

评述与展望

Review and Progress

植物叶片再生的探究

姜福星¹ 黄远祥² 周鹏² 孙晓兰¹ 赵捷¹ 文好雨¹ 陈其兵^{1*}

¹ 四川农业大学园林研究所, 成都, 611300; ² 四川天艺生态园林集团股份有限公司, 成都, 611300

* 通讯作者, cqj@sicau.com

摘要 植物的叶片是进行蒸腾作用、光合作用和呼吸作用的重要场所,也具有一定的观赏和营养价值。少数植物的叶片具有再生能力,可作为高效再生和遗传转化的受体。用叶片进行再生繁殖,具有取材方便、操作简洁、节约材料、对植株和环境影响少等优点,对科研和生产均具有重要的价值和意义,有待于进一步研究探讨。本研究从植物叶片再生的方式、再生形式和部位、不同因素的影响等方面介绍了植物叶片再生的研究进展。认为在细胞分裂素的作用下,从叶片切口通过愈伤组织间接再生不定芽的方式是最常见,但是效率较低,有待于改进;从叶片边缘和表面的叶脉上直接产生体胚和不定芽的方式极少,效率较高,是理想的方式和形式,最后,探讨了叶片再生的分子机制,并对挖掘植物叶片再生能力在科研和生产中的前景进行了展望。

关键词 植物叶片, 再生能力, 方式形式, 再生机制, 研究应用

Exploration and Research on the Regeneration of Plant Leaf

Jiang Fuxing¹ Huang Yuanxiang² Zhou Peng² Sun Xiaolan¹ Zhao Jie¹ Wen Haoyu¹ Chen Qibing^{1*}

¹ Institute of Garden Research, Sichuan Agriculture University, Chengdu, 611130; ² Sichuan Tianyi Ecological Garden Group Incorporated Company, Chengdu, 611130

* Corresponding author, cqj@sicau.com

DOI: 10.13271/j.mpb.016.006832

Abstract Leaves of plants are important places for transpiration, photosynthesis and respiration, and some leaves have ornamental and nutritional values. The leaves of a few plants have the ability to regenerate and can be used as propagating material and receptors for high efficiency regeneration and genetic transformation, which have the advantages of convenient extraction, simple operation and less influence on plant and environment. Scientific research and production are of great value and significance, but there is no systematic induction and discussion. This paper introduces the methods of plant leaf regeneration, regeneration form and location, the influence of different factors, and the application of leaf regeneration in different plants. It is considered that under the action of cytokinin, the indirect regeneration of adventitious buds from the blade incision through the callus is the most common, but the efficiency is low, and it needs to be improved. The emergence of somatic embryos and buds on the veins on the edges and surfaces is very rare, novel and unique and efficient. It is an ideal way and form. Finally, the molecular mechanism of leaf regeneration is discussed, and the prospect of mining plant leaves as a molecular plant breeding and the industrialization of transgenic plants is prospected.

Keywords Plant leaves, Regeneration ability, Mode and form, Regeneration mechanism, Research and application

叶片通常被认为是植物进行光合作用、呼吸作用和蒸腾作用的主要场所,部分叶片也具有观赏价值和营养价值(严松等, 2008);在农林生产中,人们发现可以摘取少数植物的叶片直接扦插到疏松透气的基质中(蛭石, 珍珠岩, 细沙和沙土中),叶片可以从切口或创伤处形成不定根从而成为完整的植株,产

基金项目 本研究由四川省教育厅重点项目(15ZA0023)项目和立体绿化品种选育项目(640H1000)共同资助

引用格式 Jiang F.X., Huang Y.X., Zhou P., Sun X.L., Zhao J., Wen H.Y., and Chen Q.B., 2018, Exploration and research on the regeneration of plant leaf, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 16(20): 6832-6839 (姜福星, 黄远祥, 周鹏, 孙晓兰, 赵捷, 文好雨, 陈其兵, 2018, 植物叶片再生的探究, 分子植物育种, 16(20): 6832-6839)

生了一种扦插繁殖的方法——叶插,但是在自然野生条件下,落地生根、青莢叶、叶籽银杏等极少数植物会自发地以叶缘种苗、叶上开花和叶上胚珠(拟胚珠)等方式进行繁殖再生(姜福星等, 2017)。人们又陆续发现,植物中的不少种类在人工离体条件下,也可以用叶片进行再生和繁殖,为深入研究和开发利用植物提供了一条有效的途径。

以叶片为外植体进行再生,具有来源广泛、取材方便、操作简洁、效率高、对原有植株和环境影响少,能实现可持续发展等特点和优点(黄文江和刘庆忠, 2001),是值得深入研究和开发利用的再生方式。本研究将主要对植物叶片离体再生进行综合评述,为科研和生产提供参考。

