因此该方法的使用受到了一定的限制^[93]。

3 展望

园林植物高效再生体系的建立已有很多报道,在茎尖脱毒、微体快繁等领域取得了重大的研究进展,高效的再生体系和成熟的转基因技术是实现园林植物遗传育种和新品种改良的重要条件,再生及遗传转化的关键步骤如图 1 所示。

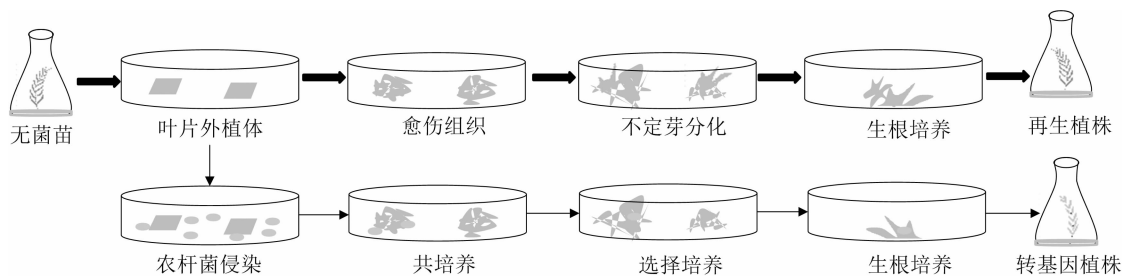


图1 植株再生及遗传转化

但有些物种仍停留在愈伤诱导阶段,不定芽的分化成了制约该类物种再生体系构建的难题,还会遇到褐化、玻璃化等问题^[3-4]。因此,仍需继续加大研究力度,参考前人的研究基础,加强技术、方法等方面的创新,加强基础研究体系的构建,攻克再分

化过程这一难关,推进园林植物再生体系的构建。同时尽量降低组织培养过程中的玻璃化、褐化及染菌等问题,培育出生长状态良好的愈伤组织,为再分化做准备^[7-9]。

目前,多数园林植物利用农杆菌介导法,成功

培育出耐盐、耐高温、耐旱等的转基因新品系,但此方法转化效率较低,易出现假阳性,需对转基因植株进行分子鉴定。同时农杆菌的菌液浓度、侵染时间、共培养时间等因素,也影响着农杆菌的转化效率^[94]。而基因枪法的转化率要比农杆菌的高,但在可操作性、受体细胞被轰击后 DNA 的变化等方面,还需要进一步完善^[84]。此外,花粉管通道法、PEG 法、显微注射法等遗传转化技术,可借鉴不同种类植物中的研究^[87]。随着遗传转化技术的不断创新和进步,未来会成功培育出更多高效转化的转基因新品种。

外植体的选择、不同种类激素配比是园林植物再生体系成功建立的关键。而植株再生低、遗传转化效率低、转基因植株离体再生率低等,是遗传转化过程中所面临的瓶颈问题^[12-13]。因此,仍需不断优化培养条件,建立高效的再生及遗传转化体系,为园林植物遗传育种及基因功能的研究提供有力的方法支撑,为新品种的选育和推广奠定基础^[95]。

参考文献:

