

网络出版时间:2012-03-21 17:18

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120321.1718.011.html>

光皮桦叶片再生体系的建立

孙晓敏, 陈 争, 王京京, 童再康, 李美飞, 张 敏

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

【摘 要】 【目的】建立光皮桦叶片高效再生体系,为光皮桦的良种培育及遗传转化研究提供依据。【方法】以光皮桦无菌叶片为外植体,分别用含 0.6 mg/L TDZ 的 MS、WPM 和 1/2MS 培养基进行不定芽诱导分化,筛选最佳基本培养基;向筛选出的最佳基本培养基中添加 0.05 mg/L NAA 及不同质量浓度(0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mg/L)TDZ 的激素组合组成不定芽分化培养基,用于诱导不定芽分化,筛选最佳不定芽诱导分化培养基;以 1/2MS 培养基为基本培养基,分别附加 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 的 IBA 或 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L 的 NAA 组成生根培养基,用于再生苗生根,筛选最佳生根培养基,建立光皮桦叶片再生体系。【结果】光皮桦无菌叶片诱导不定芽的最适基本培养基为 MS 培养基,其诱导的不定芽最多,且芽生长状况良好,颜色深绿;最适不定芽诱导分化培养基为: MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5.5 g/L,在该培养基上叶片丛生芽诱导率可达到 80.00%,平均不定芽数高达 12.00 个,且芽生长健壮,呈深绿色;最适再生苗生根培养基为: 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 5.5 g/L,在该培养基上再生苗的生根率达 100%,平均根数为 14.5 个,平均根长为 11 cm,根较粗壮,基部无愈伤组织,且产生了很多毛细根。【结论】建立了光皮桦无菌苗叶片的高效再生体系。

【关键词】 光皮桦; 叶片外植体; 再生体系

【中图分类号】 S792.150.4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)04-0061-07

Establishment of leaf-explants regeneration system of *Betula luminifera* H. Winkl

SUN Xiao-min, CHEN Zheng, WANG Jing-jing,
TONG Zai-kang, LI Mei-fei, ZHANG Min

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture,
Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China)

Abstract: 【Objective】The regeneration system of *Betula luminifera* leaf-explants was established and provide scientific reference for the gene transformation and culture of *Betula luminifera*. 【Method】The optimal basic medium with MS, WPM and 1/2MS mediums containing 0.6 mg/L TDZ was screened using *B. luminifera* leaf-explants and the optimal basic medium of shoot differentiation with 0.05 mg/L NAA and TDZ of different concentrations (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mg/L). Take 1/2MS as basic medium, different concentration IBA(0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) or NAA (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L) was added to screen the optimal root differentiation medium. The regeneration system of *B. luminifera* leaf-explants was established. 【Result】The buds grew well with dark green on MS medium. The suitable differentiation medium was MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+Suc. 30 g/L+Agar 5.5 g/L, on which the inducing rate of the adventitious shoot was 80.00% and the average buds were 12.00, and the buds grew

* [收稿日期] 2011-10-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30600484);浙江省科技计划项目(2008C002-1, Y200907683)

[作者简介] 孙晓敏(1986—),女,陕西宝鸡人,在读硕士,主要从事植物遗传育种研究。E-mail: sunxiaomin428@163.com

[通信作者] 童再康(1963—),男,浙江兰溪人,教授,主要从事植物遗传育种研究。E-mail: zktong@zafu.edu.cn

well, dark green. The inducing rate of the root was 100%, the average roots 14.5, and the length 11 cm, the root stout, base without callus, and produced a lot of hair root when the adventitious shoots were cultured on medium of 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+ Suc. 20 g/L+ Agar 5.5 g/L. 【Conclusion】 The regeneration system of *B. luminiifera* leaf-explants was established.

