

网络出版时间:2012-05-22 16:36

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120522.1636.033.html>

羊躑躅嫩叶离体培养和植株高效再生技术研究

顾地周, 陆爽, 巴春影, 李媛媛

(通化师范学院 生物系, 吉林 通化 134002)

【摘要】 【目的】建立羊躑躅嫩叶离体培养及植株高效再生体系。【方法】以羊躑躅新生嫩叶为外植体, 筛选嫩叶愈伤组织诱导、再分化及生根培养基, 并以再生植株茎节为试材, 建立高效植株再生体系。【结果】最适合羊躑躅嫩叶愈伤组织诱导的培养基为 $1/2\text{ DR}+2.40\text{ mg/L 2ip}+0.80\text{ mg/L NAA}$, 诱导率为 99.5%; 愈伤组织再分化的最佳培养基为 $1/2\text{ DR}+2.90\text{ mg/L 2ip}+0.01\text{ mg/L NAA}+1.75\text{ mg/L KT}$, 分化率为 99.7%; 适宜生根的培养基为 $1/4\text{ DR}+0.06\text{ mg/L ZT}+0.02\text{ mg/L NAA}$, 生根率达 99.0%。利用再生植株茎节的快繁结果表明, 在 28 d 的培养周期内, 每节段平均增殖达 5 倍以上。【结论】成功建立了羊躑躅嫩叶愈伤组织诱导、再分化芽苗和植株高效再生体系, 可以满足羊躑躅工厂化育苗的需要。

【关键词】 羊躑躅; 离体培养; 愈伤组织; 植株再生体系; 均匀设计

【中图分类号】 Q943.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)06-0189-06

Study on technology of *in vitro* culture and efficient regeneration of plantlet with the new leaves of *Rhododendron molle* (Blume) G. Don

GU Di-zhou, LU Shuang, BA Chun-ying, LI Yuan-yuan

(Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134002, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to establish *in vitro* culture and efficient regeneration of plantlet system of *Rhododendron molle* (Blume) G. Don. 【Method】 The new leaves of *Rhododendron molle* (Blume) G. Don were used as explants for the experiment. Screening mediums of callus induction, callus redifferentiation and rooting, and stems with nodes were taken as the experiment materials to establish efficient regeneration system of plantlet. 【Result】 The results showed that $1/2\text{ DR}+2.40\text{ mg/L 2ip}+0.80\text{ mg/L NAA}$ was the best suit for callus from new leaves, the rate of callus was 99.5%; $1/2\text{ DR}+2.90\text{ mg/L 2ip}+0.01\text{ mg/L NAA}+1.75\text{ mg/L KT}$ for shoots redifferentiation, and the rate of differentiation was 99.7%; $1/4\text{ DR}+0.06\text{ mg/L ZT}+0.02\text{ mg/L NAA}$ for rooting, the rate of rooting was more than 99.0%; Each stem with one node was cut from regenerated shoots and cultured for propagation, and a 5-fold proliferation rate was achieved within 28 days. 【Conclusion】 In this study, callus induction, shoots redifferentiation with the new leaves of *Rhododendron molle* (Blume) G. Don and efficient regeneration system of plantlet have been established, which could satisfy the need for industrialized seedlings of *Rhododendron molle* (Blume) G. Don.

Key words: *Rhododendron molle* (Blume) G. Don; *in vitro* culture; callus; plantlet regeneration; uniform design

* 【收稿日期】 2011-12-12

【基金项目】 吉林省科技厅资助项目“杜鹃花属植物种质资源保护研究”(200705C05)

