

木本植物组织培养不定芽诱导研究进展

曹 昆^{1,2}, 李 霞^{1*}

(1. 江苏省农业科学院粮食作物研究所, 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学生命科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 从外植体、基本培养基、外源激素以及其他不同理化因子对木本植物诱导不定芽的影响等方面, 综述了木本植物不同外植体直接诱导不定芽以及间接诱导不定芽离体培养的研究进展, 并提出了对研究趋势的设想。

关键词: 不定芽; 外植体; 愈伤组织; 丛生芽; 褐化; 木本植物

中图分类号: S601; Q943.1 **文献标识码:** A

Progress on induction of adventitious bud in tissue culture of woody plants

CAO Kun^{1,2}, LI Xia^{1*}

(1 Institute of Foods Crop, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2 College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to explore and improve an efficient method for the breeding of woody plants (renewable natural resources), effects of explants, basic medium, exogenous hormones, other different physiochemical factors on both the induction of adventitious bud by direct and indirect way in woody plants were reviewed in this paper. Some prospects of studies related were also discussed. We provided the basis information for the improvement breeding efficiency of woody plants by biotechnology.

Key words: Adventitious bud; Explants; Callus; Multiple shoot; Browning; Woodyplant

木本植物在国民经济和生产发展中起着重要作用。其环境价值包括涵养水源、保育土壤、固碳制氧转化太阳能、净化环境、防护林的环境、景观游憩以及生物多样性等是林木产出价值的13.3倍^[1]。特别是近年来, 能源的短缺和高价位, 吸引了更多的科学家寻找可再生能源。木本植物这一可再生能源的重要原料, 将展示出新的利用前景^[2]。但是由于木本植物通常自然的繁育周期长, 而且自然生长的植株繁育率低, 因此, 在一定程度上限制了更多优良树木的选育和利用。

通过不定芽培养是一种快速的树木组织培养方法, 不仅可以保持优良品种的特性, 而且可以极大地缩短木本植物生长周期, 因此越来越受到林业科学家的重视。

在植物组织培养过程中, 植物诱导不定芽的途径通常有2种: 直接诱导途径, 即从外植体的细胞形成器官原基, 然后发育成器官; 通过愈伤组织诱导途径, 即先从外植体上形成愈伤组织, 再在愈伤组织上产生不同的器官原基。虽然目前木本植物通过不定芽诱导的成功报道很多, 但是可以开发为可再生能源的野生树种如乌桕、小桐子和秤锤树等, 获得成功的并不多, 特别是在已有木本植物组织培养成功诱导不定芽的体系中, 通过外植体直接诱导出不定芽的报道并不多, 因此, 笔者试图对近年来木本植物组织培养不定芽诱导的有益探索进行总结, 下面分别从外植体、培养基组分、外源激素以及其他外源理化因子等方面进行有关论述, 试图寻找木本植物组织培养中不定芽诱导的共同点, 期望对提高木本植物

收稿日期: 2008-06-05; 修回日期: 2008-08-10

基金项目: 江苏省农业科学院基金项目(6110704)、(6510707), 江苏省农业科技创新基金(CX[07]603)和江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室开放课题(HZHL0802)的研究内容之一

作者简介: 曹 昆(1982-), 男, 吉林延边人, 硕士研究生, 主要从事树木组织培养研究。

* 通讯作者: 李 霞(1970-), 女, 广西桂平人, 副研究员, 主要研究植物生物技术育种。E-mail: jsplpx@jaas.ac.cn。

育种效率的生物技术育种研究提供参考。

1 外植体的选择

外植体的选择是离体培养的首要步骤之一。可供选择的外植体很多,木本植物的器官:根、茎、叶等都可以选作外植体,但笔者认为叶片更适合作为外植体来诱导木本植物的不定芽。这是因为叶片来源广泛,可再生能力强,取材时不会对母株造成伤害,所以对于一些濒危树种尤为适用;下面主要从以叶片为外植体的不定芽诱导研究进行分述。