Key words: *Betula luminiifera* H. Winkl; leaf-explants; regeneration system

光皮桦(*Betula luminiifera* H. Winkl) 又名亮叶桦、亮皮树、桦角, 为桦木科(*Betulaceae*) 桦木属(*Betula*) 落叶高大乔木, 是我国特有的优良速生用材树种^[1-2]。光皮桦分布广, 生长快, 适应性强, 材质优良, 用途广泛, 其木材已被国家列入一类材名录^[3], 可用于家具、人工板材及生态防护林营造等领域。自 20 世纪 80 年代起, 国际市场对桦木木材的需求一直持续上升^[4]。如今, 随着我国经济的快速发展, 木材的需求量也大幅度增加, 但林木生长周期长, 产生了供需紧张这一严重问题。光皮桦是一种优良的经济、速生、阔叶树种, 不仅生长周期短且材质优良, 完全可以满足我国市场的需求, 同时还可解决造林树种单一、杉松比例过大等一系列问题, 具有广阔的应用前景。组培快繁技术是解决优良无性系造林用苗的良好途径^[5-8], 随着组织培养技术的日益成熟, 其在育种过程中的作用越来越大^[9]。目前, 光皮桦组培快繁方面的研究虽已有相关文献报道^[10-11], 但这些研究所采用的外植体均为带芽茎段, 而以叶片为外植体, 建立光皮桦高效再生体系的研究尚未见报道。另外, 在植物转基因研究方面, 目前最主流的基因转化方法是农杆菌转化法^[12], 该方法通常采用植物叶片为外植体, 转化后的植物组织通过组织培养技术, 产生具有目的基因的再生植株。用于基因转化的受体系统应具有 80%~90% 以上的再生频率, 每块外植体必须能再生出丛生芽, 且数量越多越好, 这样才有获得高频转化的可能性^[13]。本试验采用光皮桦叶片为外植体, 通过研究不同基本培养基及激素浓度组合对叶片诱导不定芽、不定根的影响, 建立了光皮桦叶片高效再生体系, 旨在为光皮桦的良种培育及通过叶盘法开展基因转化方面的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

试验材料为光皮桦优良无菌苗的叶片, 由浙江农林大学遗传育种组培室提供。

试验所用的细胞分裂素 6-苄氨基嘌呤(6-BA)、N-苯基-N'-1,2,3-噻二唑-5-脒(TDZ) 及生长素吲

哌-3-丁酸(IBA)、萘乙酸(NAA) 均为 Sigma 公司产品。

1.2 最佳不定芽诱导基本培养基的筛选

参考文献[14], 选择 MS、WPM 和 1/2MS 3 种培养基为供试基本培养基, 各种培养基中含蔗糖 30 g/L、琼脂 5.5 g/L, pH 值 5.8。将光皮桦无菌苗叶片边缘 2 mm 剪掉, 再沿主脉横切后, 叶面朝下, 分别接种于添加 0.6 mg/L TDZ 的不同基本培养基中, 每种基本培养基重复接种 4 皿, 共接种 30 片。接种后的叶片在 25~27 ℃、16 h/d 光照(光照强度为 25 mol/(m²·s)) 条件下培养, 40 d 后观察不定芽的生长情况, 统计各处理叶片褐死数、不定芽分化率及不定芽数量, 计算平均不定芽诱导数, 根据分化率、不定芽数量及生长状况筛选最佳不定芽诱导基本培养基。

1.3 最佳不定芽诱导分化培养基的筛选

以 MS 培养基为基本培养基, 向其中分别添加 0.05 mg/L NAA 及不同质量浓度(0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mg/L) TDZ 的激素组合, 依次形成 S1~S7 7 种不定芽诱导分化培养基(各分化培养基的蔗糖、琼脂含量及 pH 值同上), 高压灭菌, 冷却凝固后, 接种培养光皮桦无菌苗叶片(方法同上), 40 d 后观察不定芽的生长情况, 统计相关指标(同 1.2), 筛选最佳不定芽诱导分化培养基。

1.4 最佳再生苗生根培养基的筛选

以 1/2MS 培养基为基本培养基, 分别附加 0, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00 mg/L 的 IBA 或 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L 的 NAA, 依次形成 Q1~Q10 10 种再生苗生根培养基(各生根培养基的蔗糖、琼脂含量及 pH 值同上), 高压灭菌, 冷却凝固后待用。在光皮桦叶片诱导的丛生芽生长高度达 2~3 cm 时, 将其分株后接种于各生根培养基中, 每天观察, 15 d 后统计根的数量、平均根长及产生愈伤的体积大小和生长状况, 并计算生根率, 筛选出最佳再生苗生根培养基。

