

羊躑躅离体叶片再生体系的建立

孙晓波, 苏家乐, 刘晓青, 邓衍明, 梁丽建, 肖政

(江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室/江苏省农业科学院休闲农业研究所, 南京 210014)

摘要:为了建立羊躑躅规模化无性繁殖和高效遗传转化体系,以羊躑躅试管苗叶片为外植体,探讨了基本培养基类型、叶片切割方式、叶位、暗培养时间及不同激素组合等因素对叶片再生不定芽的影响。结果表明:WPM培养基为最适基本培养基。垂直于主脉切割一刀并去除叶柄和叶稍的叶片再生不定芽的频率最高。羊躑躅试管苗中、上部叶片的再生能力较强,其中第5和第6位叶的不定芽诱导效果最佳。初始暗培养有利于叶片再生,暗培养10~15天的效果最佳。诱导羊躑躅试管苗叶片再生不定芽的适宜培养基为WPM+TDZ 1.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L,其不定芽分化率和平均分化芽数分别达到82.3%和7.2个。

关键词:羊躑躅;组培苗叶片;再生;不定芽

中图分类号:S685.21

文献标志码:A

论文编号:casb17030197

Establishment of *in vitro* Leaf Regeneration System of *Rhododendron molle* (Blume) G. Don

Sun Xiaobo, Su Jiale, Liu Xiaoqing, Deng Yanming, Liang Lijian, Xiao Zheng

(Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement/Institute of Leisure Agriculture/

Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

Abstract: To establish a system for large-scale vegetative propagation and efficient genetic transformation of *Rhododendron molle*, the leaves of *Rhododendron molle* plantlets *in vitro* were used as explants, the effects of basic medium type, leaf cutting mode, leaf position, darkness culture time and different hormone combinations on the adventitious bud regeneration of leaves were studied. The results showed that WPM medium was the optimal basic culture medium. The regeneration frequency of adventitious buds was the highest in the leaves which were cut perpendicularly in the main veins and the petioles and leaf apexes were removed. The regeneration ability of leaves at middle and upper parts of a plantlet was stronger, and the induction effect of adventitious bud from leaves at the 5th and 6th positions was the best. The initial dark culture was beneficial to regeneration of leaves and the optimal time of dark culture was 10–15 d. The optimum medium for adventitious bud regeneration was WPM+TDZ 1.0 mg/L+ IAA 1.0 mg/L and the regeneration frequency was 82.3% and the average number of adventitious bud was 7.2.

Key words: *Rhododendron molle*; leaves of tissue cultured seedling; regeneration; adventitious bud

0 引言

羊躑躅 [*Rhododendron molle* (Blume) G. Don], 又

名闹羊花、黄杜鹃、黄色映山红,隶属于杜鹃花科杜鹃花属羊躑躅亚属落叶灌木,是中国羊躑躅亚属中仅有

基金项目:国家自然科学基金“基于转录组学挖掘调控羊躑躅花瓣黄色性状形成的关键基因”(31600570);江苏省农业科技自主创新项目“优新树种选育与高效栽培技术方案”[CX(16)1005];江苏省自然科学基金“调控羊躑躅花色突变体花瓣呈色的关键基因挖掘”(BK20150548)。

第一作者简介:孙晓波,女,1974年出生,内蒙古鄂伦春自治旗人,副研究员,博士,主要从事花卉遗传育种研究。通信地址:210014 江苏省南京市玄武区钟灵街50号 江苏省农科院休闲农业研究所, Tel:025-84399306, E-mail:sunxiaobojaas@163.com。

通讯作者:肖政,男,1984年出生,福建三明人,助理研究员,博士,主要从事花卉遗传育种研究。通信地址:210014 江苏省南京市玄武区钟灵街50号 江苏省农科院休闲农业研究所, Tel:025-84390223, E-mail:xzforestry@163.com。