- [1] 陈世昌,徐明辉. 植物组织培养[M]. 重庆:重庆大学出版社,2016.
- [2] 杨 名. 园林树木的分类方法及观赏特性评价[J]. 中国新技术新产品,2016(18):89-90.
- [3] Kishi-Kaboshi M, Aida R, Sasaki K. Genome engineering in ornamental plants: current status and future prospects[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 131: 47-52.
- [4] 邵 煜,李 璐. 植物组织培养技术在园林植物育种中的应用进展[J]. 农村经济与科技, 2019, 30(9): 56-58.
- [5] Sogutmaz O B, Budak H. Application of tissue culture and transformation techniques in model species *Brachypodium distachyon* [J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1667: 289-310.
- [6] Matveeva T V, Otten L. Widespread occurrence of natural genetic transformation of plants by *Agrobacterium* [J]. Plant Molecular Biology, 2019, 101(4/5): 415-437.
- [7] Azadi P, Bagheri H, Nalouisi A M, et al. Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants [J]. Biotechnology Advances, 2016, 34(6): 1073-1090.
- [8] Rout G R, Mohapatra A, Jain S M. Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects[J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(6): 531-560.
- [9] Singh C K, Raj S R, Jaiswal P S, et al. Effect of plant growth regulators on *in vitro* plant regeneration of sandalwood (*Santalum album* L.) via organogenesis [J]. Agroforestry Systems, 2016, 90(2): 281-288.
- [10] Tichá M, Illesová P, Hrbáčková M, et al. Tissue culture, genetic transformation, interaction with beneficial microbes, and modern bio-imaging techniques in alfalfa research[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2020, 40(8): 1265-1280.
- [11] 陈 云. 园林绿化植物观赏草分类研究进展[J]. 中国园艺文摘, 2016, 32(10): 65-67, 156.
- [12] Su J, Jiang J, Zhang F, et al. Current achievements and future prospects in the genetic breeding of *Chrysanthemum*: a review[J]. Horticulture Research, 2019, 6(1): 19.
- [13] Cardoso J C, Zanello C A, Chen J T. An overview of orchid protocorm-like bodies: mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3): 985.
- [14] Zeng S J, Huang W C, Wu K L, et al. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2016, 36(3): 521-534.
- [15] Hayta S, Smedley M A, Li J H, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation systems of *Primula vulgaris* [J]. Plant Methods, 2018, 14: 93.
- [16] Dan Y H, Baxter A, Zhang S, et al. Development of efficient plant regeneration and transformation system for *Impatiens* using *Agrobacterium tumefaciens* and multiple bud cultures as explants [J]. BMC Plant Biology, 2010, 10(1): 165.
- [17] 张润龙,王小斌,邵灵梅,等. 芍药和牡丹的组织培养及遗传转化体系构建[J]. 植物生理学报, 2021, 57(2): 235-247.
- [18] 赵梓安,曹潘攀,熊 森,等. 鸢尾属植物的组织培养与栽培研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(6): 2736-2740.
- [19] Song S L, Yan R, Wang C X, et al. Improvement of a genetic transformation system and preliminary study on the function of LpABC21 and LpPILS7 based on somatic embryogenesis in *Lilium pumilum* DC. Fisch [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(18): 6784.
- [20] 蒋 瑶,陈文波,周朝伟,等. 野生湖北百合不定芽诱导及再生植株的建立[J]. 黑龙江农业科学, 2016(9): 11-14.
- [21] 孙瑞芬,苏文斌,张艳芳,等. 甜叶菊离体培养快繁体系的建立[J]. 分子植物育种, 2018, 16(8): 2600-2605.
- [22] 田松青,袁茹优,韦庆华,等. 大丽花‘费罗加’组织培养和块根诱导[J]. 北方园艺, 2020(7): 79-85.
- [23] 张西英,刘 娜. 郁金香茎尖培养及主要病毒的 RT-PCR 检测技术研究[J]. 新疆农垦科技, 2017, 40(1): 53-55.
- [24] 王宝霞,齐永红,肖雅尹,等. 半夏茎尖脱毒培养及病毒检测[J]. 植物生理学报, 2018, 54(12): 1813-1819.
- [25] 吴青青,王维泽,崔 嵬,等. 百合茎尖培养材料的筛选及其组培配方的优化[J]. 贵州农业科学, 2019, 47(9): 69-73.
- [26] 何旭君,赵 静,赖增哲,等. ‘增城蜜菊’茎尖培养脱毒技术[J]. 热带农业科学, 2019, 39(7): 27-32.
- [27] 陈松树,张 雪,赵 致,等. 以叶片为外植体的多花黄精组织培养[J]. 北方园艺, 2018(14): 136-142.
- [28] 于 非,王 禹. 植物激素对丽格海棠组织培养快繁的影响[J]. 中国林副特产, 2019(3): 10-13.
- [29] 何 艳,朱玉球,肖 波,等. 多花黄精组织培养体系的研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(10): 2032-2037.