1.5 统计指标及计算方法

不定芽分化率 = 诱导产生不定芽的叶片数/接种叶片总数 × 100%。

平均不定芽诱导数 = 不定芽总数/产生不定芽

的叶片数。

生根率=产生不定根的无菌苗/接种无菌苗总数×100%。

平均根数=不定根总数/产生不定根的再生苗数。

2 结果与分析

2.1 最佳不定芽诱导基本培养基的确定

由表 1 和图 1 可知,光皮桦无菌苗叶片在 MS

培养基上诱导产生的不定芽数最大,达 23 个,且芽生长状况良好,颜色深绿(图 1);在 WPM 培养基上产生的不定芽数明显低于 MS 培养基,仅有 4 个,且芽生长较差,叶边缘还有微褐现象出现;在 1/2MS 培养基上无不定芽发生,褐化现象严重,外植体死亡数目很高。综合考虑可以得出,光皮桦叶片适于在 MS 这种无机盐含量较高的培养基中培养,故确定 MS 培养基是其叶片诱导不定芽的最佳基本培养基。

表 1 MS、WPM 和 1/2MS 3 种基本培养基对光皮桦叶片外植体芽分化的诱导效果比较

Table 1 Comparison of induced shoot production of <i>B. luminiifera</i> H. Winkl leaf-explants under different basic mediums							
培养基 Medium	TDZ 质量浓度/ (mg·L ⁻¹) Concen-tration	外植体数 Number of explant	不定芽分化率/% Shooting frequency	不定芽数 Number of bud	平均不定芽 诱导数 Average Bud	褐死数 Browning No.	不定芽生长状况 Bud status
MS	0.6	30	19.22	23	5.75	2	生长健壮 Growth state is best
WPM	0.6	30	5.00	4	2.00	3	生长较差 Growth state is bad
1/2MS	0.6	30	0	0	0	9	无不定芽发生 No buds

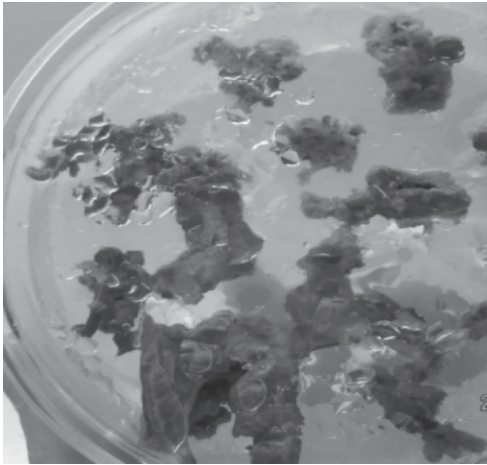


图 1 光皮桦叶片在 MS 培养基上产生的不定芽

Fig.1 Shoot regenerated from *B. luminiifera* H. Winkl leaf in MS medium

2.2 最佳不定芽诱导分化培养基的确定

光皮桦无菌苗叶片接种不定芽诱导分化培养基后 3 d,培养基 S6、S7 上的叶片边缘最早开始卷曲、膨大、显绿,且切口处有少量愈伤出现(图 2),其次为培养基 S5、S2、S1。接种后 8 d,所有培养基的愈伤诱导率均达 100%。接种后 10 d,培养基 S6、S7 上的叶片首先在叶片边缘及横切主脉的切口位置产生不定芽。接种后 40 d,培养基 S6 不定芽的分化率最高,达 80.00%,平均不定芽诱导数为 12.00 个(表 2),且不定芽生长健壮,颜色深绿(图 3);培养基 S7 的分化率达 73.33%,平均不定芽诱导数为 10.00 个,但再生芽有玻璃化现象发生,颜色嫩绿显透亮,