收稿日期:2017-03-20, **修回日期:**2017-04-21。

的一个原生种^[1]。羊躑躅树枝优美,花繁色艳,具有较高的观赏价值,也是杜鹃花色品种改良的重要资源^[2-3]。同时,羊躑躅也是珍稀濒危药用植物,其全株器官均含有多种活性成分,具有祛湿、除风、解痛等功效,可用于治疗风湿、高血压和慢性肾小球炎等病^[4-5];羊躑躅对农作物虫害的防治也有一定的作用,是开发绿色农药的植物源^[6]。由此可见羊躑躅具有巨大的开发潜力和应用前景。羊躑躅主要是通过种子、扦插等方式繁殖。但羊躑躅的种子细小难采集,且种子萌发率较低,种子苗生长缓慢,距开花结果的时间较长;以扦插、嫁接方式繁殖又存在生根率低、移栽成活率不高等问题,使其开发及利用受到极大限制^[7]。因此,亟待采取有效的方法对羊躑躅加以繁殖,使之能够规模化生产,满足人们日益增长的需求。

利用植物组织培养技术繁殖羊躑躅可以不受季节和环境条件等因素的影响,并能得到大规模整齐的瓶苗,且繁殖系数高,是解决上述难题的重要途径。目前有关羊躑躅组织培养与离体繁殖方面的研究较少。2006年顾宏辉等^[8]以羊躑躅茎尖和带腋芽茎段为外植体,接种在含ZT和NAA的Read培养基上进行芽的诱导和增殖,增殖系数为4~5倍。2010年罗向东等^[9]以野生黄杜鹃茎尖为试材,建立了黄杜鹃离体再生体系。2012年顾地周等^[10]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,建立了羊躑躅离体再生体系。2012年顾地周等^[7]通过嫩茎基部直接再生芽苗,并以再生植株茎节为材料进行快繁的方式建立羊躑躅离体培养和植株再生体系。2013年邵殿坤等^[11]以新生嫩茎段为外植体,建立了羊躑躅腋芽丛生和高效植株再生体系。然而直到目前为止,还没有以羊躑躅叶片作为外植体直接诱导分化不定芽的报道。叶片离体再生不定芽是植物组织培养的一种方式,具有分化周期短、繁殖系数高、再生苗健壮,且再生的植株很少或不会发生体细胞变异等优点,被认为是解决扦插繁殖困难树种规模化无性繁殖的有效途径^[12-13];同时叶盘法也是在植物转基因研究中使用较为广泛的有效方法之一,因此羊躑躅离体叶片再生体系的建立不仅可用于规模化无性繁殖,对后续的遗传转化研究也具有重要意义。本研究在前人研究基础上,采用羊躑躅试管无菌苗叶片为外植体,研究了基本培养基类型、叶片切割方式、叶位、暗培养时间及不同激素组合等因素对叶片再生不定芽的影响,建立了羊躑躅离体叶片再生体系,大大缩短了繁殖时间。羊躑躅离体叶片再生体系如果和羊躑躅的茎段增殖方式同时应用于羊躑躅的组培快繁,可以使羊

躑躅在短时间内大量、快速、高质量的繁殖,能有效地满足人们对羊躑躅日益增长的需求,降低生产周期和成本;同时羊躑躅离体叶片再生体系的建立也为羊躑躅遗传转化体系的建立奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与基本培养条件

本试验材料为继代4次以上的羊躑躅组培苗。羊躑躅无菌组培苗的获得和增殖培养参考顾宏辉等^[8]的方法。除特殊说明外,均取羊躑躅组培苗形态学第3~6位的叶片,去除叶稍和叶柄并在叶片中部垂直于叶脉横切一刀,叶面朝上接种在培养基上,接种后均先暗培养10天后再进行光照培养。培养条件为培养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照时间为12 h/d,光照强度为 $40\sim 60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

1.2 方法

1.2.1 基本培养基的筛选 采用WPM^[14]、Aderson^[15]和MS^[16]等3种不同类型培养基,分别附加TDZ 0.2 mg/L和IAA 1.0 mg/L,蔗糖30 g/L,琼脂30 g/L,pH值调为5.8,剪取羊躑躅组培苗叶片进行接种,筛选最适宜羊躑躅组培苗叶片分化再生不定芽的基本培养基。每个处理接种6瓶,每瓶接种10个叶片,光照培养45天后统计再生频率和平均再生芽数。