1 叶片再生的主要方式与组织细胞学

1.1 叶片再生的主要方式

植物叶片再生的主要方式包括:不定芽、体细胞胚胎(类原球茎)、珠芽和块茎等方式,通过直接再生和经过愈伤组织间接再生两种途径均可实现。不定芽是植物再生的主要方式,如崧蓝(*Isatis indigotica*)可以从叶片切口处直接产生不定芽(彭丽萍等, 2007),也可以经过愈伤组织间接再生,如葡萄柚(*Citrus paradisi*)的离体叶片可以经过愈伤组织间接产生不定芽(陶燕蓝等, 2015),青杞1号枸杞(*Lycium barbarum*)的离体叶片经过愈伤组织间接再生不定芽(安焕霞等, 2015, 江苏农业科学, 43(4): 59-61)和君迁子(*Diospyros lotus*)的离体叶片基部上表面朝下可经过愈伤组织诱导出不定芽(谢启鑫等, 2008);也有的植物直接和间接两种再生途径均可以,如胡杨(*Populus euphratica*)的叶片直接再生和间接再生两种方式均可形成不定芽(丁霞等, 2003)。

体细胞胚胎和类原球茎是叶片再生的另外一种方式,如蝴蝶兰试管苗幼叶经过诱导可从表面和切口边缘诱导出胚状体及类原球茎(崔广荣等, 2007),木本植物和果树的叶片也可诱导出体细胞胚胎,如高灌蓝莓‘蓝丰’品种叶片上诱导出体细胞胚胎(崔广荣等, 2008),以及长俊木瓜(*Chaenomeles lagenaria*)的离体叶片可以间接和直接两种途径诱导出体细胞胚胎(孟强, 2006),且发现苹果创伤处产生的体细胞胚胎与切割方式有关,及存在距离效应(达克东, 2011)。

少数鳞茎球根花卉的叶片可以珠芽和块茎的方式实现再生,三叶半夏(*Pinellia ternata*)的离体叶片可以通过直接和间接两种途径产生小块茎(罗成科等,

2007),白花虎眼万年青(*Ornithogalum thyrsoides*)的离体叶片可以在叶脉上产生多个珠芽实现高效再生(姜福星等, 2017),这就打破了“老球上长小球”的思维定势,对鳞茎球根花卉的繁殖再生而言具有重要的价值和意义,为鳞茎球根花卉的产业化开发和科学研究提供了新的思路和途径。

1.2 叶片再生的组织细胞学

叶片再生多为切口及其附近的薄壁细胞开始分化的,如茶叶片愈伤组织的形成是切口处叶脉周围的薄壁细胞首先开始启动,转入脱分化状态并进行细胞分裂,产生分生细胞团和分生组织结节进而产生的(暨淑仪等, 1995, 茶叶, 21(2): 11-13),而草莓叶片多数是由愈伤组织中维管组织结节外侧的类似形成层细胞形成的,少数是由叶状体上发生芽原基直接形成的(邓馨和胡文玉, 2000),以及崧蓝(*I. indigotica*)可以从叶片切口处直接产生不定芽(彭丽萍等, 2007),再有红富士苹果离体叶片不定芽起源于叶片切口附近的表皮细胞和叶片维管束周围的维管束鞘细胞(田春英, 2009)。

叶片切口处产生的体胚主要由创伤附近的叶片的上表皮细胞及其周围的叶肉细胞受到切割等刺激分化而来,单细胞和多细胞两种起源方式都有,如蝴蝶兰的胚状体(类原球茎)起源于叶片切口处的气孔附近的上表皮细胞或上表皮下方的叶肉组织细胞,为单细胞起源(崔广荣等, 2007),高灌蓝莓‘蓝丰’品种叶片上诱导出体细胞胚胎也是主要起源于叶上表皮细胞及其附近的叶肉细胞,但多为多细胞起源(崔广荣等, 2008)。

仅仅有极其少数的植物叶片的再生是由叶片边缘的维管束或叶片表面的维管束分化产生而来的,首先是从叶片边缘的叶脉(维管束分生组织)分化而来的,如落地生根(*Kalanchoe pinnata*)等景天科伽蓝菜属(*Kalanchoe* spp.)的“叶缘种苗”实质是一种复合组织,是胚胎发生与器官发育的整合体,自发或人工诱导均可从叶片边缘的叶脉上产生(Garcês et al., 2007);更有花、果和芽等器官直接产生于叶脉之上的,形成“叶上开花”“叶上结果”及“叶上长芽”等奇特有趣的景观,青莢叶属植物在野生条件下在叶片表面叶脉的中部开花和结果,而杂种菊(*Helianthus annuus*×*H. tuberosus*) EMB-2 在离体条件下多个体胚和不定芽直接产生于叶片表面的叶脉上(Chiappetta et al., 2006),以及白花虎眼万年青的多个珠芽可直接产生于离体叶片表面的叶脉上(姜福星等, 2017),这说

明叶片边缘的维管束和叶片表面的维管束均具有再生分化从而形成新器官的能力,有待于研究、开发和利用。

2 叶片再生的影响因素

2.1 基因型

一般认为,植物的基因型是决定叶片再生能力的决定因素,同一物种不同品种间的再生能力具有很大差异,说明其基因型上具有显著不同,对不同品种的梨树叶片进行培养时候发现不同基因型之间差异很大,认为基因型对梨树不定芽的再生率起着非常重要的作用(刘翠琼等, 2005);对蓝莓不同品种的叶片再生研究发现,‘北陆’的叶片不定芽繁殖能力最强(毕海涛, 2007)。

2.2 培养基类型、植物激素和蔗糖

经研究发现,多数植物以 MS 培养基为好,如对石榴品种叶片高频再生体系研究中发现,MS 培养基是最适合石榴叶片再生的培养基,也有认为其他培养基更适合的,如 N6 培养基对茺芜大姜叶片愈伤组织的诱导率比 MS 培养基要好(王兴翠, 2011)。