这可能与细胞分裂素 TDZ 的质量浓度过大有直接关系,激素浓度过大易发生玻璃化现象,所以再生苗的后期生长必然受其影响甚至死亡;培养基 S5、S4 的分化率较低,均为 53.33%,平均不定芽诱导数分别为 11.00 和 10.00 个;培养基 S1 和 S2 的分化率最低,均为 33.33%,平均不定芽诱导数分别为 6.90 和 7.40 个。由表 2 可以看出,随着 TDZ 质量浓度的增加,光皮桦叶片的不定芽分化率及平均不定芽数也随之上升,且不定芽生长健壮;但当其质量浓度为 1.2 mg/L 时,培养基 S7 中的不定芽出现玻璃化现象,平均不定芽数也随之减少。综合分析可知,光皮桦叶片的最适芽分化诱导培养基为 MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5.5 g/L。

2.3 最佳再生苗生根培养基的确定

再生苗生根的好坏是影响移栽成活率的一个关键因素^[14]。IBA、IAA 或 NAA 均能诱导不定芽生根^[15],但近年来的研究发现,IBA 比 IAA 的促生根作用更强,原因是 IBA 比 IAA 稳定^[16]。光皮桦叶片诱导的丛生芽接种生根培养基后 3 d,Q1 生根培养基上的丛生芽在茎段基部发生较细、较短的白色毛根状物;之后培养基 Q6、Q5、Q4、Q3 依次发生细、短的白色根状物,培养基 Q2 生根最晚。由表 3 可以看出,光皮桦叶片诱导的丛生芽接种生根培养基 15 d 后,不同生根培养基上无根再生苗的生根状况差异很大,培养基 Q1、Q2、Q3 的生根率分别为 50.00%,70.00%和 73.00%,Q1、Q2 培养基上形成

的根系质量较差,且数量较少,其中培养基 Q1 上形成的根细长且弱,基部有少量愈伤,平均根数仅为 4.89 个,平均根长也仅有 5.0 cm,培养基 Q2 的平均根数只有 5.86 个,根系较长且细弱,基部形成少量愈伤组织;培养基 Q3 上形成的根系质量较好,根长且较壮,根基部无愈伤,但平均根数只有 7.57 个、平均根长仅 8.0 cm。培养基 Q4、Q5、Q6 的生根率均高达 100%,是 Q1 的 2 倍,根的平均长度也均达到 10.0~11.0 cm,平均根数分别高达 11.65,14.50

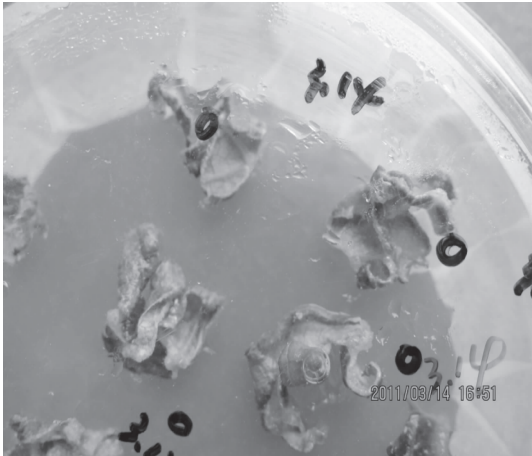


图 2 光皮桦叶片切口处产生的少量愈伤
Fig. 2 Callus was induced from *B. luminiifera*
H. Winkl leaves *in vitro*



图 3 光皮桦叶片诱导出的不定芽
Fig. 3 Shoot regenerated from *B. luminiifera*
H. Winkl leaves

表 2 TDZ 和 NAA 不同质量浓度组合对光皮桦叶片外植体芽分化的诱导效果比较

Table 2 Comparison of induced shoot production of *B. luminiifera* *H. Winkl* leaf under different concentrations