【作者简介】 顾地周(1973—), 男, 吉林通化人, 讲师, 主要从事珍稀濒危植物和药用植物研究。E-mail: gudizhou@163.com

羊躑躅(*Rhododendron molle* (Blume) G. Don) 又名闹羊花、黄杜鹃、黄色映山红, 隶属杜鹃花科杜鹃花属羊躑躅亚属落叶灌木, 主要分布于江苏、浙江、江西、福建、湖南、湖北、河南、四川、贵州等地的山坡、石缝、灌木丛中, 是珍稀濒危药用植物。羊躑躅花中含有毒性成分木毒素和石楠素, 叶中含黄酮类、杜鹃花毒素、煤地衣酸甲酯, 有镇痛、驱风、除湿、麻醉功效, 可治风湿顽痹、伤折疼痛、皮肤顽癣等症, 对粮食害虫、蔬菜害虫也有一定的防治效果, 可用于开发植物源农药。羊躑躅还可被引种驯化为露地栽培的园艺观赏植物, 是杜鹃育种的重要种质资源。利用种子、扦插、嫁接及压条等常规繁殖方法存在萌发率、生根率和移栽成活率极低等问题, 使羊躑躅的开发及利用受到极大限制。目前, 已有关于羊躑躅及其同属植物离体培养的研究^[1-6], 但尚未见关于羊躑躅高效快繁体系的报道。因此, 本研究利用植物组织培养方法, 以羊躑躅新生嫩叶为材料, 筛选羊躑躅嫩叶愈伤组织诱导及分化和生根的适宜培养基, 建立羊躑躅离体培养和高效的植株再生体系, 以期作为羊躑躅的工厂化育苗提供参考。

1 材料与方法

1.1 外植体材料的来源及处理

羊躑躅枝条由江苏省农业科学研究院提供, 将其枝条茎尖剪除后在实验室内水培促腋芽萌发。待腋芽萌发出鲜嫩叶片后将嫩叶剪下, 在超净工作台上用体积分数 70% 酒精涮洗 10 s, 用次氯酸钠(质量浓度为 3%) 溶液浸泡 6 min, 无菌水冲洗 8 次, 无菌滤纸吸干表面水分后, 切割成 1.00 cm 左右的叶块作为外植体备用。

1.2 羊躑躅嫩叶愈伤组织诱导培养基的筛选

以 1/2 DR 为基本培养基^[7], 内含蔗糖 30 g/L、琼脂粉 6.8 g/L, 再附加不同质量浓度的 2ip(经预试验确定为 1.80~2.30 mg/L) 和 NAA(经预试验确定为 0.10~0.50 mg/L), 调节 pH 为 5.5, 将外植体在(25±2) °C、光照强度 1 000 lx、光照周期 10 h/d 条件下培养。为了提高羊躑躅嫩叶愈伤组织诱导的速度和诱导率, 采用均匀设计法^[8-10], 每处理 10 个外植体, 重复 3 次, 选用 U₁₀(10²) 均匀表, 考察 2ip 和 NAA 不同质量浓度交叉配比对愈伤组织诱导率的影响。嫩叶培养 45 d 后统计诱导率, 筛选最适合羊躑躅嫩叶愈伤组织诱导的培养基。

1.3 羊躑躅嫩叶愈伤组织再分化培养基的筛选

以 1/2 DR 为培养基, 内含蔗糖 30 g/L、琼脂粉

6.5 g/L, 并附加不同质量浓度的 2ip(经预试验确定为 2.00~2.70 mg/L)、NAA(经预试验确定为 0.02~0.05 mg/L) 和 KT(经预试验确定为 1.00~1.50 mg/L), 调节 pH 为 5.6, 将愈伤组织置于(26±2) °C、光照强度 1 200 lx、光照周期 12 h/d 条件下培养。选用 U₁₂(12³) 均匀表, 每处理接种 10 块愈伤组织块, 重复 3 次, 考察 2ip、NAA 和 KT 不同质量浓度交叉配比对分化率的影响。愈伤组织培养 40 d 后统计分化率, 同时筛选最适合羊躑躅愈伤组织芽苗分化的培养基。

1.4 羊躑躅植株再生体系的建立

以 1/4 DR 为培养基, 内含蔗糖 15 g/L、琼脂粉 7.5 g/L, 并附加不同质量浓度的 ZT(经预试验确定为 0.01~0.05 mg/L)、IAA(经预试验确定为 0.10~0.30 mg/L) 和 NAA(经预试验确定为 0.05~0.20 mg/L), 调节 pH 为 5.4, 将愈伤组织再分化的芽苗在(20±2) °C、光照强度 800 lx、光照周期 8 h/d 条件下培养。为了提高羊躑躅愈伤组织再分化芽苗的生根速度和生根率, 采用均匀设计法, 选用 U₁₀(10³) 均匀表, 每处理接种 10 个芽苗, 重复 3 次, 考察 ZT、IAA 和 NAA 不同质量浓度交叉配比对生根率的影响。芽苗培养 35 d 后统计生根率, 筛选最适合羊躑躅芽苗生根的培养基。