细胞分裂素与生长素的配比决定愈伤组织的质量,而高浓度的细胞分裂素能促进愈伤组织的分化和不定芽的诱导,如,在油桐(*Vernicia fordii*)叶片再生的研究中发现,2,4-D 对愈伤组织的诱导起着关键性的作用,浓度过高会使得愈伤组织质地变密、颜色加深和加速老化,影响后续愈伤组织分化,细胞分裂素 6-BA 能够促进愈伤组织分化不定芽(谭晓风等, 2013)。

高浓度蔗糖更有利于叶片进行诱导愈伤组织和分化,如在对苧麻(*Boehmeria nivea*)叶片进行高效再生体系的建立时候就发现,6%蔗糖比 3%培养能显著提高其繁殖系数(曹雅琴等, 2009),迷迭香(*Rosmarinus officinalis*)叶片愈伤组织的诱导时候也发现较高的蔗糖浓度更有利(董玉梅等, 2012),这可能是因为在高浓度的蔗糖培养基能为叶片及其愈伤组织的分化和再生提供更多的物质与能量(曹雅琴等, 2009)。

2.3 接种方式与不同部位

经研究表明,远轴面接触培养基(叶正面向上)有利于再生,对靛蓝(*I. indigotica* Fort)研究认为,叶片远轴面向下接触培养基有利于不定芽的生长(彭丽萍等, 2007);对苹果叶片的组培研究也发现,远轴面接

触培养基(叶正面向上)比近轴面接触培养基(叶背面向上)要好,可能是因为,一是符合了叶片自然生长的状态,二是叶背面气孔较多,有利于营养的吸收(臧运祥等, 2004)。

叶片不同部位的再生分化能力也有明显差异:磨盘柿(*Diospyros kaki*)离体叶片进行诱导时候发现,叶片基部再生芽数最多,其次为叶中部,叶尖最少(师校欣等, 2004b);对安徽药菊叶片直接再生进行研究也发现近基端的再生能力明显高于叶的顶部,认为这是由于维管束在叶中的分布差异所决定的,并认为维管束周围的薄壁细胞较易吸收培养基中的植物生长调节物质所以更易分化,基部维管束较密集所以更易分化(薛建平等, 2004)。

2.4 物理处理

研究表明,对苹果离体叶片创伤处理可提高其产生体细胞胚胎的效率和产量,而且刺伤的效果比横切和纵切的效果好(达克东等, 2001)。

2.5 暗培养

适当的黑暗培养,既有利于试管生长、分化,又可节省能源,认为黑暗的环境在植物细胞从脱分化向分化转变过程中发挥关键作用,暗处理的时间增加能提高分化率。

师校欣等(2004a)研究表明,1 周暗培养有利于新红星苹果的茎尖分化和不定根诱导,3 周暗培养能将乔纳金、王林苹果的再生率和再生芽数提高及增加 3~6 倍,暗培养试管苗的淀粉、可溶性糖、氨基酸和蛋白质的含量等生理生化指标也明显超过光培养苗,适当的暗培养可促进新接茎尖生长点的分化生长,尤其适用于组培难度较大的树种;对菊花的不定芽再生也发现,10 d 的暗培养对菊花叶片产生不定芽最为有利(Naing et al., 2014)。

2.6 硝酸银

硝酸银的在叶片再生中的作用主要表现为:一、适宜的浓度能够促进叶片再生,浓度过高反而抑制了再生;二、改变叶片细胞分化的方向,从间接再生转变为直接再生不定芽或体胚。

研究表明,适宜浓度的硝酸银能够促进梨树叶片不定芽的分化和再生(刘翠琼等, 2005),而在草莓‘丰香’叶片培养中发现,添加硝酸银能够改变叶片细胞分化的方向,以叶片的直接再生为主,并有少量体胚发生(吴雪梅等, 2004);研究表明硝酸银的加入也能改变树莓品种‘Chilliwack Kotata’的不定芽再生

途径,从间接再生为主到叶片直接再生不定芽为主(赵雪兰,2008)。

3 叶片再生的机制

3.1 叶片再生不定根的机制

叶片收到创伤后,内源生长素浓度升高激活 *WOX11* 和 *WOX12* (Wuschel-related homeobox 11 and Wuschel-related homeobox 12) 转录因子促使维管束中的原形成层细胞和附近的维管薄壁细胞(再生潜能细胞)转变为根创始细胞,在 *WOX5* 和 *LBD16* (Lateral organ boundaries domain 16) 的作用下演化为根尖干细胞团,接着在 *NAM* (No apical meristem) 和 *CUC2* (Cup shaped cotyledon 2) 等基因调控网络的作用下,形成根尖及不定根(孙贝贝等,2016)。

3.2 叶片再生不定芽的机制

3.2.1 叶片切口再生不定芽的机制

植物干细胞的形成是植物器官再生的前提条件,不论是叶片切口直接再生不定芽还是通过愈伤组织间接产生不定芽,均为在较高浓度的细胞分裂素的调控下激活了 *WUSCHEL**STM* (Shoot meristemless)*ESR* (Enhancer of shoot regeneration)*CUC* 等转录因子,产生了茎尖分生组织干细胞团,进而再生不定芽(孙贝贝等,2016)。