培养基 Medium	TDZ 质量浓度/ (mg·L ⁻¹) Concen- tration	NAA 质量浓度/ (mg·L ⁻¹) Concen- tration	外植体 Explants	不定芽 分化率/% Shooting frequency	不定芽数 Bud No.	平均不 定芽诱导数 Average Bud	褐化数 Browning No.	芽生长状况 Bud condition
S1	0.1	0.05	30	33.33	69	6.90	7	芽生长较好,嫩绿色 Growth state is good, color is tender green
S2	0.2	0.05	30	33.33	74	7.40	8	芽生长较好,稍显黄绿 Growth state is Good, color is yellow green
S3	0.4	0.05	30	40.00	108	9.00	6	芽生长较好,颜色嫩绿 Growth state is good, color is tender green
S4	0.6	0.05	30	53.33	160	10.00	9	芽生长较好,嫩绿色 Growth state is good, color is tender green
S5	0.8	0.05	30	53.33	176	11.00	6	芽生长较好,健壮嫩绿 Growth state is good, color is tender green
S6	1.0	0.05	30	80.00	288	12.00	4	芽生长健壮,呈深绿色 Growth state is best,col- or is dark green
S7	1.2	0.05	30	73.33	220	10.00	5	芽有玻璃化现象 Bud has vitrification phe- nomenon

转接至添加生长素 NAA 的生根培养基 Q7、Q8、Q9、Q10 上的丛生芽,其根生长状况较差,Q7 的

和 13.53 个,且根粗壮、基部无愈伤(图 4)。所以,无论是从根长、根粗还是平均根数来看,培养基 Q4、Q5、Q6 的生根效果都绝对优于培养基 Q1、Q2、Q3;Q1 和 Q5 的生根情况见图 5,图 5 显示,Q5 培养基上的再生苗不仅生长状态良好,根部还产生了很多毛细根,这些毛细根可以扩大根系的吸收面积,增强根系的吸收能力,提高移栽成活率^[14]。显然,不同质量浓度的 IBA 对光皮桦无根再生苗的生根有很大的影响。

生根率最高,为 71.43%,Q10 的最低,仅为 27.27%,且根系粗、短,基部形成了较大的愈伤组

织,影响移栽成活率,不利于移栽。

由表 3 可知,激素 IBA 比 NAA 更适于光皮桦的生根培养。随着 IBA 质量浓度的增加,再生芽的生根率、平均根数、平均根长也随之增加,但当 IBA

质量浓度增加至 1.2 mg/L 时,根系质量稍有下降。综合分析可知,光皮桦最适生根培养基为 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 5.5 g/L。



图 4 光皮桦再生苗在培养基 Q5 上的生根状况
Fig. 4 Roots regeneration of *B. lumini fera* H. Winkl
in vitro (Q5 medium)

图 5 光皮桦再生苗在 1/2MS(左)和 Q5(右)
培养基上的生根情况
Fig. 5 Roots regeneration of *B. lumini fera* H. Winkl was in
1/2MS medium(left) and Q5 medium(right) *in vitro*

表 3 不同质量浓度的 IBA 和 NAA 对光皮桦再生苗生根的影响							
Table 3 Effect of different concentrations on roots regeneration of <i>B. lumini fera</i> H. Winkl <i>in vitro</i>							
培养基 Medium	IBA 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) IBA concentration	NAA 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) NAA concentration	外植体数 Explant	生根率/% Ratio of rooting	平均根数 Rooting No.	平均根长/cm Root length	根系状况 Root condition
Q1	0	0	30	50.00	4.89	5.0	根细弱,基部有少量愈伤 Roots are slender; the base has a small amount of callus
Q2	0.05	0	30	70.00	5.86	6.0	根较细,基部有少量愈伤 Roots are slender; the base has a small amount of callus
Q3	0.10	0	30	73.00	7.57	8.0	根较壮,基部无愈伤 Root is a bit strong; the base has no callus
Q4	0.50	0	30	100.00	11.65	10.0	根较壮,基部无愈伤 Root is a bit strong; the base has no callus
Q5	1.00	0	30	100.00	14.50	11.0	根长且粗壮,基部无愈伤,产生 了很多毛细根 Root is very strong and long; the base has no callus
Q6	2.00	0	30	100.00	13.53	10.0	根较弱,基部无愈伤 Roots are slender; the base has no callus
Q7	0	0.5	30	71.43	8.23	2.0	根较粗,基部有大块愈伤 Root is a bit strong; the base has a large number of callus
Q8	0	1.0	30	70.59	9.43	3.0	根粗,基部有大块愈伤 Root is strong; the base has a large number of callus
Q9	0	2.0	30	41.67	11.00	3.0	根粗且短,基部有大块愈伤 Root is strong and short; the base has a large number of callus
Q10	0	3.0	30	27.27	9.00	2.5	根粗短,基部有大块愈伤 Root is strong and short; the base has a large number of callus