- [30]王瑞敏,沈 瑒,陈 颖,等.‘高原之火’北美海棠叶片组培快繁再生体系[J]. 东北林业大学学报,2020,48(7):23–28,39.
- [31]武海峰,吕远达,郑海霞,等. FRANS HALS 德国鸢尾组织培养及植株再生研究[J]. 湖北农业科学,2019,58(23):223–226.
- [32]Haider S, Gao Y H, Gao Y K. Standardized genetic transformation protocol for *Chrysanthemum* cv. ‘Jinba’ with terminal flower 1 homolog CmTFL1a[J]. Genes, 2020, 11(8):860.
- [33]Rojo F P, Seth S, Erskine W, et al. An improved protocol for *Agrobacterium* – mediated transformation in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(8):4181.
- [34]Song C W, Lu L, Guo Y Y, et al. Efficient *Agrobacterium* – mediated transformation of the commercial hybrid poplar *Populus alba* × *Populus glandulosa* Uyeki[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(10):2594.
- [35]Wang H, Wang C, Hua L, et al. An efficient *Agrobacterium* – mediated transformation and regeneration system for leaf explants of two elite aspen hybrid clones *Populus alba* × *P. berolinensis* and *Populus davidiana* × *P. bolleana* [J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(11):2037–2044.
- [36]Bruegmann T, Polak O, Deecke K, et al. Poplar transformation[J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1864:165–177.
- [37]喻 娜. 银杏组织培养中幼茎尖外植体抗褐化培养条件的优化[J]. 分子植物育种, 2020, 18(18):6135–6142.
- [38]Liu S W, Ma J J, Liu H M, et al. An efficient system for *Agrobacterium* – mediated transient transformation in *Pinus tabulaeformis*[J]. Plant Methods, 2020, 16:52.
- [39]Song Y, Bai X M, Dong S W, et al. Stable and efficient *Agrobacterium* – mediated genetic transformation of larch using embryogenic callus[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11:584492.
- [40]邓演文,林洁莹,吴乔娜,等. 木兰属植物组织培养技术研究综述[J]. 林业与环境科学, 2018, 34(5):118–124.
- [41]Wu S L, Yang X B, Liu L Q, et al. *Agrobacterium* – mediated transient MaFT expression in mulberry (*Morus alba* L.) leaves[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2015, 79(8):1266–1271.
- [42]Bhatnagar S, Khurana P. *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of Indian mulberry, *Morus indica* cv. K2: a time – phased screening strategy[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(7):669–675.
- [43]Nishitani C, Hirai N, Komori S, et al. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system[J]. Scientific Reports, 2016, 6:31481.
- [44]邢建宏,侯滢新,林家治,等. 红叶石楠”红罗宾“高频再生体系优化[J]. 北方园艺, 2019(14):73–78.
- [45]Moniruzzaman M, Zhong Y, Huang Z F, et al. *Citrus* cell suspension culture establishment, maintenance, efficient transformation and regeneration to complete transgenic plant[J]. Plants, 2021, 10(4):664.