1.1 叶片大小

一般选择外植体大小在 1 cm 左右。太大易污染;过小不容易被激素启动或启动后仅仅产生无效愈伤组织,而且叶片还非常容易褐化死亡。从笔者的经验来看在能减少污染的前提下,最好是增大叶片的面积,大叶片可能更有利于不定芽再生。另外叶片刻伤方式对不定芽的诱导影响也很显著,笔者在秤锤树组织培养初步研究中发现沿中脉横切效果要优于去除叶边缘的圆盘法,因为不定芽大多发生于叶脉和叶基部。这与贾小明^[3]等在河北杨和新疆杨离体叶片诱导不定芽的研究结果类似。

1.2 叶片的年龄和着生部位

外植体的幼化程度直接影响着组织培养的结果,而材料的幼化程度和植物的年龄和着生部位关系密切。一般来源幼年植物的外植体要比来源成年树的外植体容易培养。笔者在对秤锤树的再生体系研究中发现用幼嫩的倒 2 叶作为外植体和以倒 3,4 叶的叶片为外植体,添加相同的激素时,幼嫩的倒 2 叶很容易脱分化,而倒 3,4 叶的叶片很难脱分化,对外源激素的添加几乎没有反应。李慧等^[4]在银白杨叶片不定芽再生影响因素的研究中,将试管苗从顶部到基部自上而下划分为 3 部分:第 1~3 片叶记为 A,第 4~6 片叶记为 B,第 7~10 片叶记为 C。选取无根苗不同位置的叶片,接种至培养基(MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 蔗糖 2.5% + 琼脂 0.55%, pH 5.8),A 叶片开始诱导出不定芽时间早,再生率最高,达 95%,再生系数达 20 个/片;B 叶片次之;而 C 叶片最少。可见,取材位置对叶片不定芽再生的影响是非常明显的。

2 基本培养基的选择

MS、N6 和 M8 是植物组织培养常用的基本培养基,但木本植物不定芽诱导培养基报道的较多是 MS

培养基和中盐低氮的 WPM 培养基。基本培养基对植株再生体系的建立影响较大,如马同富等在杨树叶片高效离体再生系统的研究中以 MS 为基本培养基,附加 6-BA 1.0 mg/L 与 NAA 0.05 mg/L 搭配有利于不定芽的形成,而且培养基中添加 0.1~0.2 mg/L 赤霉素(GA₃)还可以提高其不定芽的发生频率,到达 92%^[5]。而何晓兰等在悬铃木叶片不定芽再生的研究中分别比较了 WPM 和 MS 基本培养基,结果表明在 WPM 基础培养基上培养的无菌苗叶色翠绿,健壮。而在 MS 基础培养基上培养的无菌苗叶色淡黄,瘦弱^[6]。这与 Cielo Castillo 在醉鱼草不定芽诱导的研究结果相一致^[7]。笔者分析可能是由于 MS 培养基中的高盐和高铵不利于植株不定芽的诱导。也有使用 GD(Gresshoff & Doy)为基本培养基的(具体配方见参考文献[8]),这种培养基较 MS 和 WPM 培养基相比,其特点是各种营养成分明显偏少,如赖明航等^[8]在马尾松愈伤组织诱导条件的研究中以幼茎为外植体在含 GD + 6-BA 4.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 0.3%~0.4% 活性碳(AC) + 500 mg/L 水解酪蛋白的培养基上,愈伤组织诱导率可达到 93%。