3 讨论与结论

植物细胞、组织具有全能性,在适宜条件下经过人工合理诱导,均能重新进行细胞分裂与器官分化,长出芽、根等器官,最终形成完整植株。本研究首次采用光皮桦组培苗的叶片为外植体,建立了光皮桦植株再生体系,该体系无需进行愈伤诱导及不定芽增殖,可直接由叶片产生丛生芽,实现了“一步成芽”的目的,与陈伟等^[11]以带芽茎段为外植体,经过芽再生后增殖而实现再生的途径相比,大大提高了试验效率,缩短了试验周期。

在组织培养中,常根据培养基配方中含盐量的不同将培养基分为 4 大类^[17]:第 1 类为富集元素平衡培养基(即高盐培养基),第 2 类为高硝酸钾培养基,第 3 类为中等无机盐含量培养基,第 4 类为低无机盐培养基。在组织培养中,要根据外植体本身生理状态的不同选用不同类型的培养基。不同基本培养基所含的基本化学元素的种类和比例相差较大,选择合适的基本培养基是进行再生培养的基础。本试验中,光皮桦叶片在含盐量高的 MS 培养基上最先诱导出不定芽,且芽长势良好,而在含盐量低的 WPM 培养基与含盐量仅为 MS 培养基一半的 1/2 MS 培养基上,诱导芽的分化率则远远不及 MS 培养基,由此说明高盐培养基适于诱导光皮桦叶片再生不定芽。陈正华^[6]总结了 97 种木本植物的快繁培养基,发现芽诱导时有 70 种植物适用 MS 及修改的高盐培养基。

由细胞全能性可知,每一个植物细胞都具有再生成完整植株的能力,但在实际应用中,组织的再生受植株基因型、性别及年龄、组织来源、生理状态等多种因素的影响。一般来说,外植体越幼嫩植株越容易再生^[18]。叶片离体再生中一般使用完全展开的幼嫩叶片,但在葡萄上有使用前 3 片叶的报道^[19]。有研究认为,甜樱桃第 1 片合拢的极幼嫩叶的再生能力较强,半展开嫩叶的再生能力则急剧下降,而完全展开的幼嫩叶片不能诱导再生^[19]。在桃叶片的研究中,一般使用完全展开的幼嫩叶片。本研究发现,光皮桦前 3 片嫩叶的不定芽诱导能力较强,尤其是小叶,芽分化的启动时间及丛生芽数明显高于第 1~3 片叶,这与朱大保^[18]、李云等^[19]研究得出的外植体越幼嫩植株越容易再生的结论一致。本课题组将进一步就光皮桦叶片外植体的不同生理状态对不定芽诱导率的影响展开研究。

本试验中,光皮桦叶片在诱导芽分化培养基组

合 MS+TDZ1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5.5 g/L 中,不定芽的分化率可达 80.00%,且平均每个外植体上可分化出不定芽 12.00 个,故 TDZ 最适质量浓度量 1.0 mg/L。众多的研究表明,植物再生率的高低与所用植物激素的种类、浓度及组合有密切关系^[20-21]。在愈伤组织诱导及再生过程中,激素的种类和浓度起着重要作用。植物生长调节激素中,生长素可诱导愈伤组织的形成及胚状体的产生,其配合一定比例的细胞分裂素可促进愈伤组织的生长和不定芽的发生,但激素的浓度要控制在合适的范围内,否则会产生负面作用^[22-23]。本试验中,光皮桦叶片不定芽的分化率随着 TDZ 质量浓度的升高而增加,但当 TDZ 质量浓度高达 1.2 mg/L 时,不定芽发生玻璃化现象,这可能与激素质量浓度过高有关,但其具体原因尚有待进一步研究。