1.2.2 叶片切割方式的筛选 剪取羊躑躅组培苗叶片,分别采取以下4种处理方式:①不切割,②在叶片中部垂直于叶脉横切一刀形成伤口,③去除叶稍和叶柄并在叶片中部垂直于叶脉横切一刀形成伤口,④去除叶稍和叶柄并在叶片中部垂直于叶脉横切两刀形成伤口,接种在WPM+0.2 mg/L TDZ+1.0 mg/L IAA+30 g/L蔗糖+7 g/L琼脂的培养基上,pH 5.8,每个处理接种6瓶,每瓶接种10个叶片,光照培养45天后统计叶片不定芽诱导率及平均不定芽数。

1.2.3 暗培养时间的筛选 剪取羊躑躅组培苗叶片,接种在WPM+0.2 mg/L TDZ+1.0 mg/L IAA+30 g/L蔗糖+7 g/L琼脂的培养基中,pH 5.8,分别暗处理0、5、10、15、20天后,进行光照培养。每个处理接种8瓶,每瓶接种10个叶片,在培养55天后统计叶片不定芽诱导率及平均不定芽数。

1.2.4 叶位的比较 分别取羊躑躅组培苗形态学的1和2位、3和4位、5和6位、7和8位、9和10位叶片,接种于含有0.2 mg/L TDZ和1.0 mg/L IAA的WPM培养基上,光照培养45天后统计叶片不定芽诱导率及平均不定芽数。每处理3瓶,每瓶接种10片叶,并重复3次。

1.2.5 激素的筛选 选择WPM作为基本培养基,用不同浓度的TDZ与NAA、IAA、IBA进行组合,筛选适宜

分化的激素种类及浓度。每个处理接种8瓶,每瓶接种10个叶片,光照培养45天后统计叶片不定芽诱导率及平均不定芽数。

1.3 数据处理与分析

将叶片外植体放置于不定芽诱导培养基上,光照培养45天后调查不定芽诱导率和平均不定芽数。参照公式(1)、(2)分别计算不定芽诱导率和平均不定芽数。

不定芽诱导率=(形成不定芽的叶片数/接种叶片外植体数) $\times 100\%$ (1)

平均不定芽数=不定芽总数/形成不定芽的叶片数..... (2)

采用Excel 2007软件对实验数据进行统计和差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 基本培养基对羊蹄躅组培苗叶片分化不定芽的影响

羊蹄躅组培苗叶片在WPM、Anderson和MS培养基上均能诱导产生不定芽,但不定芽再生率、平均再生

芽数和不定芽的生长状况却有明显差异(见表1、图1)。在WPM和Anderson培养基上组培苗叶片出现不定芽的时间早,诱导率均达率80%以上,平均不定芽数达4~5个,两者之间没有显著差异。但在WPM培养基上叶片再生不定芽的效果相对最好,不定芽叶色浓绿、生长健壮,而在Anderson培养基上叶片再生的不定芽叶色偏黄,长势较弱,质量不如WPM培养基上的不定芽。MS培养基上叶片再生不定芽的效果较差,不定芽出现时间晚,不定芽再生率不到40%,不定芽的数目少,长势较弱。

2.2 叶片切割方式对羊蹄躅组培苗叶片分化不定芽的影响

叶片切割方式对羊蹄躅组培苗叶片分化不定芽具有较大的影响(见表2),第①和第②种叶片切割方式的叶片大部分最终变褐死亡,很少有不定芽再生;而采用第③种方式,即去除叶稍和叶柄并在叶片中部垂直于叶脉横切一刀形成伤口的切割方式,有效地提高了叶片直接再生不定芽的频率,且不定芽主要发生在叶片切口处(见图2),叶片再生不定芽百分率达高达

表1 不同培养基对羊蹄躅组培苗叶片直接再生不定芽的影响

培养基类型	芽再生率/%	平均再生芽数/个	生长状况
WPM	86.2 \pm 17.2a	4.7 \pm 1.0a	不定芽叶色绿,长势壮
Anderson	81.7 \pm 11.7a	4.9 \pm 1.3a	不定芽叶色淡绿,长势弱
MS	32.2 \pm 12.5b	2.1 \pm 1.1b	不定芽的数目少,长势较弱