3 外源激素的影响

影响木本植物不定芽诱导的因素包括基因型、外源激素、渗透压、外植体来源、固化剂、培养基营养成分以及温度、光周期和继代时间等多个方面,其中外源激素的种类、质量浓度和配比是最主要的因素之一^[9]。因植物体细胞转化为胚性细胞的一个重要前提是这些细胞必须脱离整体的束缚而进行离体培养,并有相应的激素来诱导其细胞分化。但在离体条件下,细胞开始时往往缺乏合成生长素和细胞分裂素的能力,因此需要在培养基中添加不同种类或不同质量浓度的外源激素以实现胚胎的诱导。完成胚胎的诱导以及随后的不定芽再生所遵循的途径有 2 条:直接途径和间接途径,前者常发生在不定芽形成的早期阶段,而后者多发生于生长后期,发生方式可以从不定芽基部是否有愈伤来判断,不同的诱导方式所需的激素种类也不同。

3.1 直接诱导不定芽

直接诱导不定芽途径是一条不经过愈伤组织脱分化而直接诱导出不定芽的途径,其优点是再生的植株不会产生变异,能够保持亲本的优良性状。在离体细胞直接分化为不定芽的途径中,植物生长调

节剂起着明显的调节作用,其中的细胞分裂素和生长素的比值直接影响着根和芽的分化,在一定范围内,当细胞分裂素与生长素质量浓度的比值高时,有利于芽器官的建成,当两者比值低时,有利于生根。在银白杨叶片不定芽再生的研究中表明^[4]:银白杨叶片不定芽诱导的最适培养基是 MS 附加 6-苄基腺嘌呤(6-BA)和萘乙酸(NAA)(5:1)(即 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 蔗糖 2.5% + 琼脂 0.55%, pH 5.8),不定芽再生率 95% 以上;当 6-BA/NAA < 5 时,叶片不定芽再生率和再生系数均降低,当 5 mg/L ≤ 6-BA/NAA ≤ 30 mg/L 时,随着比值的增大,不定芽再生率明显下降;但李玉铃等在澳洲青萍离体叶片不定芽再生体系的研究中,以 6-BA 和 NAA 为激素组合,最大的芽再生率为 91.7% (MS + 6-BA 4.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L),最小仅为 5% (MS + 6-BA 10.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L)^[10] 尽管所用细胞分裂素同生长素质量浓度比值相同,但不定芽再生率却差异显著,可见在一定范围内,叶片不定芽再生率的高低不仅与植物生长调节剂的种类组合及比值有关,还与两者各自的绝对质量浓度有关。

在植物形态发生过程中,细胞分裂素能促进分化和芽的形成,抑制根发育及衰老,因此找到一种强有力的细胞分裂素对于木本植物直接诱导不定芽来说显得尤为重要,噻苯隆(TDZ)是一种有效的新型细胞分裂素的类似物,其效果较 6-BA 至少高一个数量级^[11],使用质量浓度通常在 0.002 ~ 0.2 mg/L 范围内,低质量浓度时有利于诱导不定芽的增殖。如对河北杨和新疆杨离体叶片诱导不定芽的研究结果表明^[6],适合河北杨和新疆杨离体叶片不定芽诱导的最适培养基为:1/2MS + 6-BA 0.25 mg/L + TDZ 0.01 mg/L + IAA 0.25 mg/L。在此培养基中,叶片分化率河北杨可达 70%,新疆杨可达 52%;平均分化芽数河北杨为 6.84 个,新疆杨为 5.32 个。单独添加 6-BA 则不能诱导出不定芽的产生,似乎 TDZ 对于上述不定芽诱导和再生体系的建立是必要的。但有研究表明高质量浓度的 TDZ 阻碍芽的伸长,促进愈伤的形成^[12]。尽管在直接诱导不定芽的研究中,总是以细胞分裂素为主,而生长素的生理作用则表现出对抗细胞分裂素的效果,但在对灌木醉鱼草类的研究中发现单独添加 6-BA 9 mg/L,诱导率可达 53.3%,但添加生长素类 IBA 1 mg/L 可显著增加芽的诱导数量,诱导率达 100%^[7]。这说明在