采取节增殖方式对羊躑躅进行高效快繁^[11-12], 待生根的苗伸长至 3.00 cm 以上时, 在超净工作台上打开培养瓶, 将生根的苗留 1 或 2 片叶剪下苗干, 并切割成含 1 或 2 片叶的小段转接到附加 GA₃(1.00 mg/L) 的生根培养基中, 进行腋芽萌发伸长和生根培养, 待芽苗生根和腋芽萌发后, 统计并计算每瓶中每段茎节的增殖倍数。

1.5 数据处理与分析

数据分析处理应用均匀设计软件(Uniform Design 3.0V) 进行。

2 结果与分析

2.1 2ip 和 NAA 不同质量浓度配比对羊躑躅嫩叶愈伤组织诱导的影响

基本培养基上附加不同质量浓度 2ip 和 NAA 对羊躑躅嫩叶愈伤组织诱导的影响如表 1 所示, 关于 2ip(X₁) 和 NAA(X₂) 与诱导率(Y₁) 关系的回归分析结果见表 2。由表 1 和表 2 可知, 2ip 和 NAA 对羊躑躅愈伤组织的诱导率均有显著影响, 二者的最佳质量浓度分别为 2.30 和 0.50 mg/L。

表 1 羊蹄躑嫩叶愈伤组织诱导培养基筛选的 $U_{10}(10^2)$ 均匀设计试验结果

Table 1 $U_{10}(10^2)$ uniform design test result for media for callus induction by new leaves of <i>Rhododendron molle</i> (Blume) G. Don							
编号 No.	因素/(mg · L ⁻¹) Factor		诱导率/% Rate of induction (Y ₁)	编号 No.	因素/(mg · L ⁻¹) Factor		诱导率/% Rate of induction (Y ₁)
	2ip (X ₁)	NAA (X ₂)			2ip (X ₁)	NAA (X ₂)	
1	1.80	0.40	64.5	6	2.30	0.20	92.1
2	1.90	0.30	78.8	7	2.00	0.50	82.6
3	2.00	0.10	70.6	8	2.10	0.10	72.0
4	2.10	0.50	81.7	9	2.20	0.30	86.5
5	2.20	0.20	85.0	10	2.30	0.40	96.1

表 2 羊蹄躑嫩叶离体培养和植株再生各阶段试验因素的回归分析

Table 2 Regression analysis of <i>in vitro</i> culture and plantlet regeneration by the new leaf of <i>Rhododendron molle</i> (Blume) G. Don at various stages				
培养阶段 Culture stages	回归方程 Regression equation	样本容量(N) Sample sizes	检验值(F _t) Test value	临界值 Critical value
愈伤组织诱导 Callus induction	$Y_1 = -39.0 + 53.9X_1 + 24.2X_2$	10	19.90	$F_{(0.05,2,7)} = 4.737$
芽苗再分化 Shoots redifferentiation	$Y_2 = 36.2 + 18.0X_1 - 320X_2 + 12.0X_3$	12	24.92	$F_{(0.05,3,8)} = 4.066$
生根培养 Rooting culture	$Y_3 = 79.6 + 360X_1 - 28.2X_3$	10	85.00	$F_{(0.05,2,7)} = 4.737$

注:显著性水平 $\alpha=0.05$ 。
Note:Significance level $\alpha=0.05$.

经计算,2ip 和 NAA 对诱导率的贡献率分别为 95.1% 和 15.4%,可见 2ip 对愈伤组织诱导率的影响远大于 NAA,又因 2ip 和 NAA 均与诱导率呈正相关,因此推测 2ip 质量浓度高于 2.30 mg/L、NAA 质量浓度高于 0.50 mg/L 时诱导率更高。为验证此推断,另设 2ip 质量浓度为 2.30,2.35,2.40,2.45,2.50 mg/L,NAA 为 0.50,0.55,0.60,0.65,0.70,0.75,0.80,0.85,0.90,0.95,1.00 mg/L 共 11 个处理(根据均匀设计法试验原理,以水平数最大的项为最低水平数选择均匀设计表,水平数小于