- [46]Hasan N, Kamruzzaman M, Islam S, et al. Development of partial abiotic stress tolerant *Citrus reticulata* Blanco and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck through *Agrobacterium* – mediated transformation method[J]. Journal, Genetic Engineering & Biotechnology, 2019, 17(1):14.
- [47]Jardak R, Boubakri H, Zemni H, et al. Establishment of an *in vitro* regeneration system and genetic transformation of the Tunisian ‘Maltese Half – Blood’ (*Citrus sinensis*): an agro – economically important variety[J]. 3 Biotech, 2020, 10(3):99.
- [48]Gao Y, Li D, Zhang L L, et al. MicroRNAs and their targeted genes associated with phase changes of stem explants during tissue culture of tea plant[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):20239.
- [49]Liu Y R, Cen H F, Yan J P, et al. Inside out: high – efficiency plant regeneration and *Agrobacterium* – mediated transformation of upland and lowland switchgrass cultivars[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(7):1099–1108.
- [50]孙永莲,戴晓港,李小平,等. 簸箕柳组培再生体系的建立[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2019, 43(2):31–37.
- [51]da Silva T J A, Kher M M, Soner D, et al. Sandalwood: basic biology, tissue culture, and genetic transformation [J]. Planta, 2016, 243(4):847–887.
- [52]甄 成. 毛果杨组培再生及遗传转化体系研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2016.
- [53]Maheshwari P, Kovalchuk I. *Agrobacterium* – mediated stable genetic transformation of *Populus angustifolia* and *Populus balsamifera*[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7:296.
- [54]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.
- [55]尚瑛琪,杨模华,段润梅,等. 马尾松优良家系不定芽诱导及腋芽高效增殖组培体系构建与优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2021, 41(9):1–13.
- [56]Yuan J L, Yue J J, Gu X P, et al. Flowering of woody bamboo in tissue culture systems[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8:1589.
- [57]Imai R, Hamada H, Liu Y L, et al. In planta particle bombardment (iPB): a new method for plant transformation and genome editing [J]. Plant Biotechnology, 2020, 37(2):171–176.
- [58]Mizuki I, Sato A, Matsuo A, et al. Clonal structure, seed set, and self – pollination rate in mass – flowering bamboo species during off – year flowering events[J]. PLoS One, 2014, 9(8):e105051.
- [59]吉训志,秦晓威,胡丽松,等. 木本植物组织培养[J]. 热带农业科学, 2019, 39(4):33–40.
- [60]田鹏飞,朱旭飞,童甜甜,等. 林木植物组织培养及存在问题的研究进展[J]. 南方农业, 2018, 12(33):142–143.
- [61]陈长征. 不同处理对金线莲组织培养的影响[J]. 芜湖职业技术学院学报, 2018, 20(3):30–35.
- [62]冯 宁. 不同培养基成分对蝴蝶兰组织培养褐化的影响[J]. 特种经济动植物, 2021, 24(3):15–17.
- [63]周熙莹,肖龙敏,张 倩,等. 一种 84K 杨再生体系的建立[J]. 广东农业科学, 2013, 40(9):143–145, 238.
- [64]孙永莲. 簸箕柳组织培养体系建立及遗传转化体系初探[D]. 南京:南京林业大学, 2017:2–11.