3.2.2 叶脉直接产生不定芽的机制

无论在自然还是野生条件下,绝大多数植物的叶片再生不定芽均是在创伤切口处产生的,切口是其主要的分化部位,叶表维管束(叶脉)能分化再生的植物则是非常珍稀罕见的,可能其具有特殊的遗传机制及调控方式。

在自然野生条件下,叶片表面的维管束(叶脉)能够分化和产生不定芽等器官的植物是极其少数的,仅在落地生根的“叶缘种苗”、青莢叶属植物的“叶上开花”和叶籽银杏的“叶上胚珠”上发现,可能只有这三种屈指可数的物种才具有非常罕见的内在的遗传机制,决定植物干细胞活性的同源异形盒转录因子 *KNOX1* 等基因就能特定地激活叶表维管束及赋予其再生的能力,从而导致叶基的近轴面形成异位的分生组织及产生器官(李士美等,2007; Garcês et al., 2007)。

在离体条件下,杂种菊(*Helianthus annuus*×*H. tuberosus*) EMB-2 叶片表面的叶脉上产生了多个体胚和不定芽,被认为与叶片局部积累高浓度的细胞分

裂素所激活的其 *HtKNOT1* (*KNOX* 基因的第一种类型)异位超量表达密切相关(Chiappetta et al., 2006);而且在含有高浓度的细胞分裂素的培养基上 *KNOX1* 基因超量表达能诱导转基因烟草的叶脉上产生不定芽,则进一步证明了较高浓度细胞分裂素的积累、*KNOX1* 基因的表达以及植物叶表叶脉上不定芽的形成存在着内在联系(丁伟乔等,2008;姜福星等,2017)。

珠芽可以被看做是微型的鳞茎或块茎,一般多产生于叶腋间或花序轴的中下部,但白花虎眼万年青的多个珠芽可直接产生于离体叶片表面的叶脉上,运用转录组技术分析了叶片产生离体珠芽的分子机制,表明有 *KNOX1* 基因也参与了该过程(姜福星等,2017)。

3.3 叶片再生体细胞胚胎的机制

植物叶片中具有再生潜能的体细胞多数是在离体条件下受到激素或胁迫的诱导高效地发生脱分化转变成成为胚性干细胞和体细胞胚胎,然而在自然界野生条件下,大叶落地生根(*Kalanchoe daigremontiana*)等落地生根属植物可自发在叶片边缘的维管束细胞就有形成胚性细胞的能力及形成叶缘种苗,经研究证明其为体细胞胚胎与器官的复合组织,茎尖分生组织基因 *STM* 基因(*KNOX* 基因的第一种类型基因家族)和胚胎特有的基因 *LEC* (*Leafy cotyledon*)和 *FUS3* (*Fusca3*)均参与了这一过程(Garcês et al., 2007)。

4 叶片再生的应用与展望

利用植物叶片具有较强的再生能力以及取材方便等特点和优点,可以用来进行繁殖再生、遗传转化受体、诱变育种等(李玉生等,2009),如生姜以根状茎、花药、茎尖和营养芽作为繁殖材料,均不同程度上存在着取材困难、污染率高、繁殖系数低、易传播病害、费用高等问题,而利用其离体叶片进行愈伤组织的诱导、分化和再生则比较有效的解决了上述问题,为生姜的脱毒快繁、诱变育种、细胞工程育种和分子育种提供了新的途径(王兴翠,2011)。

通常是在叶片高效再生体系的基础上建立以叶片为受体的遗传转化体系展开分子植物育种和分子生物学研究的平台,如以非洲紫罗兰(*Saintpaulia ionantha* Wendl)的叶片为受体,将拟南芥 *AtTIP* 基因导入非洲紫罗兰中,提高了其对高浓度硼酸的耐受能力(叶志琴等,2014),以苧麻(*Boehmeria nivea*)叶中脉为外植体建立了高效再生和遗传转化体系(An et al., 2014),以白花虎眼万年青和橙花虎眼万年青的杂交种的离体叶片为遗传转化受体,将抗病基因成功

导入,并认为将离体叶片进行人为磨伤,并用根瘤农杆菌侵染其切口是简洁有效的遗传转化方式(*Ornithogalum thyrsoides*×*O. dubium*) (Van Emmenes et al., 2008);在落地生根属锦蝶(*Kalanchoe*×*Houghtonii*)的叶缘种苗再生体系的基础上建立遗传转化体系,进而研究基因的功能及探讨器官异位发生的机制(Laura et al., 2013);在模式植物烟草和拟南芥叶片再生体系的基础上,研究再生的机制(Zhang et al., 2015)。

叶片也可以作为细胞工程和诱变育种的材料,利用非洲紫罗兰的叶片能够再生的特点和优势,对其进行电子束辐照和X射线辐照诱导突变进行选育新品种(周利斌等, 2006);寒富苹果叶片的离体再生体系,并利用其叶片的极强的不定芽再生能力,叶片再生过程中用秋水仙素处理获得了多倍体植株(欧春青等, 2008)利用秋水仙碱处理梨树的离体叶片也获得了多倍体(孙洪雁等, 2009)。