注:表中同列小写字母表示在5%显著水平上的差异显著性。下同。



图1 叶片在WPM(左)、Anderson(中)和MS(右)培养基上分化出的不定芽

表2 不同切割方式对羊蹄躅组培苗叶片直接再生不定芽的影响

叶片切割方式	芽再生率/%	平均再生芽数/个	不定芽生长状况
①	0	d	叶片全部变褐死亡,无不定芽分化
②	3.8 \pm 2.1c	1.3 \pm 0.6b	叶片大部分变褐死亡,少数不定芽出现在切口处
③	86.2 \pm 17.2a	4.7 \pm 1.0a	叶片大部分分化,不定芽出现在叶柄、叶稍和叶中切口处
④	57.5 \pm 10.2b	4.3 \pm 2.1a	叶片一部分变褐死亡,不定芽出现在叶柄、叶稍和叶中切口处



图2 叶片在切口处分化不定芽

86.2%，平均再生芽数4.7个/叶；而采用第④种方法叶片再生率显著降低，主要原因可能是切口过多导致叶片死亡率增加，从而降低了其再生频率。

2.3 暗培养时间对羊蹄躅组培苗叶片分化不定芽的影响

不同暗培养时间对羊蹄躅叶片分化不定芽的影响

如表3所示。暗处理0或5天后转为光照培养，羊蹄躅组培苗叶片的分化率分别为32%和50%，平均再生不定芽数为2.1和3.1个；而暗处理10或15天后转为光照培养，羊蹄躅组培苗叶片的分化频率和平均再生不定芽数均显著提高，分化率分别为86.2%和78.3%，而平均再生不定芽数也分别提高到4.7和4.3个。但当暗培

表3 暗培养时间对羊蹄躅组培苗叶片直接再生不定芽的影响

暗培养时间/d	芽再生率/%	平均再生芽数/个	不定芽生长状况
0	32±16.4c	2.1±0.8c	叶片大部分变褐死亡，不定芽出现时间晚
5	50±11.0b	3.1±1.0b	叶片部分变褐死亡，不定芽出现时间晚
10	86.2±12.7a	4.7±1.0a	叶片大部分分化，不定芽出现时间早
15	78.3±11.7a	4.3±0.7a	叶片大部分分化，不定芽出现时间早
20	53.3±14.0b	3.3±1.7b	叶片部分出现黄绿色愈伤，部分分化不定芽，不定芽出现时间早

养时间达到20天时，由于愈伤组织的形成抑制了叶片直接分化不定芽，叶片的分化率反而下降到53.3%，不定芽数为3.3个。

2.4 羊蹄躅组培苗不同叶位叶片分化不定芽的比较

在前期的试验中观察发现较嫩的、颜色浅绿的叶片和叶片较厚的、颜色深绿的叶片不定芽的再生频率均较低，因此推测羊蹄躅组培苗不同位置的叶片存在着不同的生理状态，可能对叶片诱导不定芽产生影

表4 羊蹄躅组培苗不同叶位叶片不定芽诱导率和平均不定芽数的比较

叶位	芽再生率/%	平均再生芽数/个
1,2	22.5±9.8c	4.3±0.9a
3,4	76.3±11.2a	4.9±1.0a
5,6	81.6±12.6a	5.2±1.3a
7,8	58.3±10.8b	4.6±1.1a
9,10	37.8±8.5c	4.1±0.6a

响。外植体叶位对羊蹄躅组培苗叶片不定芽诱导的影响见表4。结果表明，采用羊蹄躅组培苗不同叶位的叶片作为外植体，不定芽诱导率存在一定差异，其中，第3至第6位叶片不定芽诱导率显著高于其他叶位，但平均不定芽数差异不显著。第5和第6位叶片不定芽诱导率最高，达到81.6%，平均不定芽数也最多，为5.2；第3和第4位叶片不定芽诱导率为76.3%，平均不定芽数为4.9。综合分析结果显示，羊蹄躅组培苗植株中上部叶片的不定芽诱导能力优于顶部和下部叶片，其中第3~6叶位为适宜的外植体取样叶位。