有研究认为,IBA 可以增加分生组织细胞的活性,并促进根发端信息的表达^[24]。生根过程中,根原基分化之前以及根大量突破茎表皮之前,外源 IBA 促进内源 IAA 的含量出现高峰,进而促进生根。本研究在生根培养基筛选试验中发现,激素 IBA 比 NAA 更适于光皮桦的生根培养,随着 IBA 质量浓度的增加,再生苗的生根率、平均根数、平均根长均随之增加,但当 IBA 的质量浓度增加至 1.2 mg/L 时,根系质量稍有下降。光皮桦丛生芽在 1/2 MS+IBA 1.0 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 5.5 g/L 的生根培养基上,生根率达 100%,平均根数为 14.50 个,平均根长为 11.0 cm。

【参考文献】

- [1] 郑万钧. 中国树木志:第 2 卷 [M]. 北京:中国林业出版社,1985:2124-2131.
Zheng W J. Woody flora of China:2nd volumes [M]. Beijing: China Forestry Press,1985:2124-2131. (in Chinese)
- [2] 陈存及,陈伏法. 阔叶树种栽培 [M]. 北京:中国林业出版社,2000:313-315.
Chen C J, Chen H F. Broad leaved tree cultivation [M]. Beijing: China Forestry Press,2000:313-315. (in Chinese)
- [3] 杨业斌. 光皮桦的经济性状及栽培技术 [J]. 湖南林业科技,1990(4):206-211.
Yang Y B. Economic properties and cultivating technologies of *Betula luminifera* [J]. Hunan Forestry Science & Technology,1990(4):206-211. (in Chinese)
- [4] Welander M, Zhu L H. Proceedings of the workshop on high quality birch clonal propagation and wood properties [M]. Sweden: Department of Grop Sciences,2001:5-9.
- [5] 王怀智. 通过组织培养繁殖木本植物:植物组织培养与植树造