最大项的进行重复,下同),将 1.00 cm 左右的叶块接种到附加不同质量浓度 2ip 和 NAA 的 1/2 DR 培养基上培养,结果如图 1 所示。培养 10 d 时,叶块开始增厚(图 1a);继续培养至 25 d 时,叶块逐渐增厚变形,在叶块表面出现绿色的愈伤组织;培养至 45 d,叶块完全转变为绿色偏黄的愈伤组织(图 1b)。试验结果显示,2ip 质量浓度为 2.40 mg/L 和 NAA 为 0.80 mg/L 时愈伤组织诱导率最高,诱导率达 99.5%。因此,确定羊蹄躑嫩叶愈伤组织诱导的最佳培养基为 1/2 DR+2.40 mg/L 2ip+0.80 mg/L NAA。

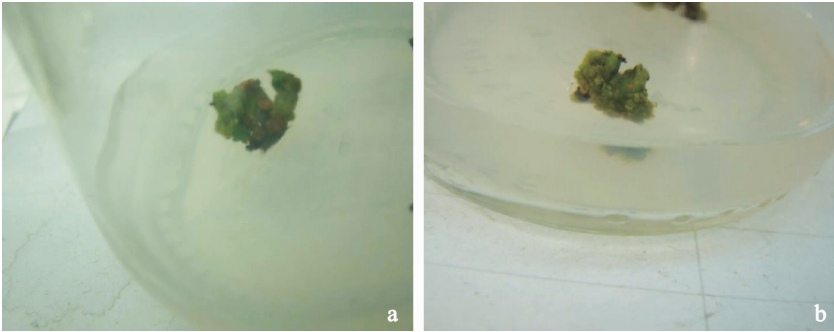


图 1 羊蹄躑嫩叶愈伤组织诱导培养的形态观察
a. 培养 10 d;b. 培养 45 d
Fig.1 Morphological observation of induction of callus with the new leaf of *Rhododendron molle*(Blume) G. Don at various
a. Cultured 10 d;b. Cultured 45 d

2.2 2ip、NAA 和 KT 不同质量浓度对比对羊蹄躑愈伤组织芽苗再分化的影响
培养基上附加不同质量浓度 2ip、NAA、KT 对

羊蹄躑愈伤组织芽苗再分化的影响如表 3 所示,关于 2ip(X₁)、NAA(X₂)、KT(X₃)与分化率(Y₂)关系的回归分析结果见表 2。

表 3 羊蹄躑愈伤组织再分化芽苗培养基筛选的 $U_{12}(12^3)$ 均匀设计试验结果

Table 3 $U_{12}(12^3)$ uniform design test result for media for shoots redifferentiation from callus of *Rhododendron molle* (Blume) G. Don

编号 No.	因素/(mg · L ⁻¹) Factors			分化率/% Rate of differentiation (Y ₂)
	2ip (X ₁)	NAA (X ₂)	KT (X ₃)	
1	2.00	0.04	1.20	74.2
2	2.10	0.05	1.50	80.4
3	2.20	0.05	1.30	70.7
4	2.30	0.04	1.00	78.6
5	2.40	0.05	1.10	75.0
6	2.50	0.03	1.40	85.2
7	2.60	0.04	1.40	88.6
8	2.70	0.02	1.10	92.8
9	2.40	0.03	1.00	82.0
10	2.50	0.02	1.30	89.0
11	2.60	0.02	1.50	94.6
12	2.70	0.03	1.20	91.3

由表 2 和表 3 可知,2ip、NAA 和 KT 对羊蹄躑嫩叶愈伤组织的芽苗再分化率均有显著影响,三者最佳质量浓度分别为 2.70,0.02 和 1.50 mg/L。经计算,2ip、NAA 和 KT 对芽苗分化率的贡献率分别为 16.2%,13.3%和 8.15%,可见 2ip 对愈伤组织芽苗再分化率的贡献大于 NAA 和 KT,又因 2ip 和 KT 均与分化率呈正相关,NAA 与分化率呈负相关,推测 2ip 和 KT 质量浓度分别高于 2.70 和 1.50 mg/L,NAA 低于 0.02 mg/L 时,芽苗分化率更高。为验证此推断,另设 2ip 质量浓度为 2.70,2.75,2.80,2.85,2.90,2.95,3.00 mg/L,NAA 为 0.00,0.01,0.02 mg/L,KT 为 1.50,1.55,1.60,1.65,1.70,1.75,1.80,1.85,1.90,1.95,2.00 mg/L,共