2.5 不同激素对比对羊蹄躅组培苗叶片分化不定芽的影响

植物激素的种类和浓度对叶片再生过程中叶片不定芽的再生以及生长起重要的调节作用。本研究根据预备试验结果选择TDZ、IAA、NAA及IBA作为羊蹄躅组培苗叶片再生的主要激素种类。羊蹄躅组培苗叶片接种于含有不同浓度激素组合的分化培养基上，经

表5 不同激素对比对羊蹄躅组培苗叶片直接再生不定芽的影响

TDZ/(mg/L)	IAA/(mg/L)	IBA/(mg/L)	NAA/(mg/L)	芽再生率/%	平均再生芽数/个
0.1	1.0	0	0	22.5±12.6c	2.3±0.5e
0.2	1.0	0	0	86.2±12.7a	4.7±1.0c
0.5	1.0	0	0	78.3±17.5a	5.9±0.8b
1.0	1.0	0	0	82.3±15.3a	7.2±1.4a
1.0	0	1.0	0	50.4±13.7b	6.5±0.8a
1.0	0	0	1.0	25.3±10.1c	4.5±0.6c
2.0	1.0	0	0	79.3±18.3a	6.2±1.1b
0.1	2.0	0	0	15.3±11.8c	1.2±0.6f
0.2	2.0	0	0	51.7±14.7b	2.1±0.9e
0.5	2.0	0	0	61.6±9.7b	3.1±0.5d
1.0	2.0	0	0	68.3±13.5b	4.2±1.3c

10天暗培养后,伤口处发生皱缩,移到光下培养10~15天后叶片伤口处出现绿色瘤状突起,20天左右叶片伤口处出现绿色芽点,30天后叶片伤口处形成丛生的不定芽(见图2)。不同激素浓度处理组合间羊蹄躅组培苗叶片的不定芽再生率和再生系数统计结果见表5。从表5可以看出,不同浓度TDZ与IAA、NAA及IBA组合对诱导羊蹄躅组培苗叶片再生不定芽具有显著差异。在基本培养基(WPM)和IAA1.0 mg/L的情况下,随着TDZ浓度的升高,羊蹄躅组培苗叶片的不定芽再生率和再生系数均显著提高,TDZ浓度在0.2~2.0 mg/L时,‘羊蹄躅’组培苗叶片不定芽再生率达78.3%~86.2%,没有显著差别,而接种于激素配比终浓度为TDZ 1.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L培养基上的叶片外植体分化芽数最多,平均为7.2个,显著高于其他组合;当IAA提高到2.0 mg/L时,与IAA 1.0 mg/L相比,不同浓度TDZ下的羊蹄躅组培苗叶片的不定芽再生率和再生系数均显著降低。而当TDZ浓度相同(1.0 mg/L)时,IAA诱导羊蹄躅组培苗叶片再生不定芽的再生率和再生系数显著高于IBA和NAA。综上所述,诱导羊蹄躅组培苗叶片再生不定芽的最适激素组合为TDZ 1.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L。

3 结论

(1)羊蹄躅组培苗叶片诱导再生不定芽的最适培养基为WPM + TDZ1.0 mg/L+ IAA 1.0 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂7.0 g/L。

(2)以羊蹄躅组培苗顶生第3~6个叶片作为外植体诱导产生不定芽的频率最高。

(3)将离体叶片垂直于主脉切割一刀并去除叶柄和叶稍,接种后暗培养10~15天再进行光照培养,能显

著提高叶片外植体不定芽的分化率和不定芽数。

4 讨论

就基本培养基而言,大多数成功的杜鹃组织培养均使用盐浓度较低的基本培养基^[17]。但研究也显示,杜鹃花品种不同,其最适培养基的选择也不尽相同^[17]。本研究结果表明,‘羊蹄躅’组培苗叶片直接分化不定芽对基本培养基类型较敏感。中等无机盐含量的WPM和Anderson培养基较适宜羊蹄躅组培苗叶片直接分化不定芽,而高无机盐含量的MS培养基不利于羊蹄躅组培苗叶片不定芽的分化。羊蹄躅组培苗叶片在WPM培养基上再生不定芽效果好,而在Anderson培养基上再生的不定芽叶色偏黄,长势较弱。Anderson培养基中铁盐的含量较高,是WPM中的2倍,这说明Anderson培养基中过高的铁盐可能对叶片不定芽的生长产生毒害作用。罗向东等^[9]比较研究了3种不同培养基对野生黄杜鹃茎尖不定芽增殖的影响,结果也表明,在相同激素种类与浓度下,WPM培养基上的不定芽增殖系数最大。