不定芽的诱导过程中,尽管生长素类不一定是必须的,高质量浓度的生长素还会抑制芽的发生或诱导出愈伤组织,但当细胞分裂素同低质量浓度的生长素配合使用时会显著诱导芽的发生。除了植物生长调节剂在直接诱导不定芽中起着显著作用外,在诸如梨和苹果等木本植物直接诱导不定芽的研究中,研究者还尝试加入 AgNO₃, AgNO₃ 作为乙烯合成的抑制剂,能够抑制愈伤组织的形成,从而促进不定芽直接从离体器官再生。如陈喜文等发现,0.17 mg/L 的 AgNO₃ 可以显著降低嘎拉苹果叶片再生培养容器中的乙烯浓度,降低乙烯对不定芽分化的抑制作用,从而促进不定芽的形成^[13]。

3.2 通过愈伤诱导不定芽的间接途径

通过愈伤诱导不定芽的间接途径是先从外植体诱导出愈伤组织,再在愈伤组织上分化出不同的器官原基。在组织培养中最常见的分化器官是根和芽。大量的研究表明,几乎所有高等植物的各种器官(如根、茎、叶和花等)以及各种组织(如皮层、茎髓和形成层等)离体后在适合条件下都能产生愈伤组织。愈伤组织诱导的成败关键主要不是外植体的来源和种类,而是培养条件,其中植物生长调节剂的种类和质量浓度最为重要。用于诱导愈伤组织的植物生长调节剂可分为 2 大类,即生长素类和细胞分裂素类,其中生长素类有 2,4-D、NAA、吲哚乙酸(IAA)等,细胞分裂素类有 6-BA、KT、TDZ 等。在众多生长素类中,以 2,4-D 诱导愈伤组织最为有效,随着添加质量浓度的不同,所得到的愈伤组织类型也有所不同。根据 Arm strong 标准可将所得到的愈伤组织分为 3 种类型:Ⅰ型,结构致密、复杂多样、生长缓慢,通过器官发生途径分化芽和根,产生胚状体较少,不易长期继代;Ⅱ型,结构松散、易碎、呈颗粒状、生长较快,长期继代仍有胚性,能通过胚状体途径再生,2,4-D 质量浓度为 5 mg/L 时,形成的愈伤组织多为该类型;Ⅲ型,结构粘软、水浸状、白色透明或半透明,容易继代培养,但几乎丧失分化能力,为非胚性愈伤组织,2,4-D 质量浓度为 8 ~ 10 mg/L 时形成的愈伤组织多为此类^[14]。尽管较高质量浓度的 2,4-D 有利于胚性愈伤组织的诱导,但一方面高质量浓度的 2,4-D 使整个培养系统的生长调节物质比例始终处于高比例的生长素类似物状态,从而不利于随后进行的愈伤组织分化再生芽的过程,另一方面研究者认为 2,4-D 对外植体及愈伤组织的伤害作用较大,故诱导时所采用的质量浓度不宜过大,

以减少组织培养中的无性系变异。而其他生长素类 NAA 和 IAA 对植物细胞的毒害作用较轻,产生的愈伤组织较易分化,使用范围为 0.001 ~ 10 mg/L,但 IAA 诱导愈伤组织的效果比 NAA 稍差。所以愈伤组织诱导阶段,在添加外源生长素类时应优先考虑采用 NAA、IAA,如两者都不能完成愈伤组织诱导时,再考虑采用 2,4-D 诱导。在诱导愈伤组织时,一般还需要添加一定量的细胞分裂素,这样可以使得到的愈伤组织更具有胚性。添加的细胞分裂素类,通常会选择 KT 和 6-BA,两者的作用各有特点,6-BA 能促进细胞分裂,有利于愈伤组织的形态建成;KT 对愈伤组织诱导率的影响不大,但在诱导培养基中添加 KT 可以改善愈伤组织的质量,在一定程度上能延缓愈伤组织的衰老,延缓其器官分化能力的丧失,从而提高植株再生频率^[15]。如在小叶杨×黑杨杂种后代的花药愈伤组织分化比较试验中发现,使用 6-BA 分化芽多、芽密、成丛状,但苗细高、瘦弱、木质化差;而添加 KT 分化出的芽稀且少,往往长成独株苗,粗壮木质化程度高^[16]。尽管大多数情况下需要将 6-BA 或 KT 与生长素结合使用才能完成形态建成,但有时单独添加细胞分裂素也可以实现愈伤组织的诱导,如外源 TDZ 能诱导黄芩外植体幼茎、子叶柄和下胚轴产生愈伤组织,并且随着培养基中 TDZ 质量浓度的增加,愈伤组织诱导率不断增加^[17-18]。通过添加 6-BA 和 TDZ,也可以完成对槟榔的愈伤组织诱导^[19]。一般而言,高质量浓度的生长素和低质量浓度的细胞分裂素有利于愈伤组织的诱导和增殖,通过诱导出的愈伤组织的生长速度和类型来判断所施加的植物生长调节剂是否合理,从而作出相应的调整,以得到具有分化潜力的胚性愈伤组织。