11 个处理,待嫩叶块完全脱分化形成愈伤组织后,将愈伤组织切割成小块接种到添加不同浓度 2ip、NAA 和 KT 的 1/2 DR 培养基上,培养 10 d 后发现,愈伤组织表面产生大量颗粒状小凸起;继续培养至 20 d,颗粒状小凸起逐渐转变为锥状;培养至 30 d 时,锥状体生长并伸长为大量不定芽(图 2a);培养至 40 d,不定芽长度可达 1.00 cm 以上(图 2b)。研究发现,2ip 质量浓度为 2.90 mg/L、NAA 为 0.01 mg/L、KT 为 1.75 mg/L 时,愈伤组织分化率最高,可达 99.7%。可见,羊蹄躑嫩叶愈伤组织芽苗再分化的最佳培养基为 1/2 DR+2.90 mg/L 2ip+0.01 mg/L NAA +1.75 mg/L KT。

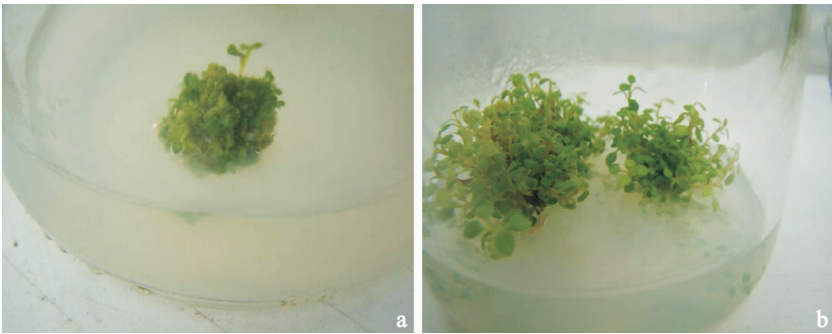


图 2 羊蹄躑嫩叶愈伤组织芽苗再分化培养的形态观察
a. 培养 30 d;b. 培养 40 d

Fig. 2 Morphological observation of shoots redifferentiation from callus with the new leaf of *Rhododendron molle* (Blume) G. Don at various
a. Cultured 30 d;b. Cultured 40 d

2.3 ZT、IAA 和 NAA 不同质量浓度配比对羊蹄躑再生芽苗生根的影响

培养基中附加不同质量浓度 ZT(X₁)、IAA

(X₂)和 NAA(X₃)对羊蹄躑再生芽生根的影响见表 4,关于 3 种激素与生根率(Y₃)关系的回归分析结果见表 2。

表 4 羊蹄躑再生芽苗生根培养基筛选的 $U_{10}(10^3)$ 均匀设计试验结果

Table 4 $U_{10}(10^3)$ uniform design test result for media for shoots rooting of *Rhododendron molle* (Blume)G. Don

编号 No.	因素/(mg · L ⁻¹) Factors			生根率/% Rate of rooting (Y ₃)
	ZT (X ₁)	IAA (X ₂)	NAA (X ₃)	
1	0.01	0.30	0.10	82.0
2	0.02	0.30	0.15	82.4
3	0.03	0.25	0.20	85.5
4	0.04	0.25	0.15	88.3
5	0.05	0.20	0.10	95.9
6	0.05	0.20	0.15	94.3
7	0.04	0.15	0.20	87.6
8	0.03	0.15	0.05	87.3
9	0.02	0.10	0.05	85.4
10	0.01	0.10	0.20	77.0

由表 2 和表 4 可知,ZT 和 NAA 对羊蹄躑嫩叶愈伤组织分化的芽苗生根率有显著影响,IAA 对生根率影响不显著。ZT 和 NAA 的最佳质量浓度均为 0.05 mg/L。经计算,ZT 和 NAA 对芽苗生根的贡献率分别为 94.5%和 8.82%,可见 ZT 对再生芽苗生根率的贡献远大于 NAA,因 ZT 与生根率呈正相关,NAA 与生根率呈负相关,推测 ZT 质量浓度高于 0.05 mg/L,NAA 低于 0.05 mg/L 时,芽苗生根率更高。为验证此推断,另设 ZT 质量浓度为 0.05,0.06,0.07,0.08,0.09,0.10 mg/L,NAA 为 0.00,0.01,0.02,0.03,0.04,0.05 mg/L 共 12 个处理(为了试验结果的准确性,将水平数进行 1 次重