目前,在许多植物的离体叶片培养中均证实暗培养可以促进不定芽的诱导^[18-19]。在薄荷叶片暗培养研究中发现,暗培养20天可以提高叶片不定芽的再生率^[20];苹果梨叶片不定芽的诱导也必须经过暗培养,并且暗培养时间太长或太短都不利于不定芽的诱导^[21]。本研究也得出了类似的结果。虽然暗培养不是诱导羊蹄躅组培苗叶片再生不定芽的必需条件,但可以显著提高羊蹄躅组培苗叶片不定芽诱导率和不定芽数。羊蹄躅组培苗叶片暗培养10天,不定芽诱导率可提高至86.2%,平均不定芽数也达到4.7个;但继续延长暗培养时间至20天时,由于愈伤的形成,不定芽诱导率和芽数又明显下降。因此,培养前期暗培养10~15天能

显著提高羊躑躅组培苗叶片不定芽的诱导率和不定芽数。

羊躑躅组培苗叶片着生位置影响叶片分化效果。以羊躑躅组培苗第5和第6位叶片作为外植体,叶片不定芽诱导率最高;其次是第3和第4位叶片;而第1、第2、第9和第10位叶片的不定芽诱导率较低,均在40%以下。这说明羊躑躅组培苗上部和中部叶片比顶部和下部叶片的再生能力强,有利于分化不定芽,这与周瑞金等^[22]和王鲁北等^[19]的研究结果相似,其原因可能与不同叶位叶片内源激素水平分布差异有关。

培养基中激素种类和浓度是提高植物离体再生效率的关键因子^[23]。在杜鹃花属植物中,生长调节剂对叶片外植体分化频率的影响存在很大差异,具有品种特异性^[24-25]。1992年Iapichino等^[26]报道2-ip和IBA组合能诱导6种白花杜鹃叶片直接分化不定芽;2009年Pavingerová^[27]采用不同浓度TDZ和IAA组合对15个杜鹃品种叶片进行直接诱导分化不定芽试验,品种间的再生频率差异范围为0~100%,不同品种叶片再生不定芽数也有很大差异。在笔者的预实验中,选用附加不同浓度2-ip与IAA的WPM培养基进行叶片再生试验,结果发现添加一定浓度2-ip与IAA对羊躑躅组培苗叶片再生效果较差,叶片分化不定芽频率低,不定芽出现时间晚,且不定芽数少。Thomas等^[28]认为TDZ可诱导细胞分裂素的生物合成,并可抑制内源生长素的降解,促进外植体分化。因此笔者在本研究中选取具有极高细胞分裂活性的TDZ作为细胞分裂素与IAA配合使用,能有效地诱导羊躑躅组培苗叶片再生不定芽,并能大量增殖丛生芽。生长素类IAA、IBA、NAA等都对各自的外植体再生有不同的作用。在含有1.0 mg/L TDZ的WPM培养基上附加1.0 mg/L NAA后,羊躑躅组培苗叶片较多产生结构致密颜色发白的愈伤组织,很少有不定芽发生;附加1.0 mg/L IBA后,则羊躑躅组培苗叶片产生愈伤组织较少,叶片不定芽分化率明显提高;而附加1.0 mg/L IAA能有效地诱导羊躑躅组培苗叶片产生大量丛生不定芽。