叶片离体再生体系不但可以进行分子和细胞工程育种,也为植物生理生化、次生代谢等生命科学研究提供了理想的平台,如研究发现,欧洲白桦无茵苗叶片在产生愈伤组织的时候,氨基态氮含量、可溶性蛋白含量和过氧化物酶活性均有所提高,可溶性糖含量先降后升,不定芽形成时,各项生理指标均有所下降(张淑娟等, 2006);而红富士苹果离体叶片培养及不定芽再生过程中,内源激素和抗氧化酶的含量和比例发生了显著变化,NO和內源多胺含量明显提高(田春英, 2009)。

虽然在果树、蔬菜、林木和花卉等植物中,均发现和利用了一定种类的植物叶片进行再生,但是能够叶片进行再生的植物种类所占的比例还是比较少,且多数是通过愈伤组织间接再生,再生和遗传转化效率比较低,无论是叶片切口创伤处和叶脉维管束,这两个重点的分化部位,还是经愈伤组织间接再生和直接再生,这两种主要的再生途径,均有待于深入探析其分子机制,并从分子水平赋予并提高其再生能力(张超等, 2015),进而扩大叶片再生在生产实践和科学研究的应用范围,提高效益和效率,从而为优良种苗的工厂化生产、分子植物育种和转基因植物的产业化开发建立简洁、高效的平台及开辟更加广阔的前景。

作者贡献

陈其兵和姜福星是本研究的实验设计者和实验研究的执行人,姜福星进行文献资料的整理分析,论文初稿的写作,黄远祥、周鹏、孙晓兰、赵婕和文好雨

参与文献收集整理与分析;陈其兵是项目的构思者及负责人,指导论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由四川省教育厅重点项目(15ZA0023)项目和立体绿化品种选育项目(640H1000)共同资助。

参考文献

- An X., Wang B., Liu L.J., Jiang H., Chen J., Ye S.T., Chen L.Y., Guo P.G., Huang X., and Peng D.X., 2014, *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and regeneration of transgenic plants using leaf midribs as explants in ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud), Mol. Biol. Rep., 41(5): 3257-3269
- Bi H.T., 2007, Studies on regeneration *in vitro* and *BADH* gene transformation of blueberry, Thesis for M.S., Jilin Agriculture University, Supervisors: Zhang Z.D., and Wang Z.W., pp.1-30 (毕海涛, 2007, 越橘叶片离体再生与 *BADH* 基因遗传转化的研究, 硕士学位论文, 吉林农业大学, 导师: 张志东, 王忠伟, pp.1-30)
- Cao Y.Q., Liu F., Chen J.R., and Guo Q.Q., 2009, High frequency plant regeneration system from leaf explant of ramie, Hunan Nongye Daxue Xuebao (Journal of Huan Agricultural University (Natural Sciences)), 35(2): 116-122 (曹雅琴, 刘峰, 陈建荣, 郭清泉, 2009, 苎麻叶片高效再生体系的建立, 湖南农业大学学报(自然科学版), 35(2): 116-122)
- Chiappetta A., Michelotti V., Fambrini M., Bruno L., Salvini M., Petrarulo M., Azmi A., Onckelen H.V., Pugliesi C., and Bitonti M.B., 2006, Zeatin accumulation and misexpression of a class I *knox* gene are intimately linked in the epiphyllus response of the interspecific hybrid EMB-2 *Helianthus annuus*×*H. tuberosus*, Planta, 223(5): 917-931
- Cui G.R., Hou X.L., Zhang Z.X., Zhang C.Y., Hu N.B., and Liu Y.C., 2007, Efficient somatic embryogenesis from explants of *Phalaenopsis in vitro* culture and histological observations, Yuanyu Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 34(2): 431-436 (崔广荣, 侯喜林, 张子学, 张从宇, 胡能兵, 刘跃成, 2007, 蝴蝶兰叶片离体培养胚状体的发生及组织学观察, 园艺学报, 34(2): 431-436)
- Cui G.R., Lu F., Cao H.L., Liu M.C., Ding W.Q., and Zhang Z.X., 2008, High efficient somatic embryogenesis on leaf explants of blueberry *in vitro* culture and histological observations, Jiguang Shengwu Xuebao (Acta Laser Biology Sinica), 17(5): 599-607 (崔广荣, 陆峰, 曹华龙, 刘森才, 丁为群, 张子学, 2008, 蓝莓离体叶片胚状体高效发生及其组织学观察, 激光生物学报, 17(5): 599-607)
- Da K.D., Zhang S., Mi R.F., Zhou Z.W., Wei Q.P., and Shu H.R.,