3.3 内源激素对不定芽诱导的影响

在植物组织培养中,研究者大多关注外源激素的调节,对内源激素的作用很少涉及。实际上,植物组织培养的愈伤组织分化过程是内源生长素含量逐步降低、细胞分裂素含量逐步升高的过程。有关木本植物愈伤组织培养中内源激素培养的研究很少,但从草本植物可以得到一些信息。如 NAA 和 6-BA 可以诱导水稻花药、幼胚和花穗来源的愈伤组织完成芽的形态分化,其愈伤出苗率与内源生长素存在负效应,而与内源细胞分裂素存在正效应^[19]。烟草中已分化出芽愈伤组织的内源生长素含量明显低于未形成芽的愈伤组织^[20]。有研究表明,愈伤

组织开始分化之前却需要较高的生长素含量。如小麦中形态发生能力强的愈伤组织与形态发生能力弱的愈伤组织相比,惟一的区别是前者的生长素含量较高^[20]。愈伤组织分化过程也是内源生长素/细胞分裂素的比值逐渐降低的过程。如用 TDZ 诱导的拐芹愈伤组织在转移到空白 MS 培养基上后,第 20 d 的 IAA/KT 比值达到最低值,此时愈伤组织表面亦开始出现绿色芽点^[21]。在诱导愈伤组织分化时,需要添加较低质量浓度的生长素和较高质量浓度的细胞分裂素,这是因为生长素 NAA 通过促进玉米素的代谢而降低内源细胞分裂素的含量,而细胞分裂素 6-BA 通过促进细胞分裂素的合成而使其含量增加,从而维持了较高的内源细胞分裂素与生长素比值^[18],因此,了解木本植物内源激素的状况,也将有利于指导不定芽诱导中外源激素的施用,保证有效愈伤组织的形成。

4 外界理化因子

光照是植物组织培养中十分重要的环境因子。不同波长的光对再生体系的建立都有影响^[22]。关亚丽等将暗培养 10 d 后的离体赤桉叶片移至光下,光照时间为 16 h/d,发现其不定芽的诱导率要高于全程光下培养的诱导率,但随着暗培养时间的延长,不定芽诱导率会下降^[23]。刘丽丽等在新红星苹果离体培养中研究也发现,将材料进行 20 d 暗培养后,再转到光下培养,其效果要显著好于全程光下培养,再生率分别为 73.3% 和 0^[24]。尽管上述研究表明暗培养有利于不定芽的诱导,但暗培养对植株再生影响的观点还很有限且持有争议,暗培养的好处可能是光会降解 IAA,因此暗培养会保持生长素/细胞分裂素在器官建成过程中的最佳比例,暗处理也会刺激植物细胞脱分化而加速器官建成,缩短光周期,降低光强以及暗处理会使细胞壁变薄,减少细胞壁沉积,使激素更容易透过细胞壁,但对于间接诱导不定芽的途径来说,暗培养时间过长,叶片伤口部位的愈伤旺盛,叶片愈伤组织化严重,就会抑制芽的再生,形成不定芽的数量也很少^[25]。因此暗培养对植物不定芽的诱导十分重要。但对不同植物而言,其影响是不同的,所以没有统一的暗培养时间。