- [65]陶阿丽,曹殿洁,华芳,等. 植物组织培养技术研究进展[J]. 长江大学学报(自科版),2018,15(18):31-35.
- [66]Santner A, Calderon-Villalobos L, Estelle M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth[J]. Nat Chem Biol, 2009,5(5):301-307.
- [67]Wójcik A M, Wójcikowska B, Gaj M D. Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020,21(4):1333.
- [68]王善娥. 观赏用柳树无性系再生体系的建立及其遗传转化的研究[D]. 济南:山东师范大学,2007.
- [69]张大鹏,王永,石鹏,等. 不同外源激素在诱导愈伤过程中对油棕叶片褐化率的影响[J]. 中国农学通报,2019,35(33):47-51.
- [70]Chen J J, Wang L Y, Immanen J, et al. Differential regulation of auxin and cytokinin during the secondary vascular tissue regeneration in *Populus* trees[J]. New Phytologist, 2019,224(1):188-201.
- [71]Dewir Y H, Nurmansyah, Naidoo Y, et al. Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures[J]. Plant Cell Reports, 2018,37(11):1451-1470.
- [72]Binenbaum J, Weinstein R, Shani E. Gibberellin localization and transport in plants[J]. Trends in Plant Science, 2018,23(5):410-421.
- [73]Chen K, Li G J, Bressan R A, et al. Absciseic acid dynamics, signaling, and functions in plants[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2020,62(1):25-54.
- [74]赵爽,葛宵启,陈晗,等. 百合离体快繁体系的建立[J]. 黑龙江农业科学, 2021(2):75-78.
- [75]王星斗,王升级,黄娟娟,等. 不同激素配比下杨树组培体系对比[J]. 山西农业科学, 2021,49(1):1-6.
- [76]王逸凡. 木本观赏植物组织培养技术[J]. 农技服务, 2017,34(20):65.
- [77]乌日罕. 河北杨再生体系及遗传转化体系建立研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2020.
- [78]王馨. 不同光质对东北红豆杉愈伤组织中紫杉烷类成分合成代谢影响与初步机制解析[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2020:7-10.
- [79]Debener T, Byrne D H. Disease resistance breeding in rose: current status and potential of biotechnological tools[J]. Plant Science, 2014,228:107-117.
- [80]Busov V B, Brunner A M, Meilan R, et al. Genetic transformation: a powerful tool for dissection of adaptive traits in trees[J]. New Phytologist, 2005,167(1):9-18.
- [81]Boutigny A L, Dohin N, Pornin D, et al. Overview and detectability of the genetic modifications in ornamental plants[J]. Horticulture Res, 2020,7:11.
- [82]Basso M F, Arraes F B M, Grossi-de-Sa M, et al. Insights into genetic and molecular elements for transgenic crop development[J]. Frontiers in Plant Science, 2020,11:509.
- [83]van Eck J. The status of *Setaria viridis* transformation: *Agrobacterium*-mediated to floral dip[J]. Frontiers in Plant Science, 2018,9:652.
- [84]Ozyigit I I, Kurtoglu K Y. Particle bombardment technology and its applications in plants[J]. Molecular Biology Reports, 2020,47(12):9831-9847.
- [85]Wang M, Zhang B H, Wang Q L. Cotton transformation via pollen tube pathway[J]. Methods in Molecular Biology, 2013,958:71-77.
- [86]Hu D, Bent A F, Hou X L, et al. *Agrobacterium*-mediated vacuum infiltration and floral dip transformation of rapid-cycling *Brassica rapa*[J]. BMC Plant Biology, 2019,19(1):246.
- [87]Krenek P, Samajova O, Luptovciak I, et al. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: principles, methods and applications[J]. Biotechnology Advances, 2015,33(6):1024-1042.
- [88]Matveeva T V. *Agrobacterium*-mediated transformation in the evolution of plants[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2018,418:421-441.
- [89]李俊香,古勤生. 根癌农杆菌介导的真菌遗传转化研究进展[J]. 江苏农业科学, 2020,48(3):43-49.
- [90]Angulo-Bejarano P I, Sharma A, Paredes-López O. Factors affecting genetic transformation by particle bombardment of the prickly pear *Cactus* (*O. ficus-indica*)[J]. 3 Biotech, 2019,9(3):98.
- [91]Yarra R, Jin L F, Zhao Z H, et al. Progress in tissue culture and genetic transformation of oil palm: an overview[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019,20(21):5353.
- [92]Yang J L, Yi J, Yang C P, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Salix matsudana* Koidz. using mature seeds[J]. Tree Physiology, 2013,33(6):628-639.
- [93]Sheteiw M S, Fu Y Y, Hu Q J, et al. Seed priming with polyethylene glycol induces antioxidative defense and metabolic regulation of rice under nano-ZnO stress[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2016,23(19):19989-20002.
- [94]Donmez D, Simsek O, Izgu T, et al. Genetic transformation in *Citrus*[J]. The Scientific World Journal, 2013,2013:491207.
- [95]Song G Q, Prieto H, Orbovic V. *Agrobacterium*-mediated transformation of tree fruit crops: methods, progress, and challenges[J]. Frontiers in Plant Science, 2019,10:226.