- 2001, Wounding induced efficient direct somatic embryogenesis in apple leaves, *Henongxue Bao (Acta Agriculturae Nucleatae Sinica)*, 15(5): 290-293 (达克东, 张松, 米瑞芙, 周志文, 魏钦平, 束怀瑞, 2001, 创伤诱导苹果离体叶片高效直接体细胞胚胎发生, *核农学报*, 15(5): 290-293)
- Deng X., and Hu W.Y., 2000, Establishment of regeneration and genetic transformation system of strawberry leaf, *Zhiwuxue Tongbao (Chinese Bulletin of Botany)*, 17(2): 174-178 (邓馨, 胡文玉, 2000, 草莓叶片再生芽及遗传转化系统的建立, *植物学通报*, 17(2): 174-178)
- Ding W.Q., Xu Q.L., Pu F., Gao Q.X., and Wang C.Y., 2008, Ectopic expression of *Pttn1* gene on morphological alteration of tobacco leaves, *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica)*, 28(3): 440-446 (丁伟乔, 徐全乐, 蒲帆, 高清祥, 王崇英, 2008, *Pttn1* 基因异位表达对烟草叶片形态的影响, *西北植物学报*, 28(3): 440-446)
- Ding X., Chen X.Y., Li Y., and Li W., 2003, Bud regeneration system from leaves of *Populus euphratica*, *Beijing Linye Daxue Xuebao (Journal of Beijing Forestry University)*, 25(2): 28-31 (丁霞, 陈晓阳, 李云, 李伟, 2003, 胡杨叶片不定芽再生体系的研究, *北京林业大学学报*, 25(2): 28-31)
- Dong Y.M., Li Z.N., Qian C., Liu B.G., Duan R.L., and Liu Y.T., 2012, Callus induction and plant regeneration from rosemary leaves, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 10(2): 189-194 (董玉梅, 李正楠, 钱成, 刘宝刚, 段如兰, 刘雅婷, 2012, 迷迭香叶片愈伤组织诱导及再分化培养, *分子植物育种*, 10(2): 189-194)
- Garc s H.M.P., Champagne C.E.M., Townsley B.T., Park S., Malh  R., Pedroso M.C., Harada J.J., and Sinha N.R., 2007, Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(39): 15578-15583
- Huang W.J., and Liu Q.Z., 2001, Advance of plant regeneration from perennial fruit crop's *in vitro* leaf, In: *Chinese Society for Horticultural Science (ed.), Plant tissue culture and virus-free rapid propagation-Proceedings of the Symposium on plant tissue culture, virus free propagation and industrial production technology*, Chinese Society for Horticultural Science, Beijing, China, pp.88-94 (黄文江, 刘庆忠, 2001, 果树作物叶片再生的研究进展, 见: 中国园艺学会(编著), 植物组织培养与脱毒快繁技术—全国植物组培、脱毒快繁及工厂化生产技术学术研讨会论文集, 中国园艺学会, 中国, 北京, pp.88-94)
- Jiang F.X., Wei P.W., Wu S., Jiang X.Y., Shi J.T., and Chen Q.B., 2017, Transcriptome analysis insights into bulblet on leaf surface in *Ornithogalum thyrsoides*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 15(2): 519-531 (姜福星, 魏丕伟, 吴生, 江欣燕, 施敬恬, 陈其兵, 2017, 白花虎眼万年青叶上珠芽的转录组分析, *分子植物育种*, 15(2): 519-531)
- Laura M., Borghi C., Regis C., Casseti A., and Allavena A., 2013, Ectopic expression of *Kxhkn5* in the viviparous species *Kalanchoe xHoughtonii* induces a novel pattern of epiphyll development, *Transgenic Res.*, 22(1): 59-74
- Li S.M., Li B.J., Xing S.Y., and Wang F., 2007, Morphological development of ovule-like organ on the leaf and variation characteristics of *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* Mak. (Ohat-suki), *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 34(1): 1-6 (李士美, 李保进, 邢世岩, 王芳, 2007, 叶籽银杏拟胚珠的形态发育及变异特性, *园艺学报*, 34(1): 1-6)
- Li Y.S., Wu Y.J., Zhao Y.H., Wu Y.Q., and Cheng H.H., 2009, Study on the embryogenic cells induction and plant regeneration of apple, *Hebei Nongye Kexue (Journal of Hebei Agricultural Sciences)*, 13(10): 64-66 (李玉生, 吴永杰, 赵艳华, 吴雅琴, 程和禾, 2009, 苹果胚性细胞的诱导及植株再生研究, *河北农业科学*, 13(10): 64-66)
- Liu C.Q., Tang H.R., and Luo Y., 2005, Leaf culture and plantlet regeneration of pears with different genotypes, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 32(6): 1080-1083 (刘翠琼, 汤浩茹, 罗娅, 2005, 不同基因型梨叶片离体培养和植株再生, *园艺学报*, 32(6): 1080-1083)
- Luo C.K., Peng Z.S., and Cai P., 2007, *In vitro* regeneration of *Pinellia ternate* from leaf explants, *Guangxi Zhiwu (Guihaia)*, 27(2): 260-264 (罗成科, 彭正松, 蔡鹏, 2007, 三叶半夏叶片一步成苗离体培养技术, *广西植物*, 27(2): 260-264)
- Meng Q., 2006, Research on the rooting shoot of test-tube seedling and somatic embryogenesis from leaf balde of long handsome Chinese flowering quince, Thesis for M.S., Northwest Agriculture and Forestry University, Supervisor: Dong L.F., pp.1-55 (孟强, 2006, 长俊木瓜无菌苗生根及叶片体细胞胚胎发生的研究, 硕士学位论文, 西北农林科技大学, 导师: 董丽芬, pp.1-55)
- Naing A.H., Jeon S.M., Han J.S., Lim S.H., Lim K.B., and Kim C.K., 2014, Factor influencing *in vitro* shoot regeneration from leaf segments of *Chrysanthemum*, *Comptes Rendus Biologies*, 337(6): 383-390
- Ou C.Q., Li L.G., He P., and Zhang Z.H., 2008, *In vitro* adventitious shoot regeneration and induction of tetraploid from leaves of Hanfu apple, *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science)*, 25(3): 293-297 (欧春青, 李林光, 何平, 张志宏, 2008, 寒富苹果叶片离体再生及四倍体诱导, *果树学报*, 25(3): 293-297)
- Peng L.P., Zhang Y.B., and Wang L.R., 2007, Plant high efficient regeneration system from leaf in *Isatis indigotica* Fort, *Anhui Keji Xueyuan Xuebao (Journal of Anhui Science and Technology University)*, 21(4): 14-17 (彭丽萍, 张远兵, 汪露润, 2007, 靛蓝离体叶片高频再生体系的建立, *安徽科技学院学报*, 21(4): 14-17)
- Shi X.X., Du G.Q., Gao Y., Wang Y.L., and Li X.Q., 2004a, The effect of darkness culture on micropropagation and adventi-