- 林 [M]. 北京:科学技术出版社,1998.
- Wang H Z. Through tissue culture propagation of woody plants: Plant tissue culture and afforestation [M]. Beijing: China Forestry Press, 1998. (in Chinese)
- [6] 陈正华. 木本植物组织培养及利用 [M]. 北京:高等教育出版社,1986.
- Chen Z H. Woody plant tissue culture and its utilization [M]. Beijing: Higher Education Press, 1986. (in Chinese)
- [7] 桂耀林. 松树的组织培养: 经济植物组织培养与快速繁殖 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1985.
- Gui Y L. Pine tree tissue culture. Tissue culture and rapid propagation of economic plants [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1985. (in Chinese)
- [8] 曹孜义, 刘国民. 林木组织培养及试管快繁: 实用植物组织培养技术教程 [M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996.
- Cao Z Y, Liu G M. Tissue culture and *in vitro* rapid propagation of trees. Practical techniques on plant tissue culture [M]. Lanzhou: Gansu Science and Technology Press, 1996. (in Chinese)
- [9] 李毅, 邸利. 箭胡毛杨组培繁殖技术的研究 [J]. 甘肃农业大学学报, 2002, 37(2): 180-184.
- Li Y, Di L. A study on tissue culture technique of *Populus nigra* var *thevestina* $\times$ (*P. diversifolia* + *P. tomentosa*) [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2002, 37(2): 180-184. (in Chinese)
- [10] 湛红辉, 曾杰, 贾宏炎, 等. 光皮桦叶芽离体培养再生植株技术 [J]. 广西林业科学, 2006, 35(3): 123-124.
- Chen H H, Zeng J, Jia H Y, et al. *In vitro* culture regeneration plant technology from leafbud of *Betula luminifera* [J]. Guangxi Forestry Science, 2006, 35(3): 123-124. (in Chinese)
- [11] 陈伟, 林镇斌, 郑郁善. 光皮桦组织培养技术研究 [J]. 福建林业科技, 2006, 33(1): 67-71.
- Chen W, Lin Z B, Zheng Y S. Study on technology of tissue culture in *Betula luminifera* [J]. Journal of Fujian Forestry and Technology, 2006, 33(1): 67-71. (in Chinese)
- [12] Mason H S, Haq T A, Clements J D. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): Potatoes expressing a synthetic LT-B gene [J]. Vaccine, 1998, 16: 1336-1343.
- [13] 贾士荣, 曹冬孙. 转基因植物 [J]. 植物学通报, 1992, 9(2): 3-15.
- Jia S R, Cao D S. Transgenic plants [J]. Chinese Bulletin of Botany, 1992, 9(2): 3-15. (in Chinese)
- [14] 沈海龙. 植物组织培养 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2005: 69.
- Shen H L. Plant tissue culture [M]. Beijing: China Forestry Press, 2005: 69. (in Chinese)
- [15] 王金祥, 严小龙, 潘瑞炽. 不定根形成与植物激素的关系 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(2): 133-142.
- Wang J X, Yan X L, Pan R C. Relationship between adventitious root formation and plant hormones [J]. Plant Physiology Communications, 2005, 41(2): 133-142. (in Chinese)
- [16] 朱青松, 梅康明, 王沙生. 外源生长素对烟草髓愈伤组织分化和内源 IAA 含量的影响 [J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(1): 22-25.
- Zhu Q S, Mei K M, Wang S S. The effects of exogenous auxins on differentiation of tobacco pith callus and content of endogenous IAA [J]. Journal of Beijing Forestry University, 1999, 21(1): 22-25. (in Chinese)
- [17] 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养形态建成及其调控 [M]. 北京: 科学出版社, 1995: 30-32.
- Huang X L, Li X J. Higher plant tissue culture *in vitro* morphogenesis and regulation [M]. Beijing: Science Press, 1995: 30-32. (in Chinese)
- [18] 朱大保. 国外杨树组培微繁技术的进展 [J]. 北京林业大学学报, 1990, 12(1): 84-91.
- Zhu D B. Micropropagation technical progress and tissue culture of foreign poplar [J]. Journal of Beijing Forestry University, 1990, 12(1): 84-91. (in Chinese)
- [19] 李云, 冯慧, 田砚亭. ‘红地球’葡萄叶片、叶柄不定芽再生体系的建立 [J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 60-62.
- Li Y, Feng H, Tian Y T. Study on ‘Red Globe’ grape leaf and petiole adventitious bud regenerating system [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29(1): 60-62. (in Chinese)
- [20] 高喜叶, 李明, 李晓燕, 等. 樱桃砧木 CAB-6p 离体叶片再生体系的优化 [J]. 果树学报, 2008, 25(4): 589-592.
- Gao X Y, Li M, Li X Y, et al. Optimization of a high efficient regeneration system from leaves *in vitro* in cherry rootstock CAB-6p [J]. Journal of Fruit Science, 2008, 25(4): 589-592. (in Chinese)
- [21] 汪志军, 李康, 处格鲁克·艾尼, 等. 胡杨的组织培养 [J]. 新疆农业科学, 1997(4): 185-186.
- Wang Z J, Li K, Chugeluke · Ai Ni, et al. Study on tissue culture for *Populus euphratica* Oliv. [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 1997(4): 185-186. (in Chinese)
- [22] 李静, 李志兰, 梁海永, 等. 三倍体毛白杨叶片再生体系建立研究 [J]. 河北农业大学学报, 2006, 29(4): 48-51.
- Li J, Li Z L, Liang H Y, et al. Study on the establishment of regeneration of triploids of Chinese white poplar [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2006, 29(4): 48-51. (in Chinese)
- [23] Tokuji Y, Masuda H. Duration of treatment of carrot hypocotyls explants with 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid for direct somatic embryogenesis [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60(5): 891-892.
- [24] Pavlica M, Papes D, Nagy B. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells [J]. Mutant Res, 1991, 263(1): 77-81.