复),即待愈伤组织分化的芽苗长至 1.50 cm 左右时,将生长健壮的芽苗从愈伤组织上切下,转接到附加不同质量浓度 ZT 和 NAA 的 1/4 DR 培养基中,培养 8 d 后,在靠近芽苗切口的茎部有微小颗粒出现;继续培养至 20 d,微小颗粒逐渐变形为锥状;培养至 27 d 时锥状颗粒伸长为不定根;35 d 后可形成 3~5 条不定根,并有侧根出现(图 3a)。研究发现,ZT 质量浓度为 0.06 mg/L、NAA 为 0.02 mg/L 时芽苗生根率最高,生根率可达 99.0%。可见,羊蹄躑再生芽苗生根的最佳培养基为 1/4 DR+0.06 mg/L ZT+0.02 mg/L NAA。

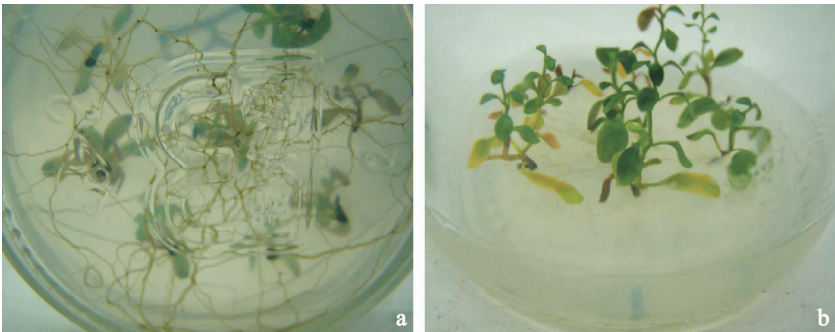


图 3 羊蹄躑再生芽苗生根培养的形态观察

a. 出现侧根;b. 附加 GA3 后增殖培养

Fig. 3 Morphological observation of shoots rooting from regeneration shoot of *Rhododendron molle* (Blume)G. Don at various
a. Lateral roots appeared;b. Multiplication culture with GA3

在改良的生根培养基(1/4 DR+0.06 mg/L ZT+0.02 mg/L NAA+1.00 mg/L GA₃)上培养 28 d 后发现,羊蹄躑每节段平均增殖 5 倍以上(图 3b)。

3 结论与讨论

本研究成功建立了羊蹄躑嫩叶愈伤组织诱导、

再分化芽苗的培养体系和植株高效再生体系。培养基 1/2 DR+2.40 mg/L 2ip+0.80 mg/L NAA 对羊蹄躑嫩叶愈伤组织诱导的效果最好,当 2ip 和 NAA 质量浓度分别超过 2.40 和 0.80 mg/L 时,诱导的愈伤组织颜色变白且质地变松软而失去分化能力;当二者质量浓度分别低于 1.80 和 0.10 mg/L 时,愈伤组织诱导率均低于 48.0%。在 1/2 DR 培

培养基中附加 2.90 mg/L 2ip、0.01 mg/L NAA 和 1.75 mg/L KT 时,其对羊躑躅嫩叶愈伤组织再分化的效果最佳,2ip 质量浓度低于 2.00 和高于 2.90 mg/L 时,愈伤组织芽苗分化率均下降至 50.0% 以下,说明低质量浓度的 2ip 满足不了羊躑躅愈伤组织芽苗分化的需要,而过多的 2ip 对愈伤组织芽苗的分化有抑制作用。在培养基中添加适量的 NAA 有利于芽苗的生长。在培养基中附加 1.75 mg/L 的 KT,分化的芽苗较未附加 KT 时粗壮、长势好且分化速度快,这与姜云天等^[13]对杜鹃花科植物细叶杜香的快繁研究结果相似,说明每种植物对不同植物生长调节物质均具有选择性^[14],这是由植物自身的基因型控制的,而基因型又决定于器官重建。添加有 0.06 mg/L ZT 和 0.02 mg/L NAA 的 1/4 DR 培养基,适合用于羊躑躅芽苗的生根培养,当 NAA 质量浓度低于 0.02 mg/L 时,芽苗几乎不生根,高于 0.20 mg/L 时,芽苗基部膨胀或产生愈伤组织,继续培养,根则从膨胀部或愈伤组织上产生,这样的苗在移栽时根易随愈伤组织从苗基部脱落,移栽成活率极低,这与 Danielle 等^[15]的研究结果一致,可能是根和苗茎部的纤维疏导组织连接错位所致;而在生根培养基中附加 1.00 mg/L 的 GA₃ 有助于腋芽快速萌发和生长^[16],有利于缩短生长周期,从而提高了增殖倍数。王雯雯等^[17]在大字杜鹃的快繁研究中也得到了相同结果。