- tious bud generation from leaf in apple, Hebei Nongye Daxue Xuebao (Journal of Hebei Agricultural University), 27(4): 18-21 (师校欣, 杜国强, 高仪, 王彦立, 李秀巧, 2004a, 黑暗培养对苹果组培快繁及叶片再生的影响, 河北农业大学学报, 27(4): 18-21)
- Shi X.X., Du G.Q., Ma J.L., Gao Y., and Wang L., 2004b, Callus formation and adventitious bud regeneration from leaves *in vitro* Persimmon (*Diospyros kaki*), Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science), 21(4): 376-378 (师校欣, 杜国强, 马俊莲, 高仪, 王蕾, 2004b, 磨盘柿离体叶片愈伤组织发生及不定芽诱导, 果树学报, 21(4): 376-378)
- Sun B.B., Liu J., Ge Y.C., Sheng L.H., Chen L.Q., Hu X.M., Yang Z.N., Huang H., and Xu L., 2016, Recent progress on plant regeneration, Kexue Tongbao (Chinese Science Bulletin), 61(36): 3887-3902 (孙贝贝, 刘杰, 葛亚超, 盛李宏, 陈吕琴, 胡小梅, 杨仲南, 黄海, 徐麟, 2016, 植物再生的研究进展, 科学通报, 61(36): 3887-3902)
- Sun H.Y., Sun Q.R., and Xin L., 2009, *In vitro* cochicine-induced polyploidy plantlets from leaf explants of pear (*Pyrus communis* L.), Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica), 29(9): 1785-1790 (孙洪雁, 孙清荣, 辛力, 2009, 秋水仙碱诱导梨离体叶片再生多倍体, 西北植物学报, 29(9): 1785-1790)
- Sun P., 2013, Morphological observation and preliminary study of several gene of *Heblingia* Willd., Thesis for M.S., Huazhong Agricultural University, Supervisor: Ning G.G., pp.1-43 (孙聘, 2013, 青英叶的形态学观察及其几个基因的初步研究, 华中农业大学硕士论文, 导师: 宁国贵, pp.1-43)
- Tan X.F., Li Z., Zhang L., Long H.X., Yuan J., Zeng Y.L., and Lin Q., 2013, Callus induction from leaves and plant regeneration of Tung tree (*Vernicia fordii* Hemsley), Zhiwu Shengli Xuebao (Plant Physiology Journal), 49(11): 1245-1249 (谭晓风, 李泽, 张琳, 龙洪旭, 袁军, 曾艳玲, 林青, 2013, 油桐叶片愈伤组织诱导及植株再生, 植物生理学报, 49(11): 1245-1249)
- Tao Y.L., Lan Z.Q., and Wu T., 2015, Research of leaf *in vitro* regeneration system in *Citrus paradise*, Redai Zhiwu Xuebao (China Journal of Tropical Crops), 36(3): 487-492 (陶燕蓝, 蓝增全, 吴田, 2015, 基于葡萄柚叶片离体再生体系的研究, 热带作物学报, 36(3): 487-492)
- Tian C.Y., 2009, Studies on regeneration mechanism of adventitious buds from leaves *in vitro* of Red Fuji apple, Thesis for M.S., Hebei Agriculture University, Supervisors: Xu J.Z., and Shao J.Z., pp.1-60 (田春英, 2009, 红富士苹果离体叶片不定芽再生机理研究, 硕士学位论文, 河北农业大学, 导师: 徐继忠, 邵建柱, pp.1-60)
- Van Emmeren L., Veale A., Cohen A., and Arazi T., 2008, *Agrobacterium*-mediated transformation of the bulbous flower, Acta Hort., 27(6): 67-74
- Wang X.C., 2011, Studies on plant regeneration from leaf and polyploidy induction of *in vitro* ginger (*Zingiber officinale* Rosc.), Dissertation for Ph.D., Shandong Agriculture University, Supervisor: Xu K., pp.1-45 (王兴翠, 2011, 生姜离体叶片植株再生体系及多倍体诱导技术研究, 博士学位论文, 山东农业大学, 导师: 徐坤, pp.1-45)
- Wu X.M., Tang H.R., Wen G.Q., and Li Y., 2004, Effects of different culture conditions on regeneration from leaves of strawberry (*Fragaria xananassa*) 'Toyonoka', Yuanyi Xuebao (Acta Horticulture Sinica), 31(5): 657-659 (吴雪梅, 汤浩茹, 文国琴, 李燕, 2004, 不同培养条件对'丰香'草莓离体叶片再生的影响, 园艺学报, 31(5): 657-659)
- Xie Q.X., Huang M.L., Wu X.P., and Zhuang D.H., 2008, Plant regeneration from leaves of date plum (*Diospyros lotus* L.), Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica), 41(2): 607-612 (谢启鑫, 黄美莲, 吴晓萍, 庄东红, 2008, 君迁子叶片培养再生植株的研究, 中国农业科学, 41(2): 607-612)
- Xue J.P., Zhang A.M., and Chang W., 2004, Studies on the technology of directly inducing regenerated plantlet from leaf of *Chrysanthemum morifolium*, Zhongguo Zhongyao Zazhi (China Journal of Chinese Materia Medica), 29(2): 132-135 (薛建平, 张爱民, 常玮, 2004, 安徽菊药叶片直接再生植株技术的研究, 中国中药杂志, 29(2): 132-135)
- Yan S., Yan C.J., and Gu M.H., 2008, Molecular mechanism of leaf development, Yichuan (Heredity), 30(9): 1127-1135 (严松, 严长杰, 顾铭洪, 2008, 植物叶发育的分子机理, 遗传, 30(9): 1127-1135)
- Ye Z.Q., Li J.H., and Wang G.D., 2014, *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *AtTIP5;1* gene into *Saintpaulia ionantha*, Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica), 34(12): 2412-2417 (叶志琴, 李佳慧, 王广东, 2014, 拟南芥 *AtTIP5;1* 基因转化非洲紫罗兰的研究, 西北植物学报, 34(12): 2412-2417)
- Zang Y.X., Zheng W.W., Sun Z.X., and Da K.D., 2004, Recent advance of leaf regeneration system in apple, Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin), (2): 15-18 (臧运祥, 郑伟尉, 孙仲序, 达克东, 2004, 苹果叶片组培再生系统研究进展, 生物技术通报, (2): 15-18)
- Zhang C., Wang M., Li S.N., Ma Y.L., Wang L.S., Jin Y.M., Wang Z., Li W.B., Su A.Y., and Wu X.X., 2015, Research progress on regeneration gene of *ESR1* in plant, Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 35(10): 2270-2276 (张超, 王敏, 李思楠, 马彦龙, 王玲爽, 金杨媚, 王智, 李文滨, 苏安玉, 武小霞, 2015, 植物再生基因 *ESR1* 研究进展, 基因组学与应用生物学, 35(10): 2270-2276)
- Zhang S.J., Wang J.M., Zhang S.H., and Yang M.S., 2006, Study