本研究以羊躑躅离体叶片为外植体建立了稳定、高效的离体再生体系,为羊躑躅的规模化无性繁殖以及后续的基因工程育种等研究奠定了技术基础。

参考文献

- [1] 张长芹.杜鹃花[M].北京:中国建筑工业出版社,2003.
- [2] 张长芹,罗吉凤.杜鹃花新品种‘金躑躅’和‘紫艳’[J].园艺学报,2002,29(5):502.
- [3] Ureshino K, Miyajima I, Akabane M. Effectiveness of three-way crossing for the breeding of yellow-flowered evergreen azalea[J]. Euphytica,1998,104(2):113-118.
- [4] Liu Z L, Goh S H, Ho S H. Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst) [J]. Journal of Stored Products Research,2007,43(3):290-296.
- [5] Cheng X A, Xie J J, Hu M Y, et al. Induction of intracellular Ca^{2+} and pH changes in Sf9 insect cells by rhodjaponin-III, a natural botanic insecticide isolated from *Rhododendron molle*[J]. Molecules,2011,16(4):3179-3196.
- [6] 蔡雄,赵红梅.羊躑躅提取物对日本血吸虫虫卵肉芽肿影响[J].中兽医医药杂志,2012,3:50-52.
- [7] 顾地周,陆爽,巴春影,等.羊躑躅嫩茎离体培养和植株再生[J].山东农业大学学报:自然科学版,2012,43(4):574-578.
- [8] 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.
- [9] 罗向东,戴亮芳,罗建林,等.濒危黄杜鹃的离体快速繁殖体系研究[J].西北植物学报,2010,30(4):0645-0651.
- [10] 顾地周,陆爽,巴春影,等.羊躑躅嫩叶离体培养和植株高效再生技术研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2012,40(6):189-200.
- [11] 邵殿坤,顾地周,付航,等.羊躑躅嫩茎腋芽丛生芽诱导和高效植株再生[J].经济林研究,2013,31(1):87-91.
- [12] 蔡国军,朱红斌,陈晓妮,等.三倍体毛白杨组培快繁和工厂化育苗技术研究[J].西北植物学报,2003,23(12):2188-2191.
- [13] Cai X, Kang X Y. *In vitro* tetraploid induction from leaf explants of *Populus pseudo-simonii* Kitag[J].Plant Cell Rep,2011,30(9):1771-1778.
- [14] Lloyd G B, McCown B H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture[J]. Int Plant Prop Soc Proc,1980,30:421-427.
- [15] Anderson W C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron[J].J Amer Soc Hort Sci,1984,109(3):343-347.
- [16] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J].Physiologia Plantarum, 1962,15:473-497.
- [17] 毛元荣,周根余.杜鹃组织培养研究进展[J].株洲师范高等专科学校学报,2003,8(5):20-23.
- [18] 姚婷,张开春,闫国华,等.欧李离体叶片再生体系的建立[J].果树学报,2012,29(4):589-592.
- [19] 王鲁北,张春红,王小敏,等.黑莓品种‘Arapaho’离体叶片不定芽诱导影响因素分析及再生体系建立[J].植物资源与环境学报,2012,21(1):47-51.
- [20] 舒英杰,陆艳,唐玉超,等.薄荷叶片离体再生体系的建立[J].分子植物育种,2016,14(12):3483-3488.
- [21] 李文剑,曹后男,宗成文,等.‘苹果梨’离体叶片再生体系的建立[J].果树学报,2012,29(5):800-803.
- [22] 周瑞金,刘孟军.枣离体叶片高效再生植株的研究[J].园艺学报,2006,33(3):625-628.

-
- [23] Magyar-Tabori K, Dobranszki J, Silva J A T D, et al. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2010, 101(3):251-267.
- [24] Hsia C N, Korban S S. Effect of growth regulators, dark treatment and light intensity on shoot organogenesis from leaf tissue of evergreen azalea[J]. *J. hort. Sci. Biotechnol.*, 1998, 73(1):53-60.
- [25] Tomsone S, Gertner D. *In vitro* shoot regeneration from flower and leaf explants in *Rhododendron*[J]. *Biol. Plant.*, 2003, 46(3):463-465.
- [26] Iapichino G, McCulloch S, Chen T H H. Adventitious shoot formation from leaf explants of *Rhododendron*[J]. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 1992, 30:237-241.
- [27] Pavingerová D. The influence of thidiazuron on shoot regeneration from leaf explants of fifteen cultivars of *Rhododendron*[J]. *Biologia Plantarum*, 2009, 53(4):797-799.
- [28] Thomas J C, Katterman F R. Cytokinin activity induced by thidiazuron[J]. *Plant Physiol*, 1986, 81(2):681-683.