目前,国外有许多野生杜鹃优良品种已通过人工繁殖并驯化为园艺栽培种,我国野生杜鹃品种众多,但人工繁殖及开发利用极少。羊躑躅是我国的珍稀植物资源,至今尚未见推广应用,因此本研究结果可为羊躑躅和其他野生杜鹃优良品种的开发利用和工厂化育苗提供参考。

[参考文献]

[1] 顾宏辉,袁群英,朱春艳,等. 羊躑躅的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2006,42(4):683.
Gu H H, Yuan Q Y, Zhu C Y, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Rhododendron molle* G. Don [J]. Plant Physiology Communications, 2006, 42(4): 683. (in Chinese)

[2] 汤桂钧,张建安,蒋建平,等. 高山杜鹃的组织培养快速繁殖技术研究[J]. 上海农业学报,2004,20(3):15-18.
Tang G J, Zhang J A, Jiang J P, et al. Study on rapid propagation of *Rhododendron lapponicum* [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2004, 20(3): 15-18. (in Chinese)

[3] 宫汝淳,姜云天,顾地周,等. 短果杜鹃的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2008,44(1):133.
Gong R C, Jiang Y T, Gu D Z, et al. Tissue culture and rapid

propagation of *Rhododendron brachycarpum* D. Don ex G. Don [J]. Plant Physiology Communications, 2008, 44(1): 133. (in Chinese)

[4] 顾地周,邓志刚,蔡茂伟,等. 苞叶杜鹃离体培养及种质试管保存体系的建立[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2009,33(3):20-24.
Gu D Z, Deng Z G, Qi M W, et al. In vitro culture and in vitro germplasm preservation system of *Rhododendron redowskianum* Maxim. [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2009, 33(3): 20-24. (in Chinese)

[5] 顾地周,高捍东,郭玉昕,等. 毛毡杜鹃离体培养及种质试管保存体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2009,37(4):151-157.
Gu D Z, Gao H D, Guo Y X, et al. In vitro culture and germplasm preservation in vitro system of *Rhododendron confertissimum* Nakai. [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2009, 37(4): 151-157. (in Chinese)

[6] 顾地周,张琪,朱俊义. 小叶杜鹃的离体快繁体系建立及种质试管的保存[J]. 东北林业大学学报,2009,37(10):26-28.
Gu D Z, Zhang Q, Zhu J Y. Establishment of plantlet rapid propagation system and in vitro germplasm conservation of *Rhododendron parvifolium* [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2009, 37(10): 26-28. (in Chinese)

[7] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,2002:24-33.
Cao Z Y, Liu G M. Practical course in plant tissue culture technology [M]. Lanzhou: Gansu Science and Technology Press, 2002: 24-33. (in Chinese)

[8] 顾地周,罗微,曹逊,等. 松毛翠的离体快繁体系建立及种质试管保存研究[J]. 林业科学,2009,45(7):140-144.
Gu D Z, Luo W, Cao X, et al. Rapid propagation system and germplasm preservation in vitro of *Phyllodoce caerulea* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2009, 45(7): 140-144. (in Chinese)

[9] 智翠梅. 均匀设计及优化[J]. 化工中间体,2007(3):7-10.
Zhi C M. Uniform design to organic synthesis optimize [J]. Chemical Intermediates, 2007(3): 7-10. (in Chinese)

[10] 顾地周,朱俊义,冯颖,等. 草莓试管内诱导匍匐茎和高温处理结合茎尖培养脱毒技术研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2010,38(11):89-94.
Gu D Z, Zhu J Y, Feng Y, et al. Technology for stolon seedling in vitro of strawberry and virus eradication by combining the high temperature treatment with shoot tip culture [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2010, 38(11): 89-94. (in Chinese)

[11] 顾地周,丛小力,姜云天,等. 色木槭的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2008,44(2):314.
Gu D Z, Cong X L, Jiang Y T, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Acer mono* Maxim [J]. Plant Physiology Communications, 2008, 44(2): 314. (in Chinese)