- on several physiological indices in the organogenesis of curly birch (*Betula pendula* × *B. pendula* var. *carelica* Sok), Hebei Nongye Daxue Xuebao (Hebei Journal of Forestry and Orchard Research), 21(3): 229-232 (张淑娟, 王进茂, 张世红, 杨敏生, 2006, 欧洲白桦叶片器官发生过程中生理指标的变化, 河北林果研究, 21(3): 229-232)
- Zhang T.Q., Lian H., Tang H.B., Dolezal K., Zhou C.M., Yu S., Chen J.H., Chen Q., Liu H.T., Ljung K., and Wang J.W., 2015, An intrinsic microRNA timer regulates progressive decline in shoot regenerative capacity in plants, *Plant Cell*, 27(2): 349-360
- Zhao X.L., 2008, Establishment of rapid propagation system *in vitro* and induction of adventitious buds in Raspberry, Thesis for M.S., Sichuan Agriculture University, Supervisor: Tang H.R., pp.1-39 (赵雪兰, 2008, 树莓离体快繁体系建立及叶片不定芽诱导研究, 硕士学位论文, 四川农业大学, 导师: 汤浩茹, pp.1-39)
- Zhou L.B., Li W.J., Ma S., Dong X.C., Li Q., and Gao Q.X., 2006, Effects of X-ray and electron beam irradiation on adventitious bud regeneration from *in vitro* leaf explants of *Saintpaulia ionantha*, *Fushe Yanjiu Yu Fushe Gongyi Xuebao* (Journal of Radiation Research and Radiation Processing), 24(1): 53-58 (周利斌, 李文建, 马爽, 董喜存, 李强, 高祥, 2006, X 射线及电子束照射对非洲紫罗兰叶片外植体不定芽再生的影响, 辐射研究与辐射工艺学报, 24(1): 53-58)

Journal of Mosquito Research (JMR)



Journal of Mosquito Research (ISSN 1927-646X) is an open access, peer reviewed journal published online by BioPublisher. The journal is publishing high quality original research on all aspects of mosquito and its affecting the living organisms, as well as environmental risk and public policy relevant to mosquito modified organisms. Topics include (but are not limited to) the research at molecular or protein level of mosquito, impact on the ecosystem, containing positive and negative information, natural history of mosquito, also publishing innovative research findings in the basic and applied fields of mosquito and novel techniques for improvement, as well as the significant evaluation of its related application field. Authors from low-income countries and areas or having financial difficulties can apply the discount for article processing charges (APC) upon

submission, and if the authors are qualified to be waived they don't necessarily pay the APC. We do not want fees to prevent the publication of worthy work.

Email: edit@jmr.biopublisher.ca

Web: <http://jmr.biopublisher.ca>