5 芽的增殖

芽的增殖途径即茎尖、带有腋芽的茎段或初代培养的芽,在适宜的培养基上诱导,可使腋芽不断萌

发、生长,形成丛生芽。然后将丛生芽分离切割,再增殖为丛生芽。如此循环,以芽生芽,可达快繁目的^[26-27]。在植物组织培养中,以芽生芽的能力还取决于培养基的激素种类和质量浓度,还有细胞分裂素和生长素的比例。为促进丛生芽的形成,细胞分裂素和生长素的比值要较大。但质量浓度也不宜过高,否则不但器官分化能力下降,而且遗传稳定性下降。当细胞分裂素水平较高时,形成茎芽的数目可能较多,但每个茎芽的生长受到抑制。因而在诱导生根之前,还要把它们转移到细胞分裂素较低的培养基上,有时还要加入赤霉素,以促进茎的伸长,在生根之前有一个壮苗时期,壮苗后的植株茎秆粗大,叶片宽大,利于生根^[28]和增加成活率^[29]。

6 外植体褐变

外植体接种到培养基上时很容易出现褐变现象,其原因是完整的植物细胞中,酚类化合物和多酚氧化酶是分开存在的,切割外植体后酚类化合物和多酚氧化酶流出,酚类化合物被多酚氧化酶氧化成褐色的醌类化合物,导致一系列的脱水、聚合反应,最后形成黑褐色物质,从而引发褐变^[30]:一般说来木本植物较草本植物易引起褐变,但是培养的部位以及各种条件等也是影响褐变的重要原因。(1)就外植体的生理状态而言:通常幼龄部位产生褐变轻,随着组织老化褐变加重;(2)就培养基的组成而言:固体还是液体培养基,无机盐质量分数,激素种类和质量浓度,培养基的 pH 值,都影响着褐变的程度。研究表明液体培养基能有效防止褐变,降低无机盐质量分数,尤其是 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 的质量分数,可以减少酚类物质外溢,外植体褐变减轻。培养基中细胞分裂素不仅促进酚类化合物的合成还刺激多酚氧化酶的活性。相反生长素类物质能延缓多酚合成,减轻褐变。但对于活性很强的生长素类物质 2,4-D 来说,高质量浓度的 2,4-D 却是促使愈伤组织褐化的一个因素。研究表明:与不加任何激素的 MS 培养基相比,单独添加 2,4-D 时,IAA 氧化酶和细胞分裂素氧化酶的活性明显降低,从而影响愈伤组织的正常生长和分化,这可能是导致愈伤组织褐化的重要原因。培养基中低的 pH 值有利于外植体减轻褐变;(3)就光照而言,光照能促进植物组织中酚的氧化,加快外植体褐变;(4)就外植体大小而言,一般材料太小容易产生褐变;(5)就外植体组织受伤程度而言,在切割材料时应尽量减少伤口面积,创伤面

要平整;(6)还有材料转移时间以及用于外植体灭菌的化学药品等均可不同程度引起褐变的发生。针对上述情况,研究者从选择合适的外植体,暗培养,缩短连续转移的周期以及加入抗氧化剂 Vc 和活性炭等措施加以克服,取得了良好的效果^[29]。

7 试管苗的玻璃化

玻璃化是试管苗的茎和叶成透明水渍状,生长畸形,难以诱导生根。玻璃苗的共同特点是植株矮小肿胀,呈半透明状;茎短而粗,几乎无节间叶片皱缩并纵向卷缩。玻璃化有可能与培养环境水势不当,通气不畅产生胁迫,造成乙烯产生有关。目前也有一些控制玻璃化的方法,如使用透气良好的封口材料;适量减少分裂素而增加生长素的量,一般认为 IAA 对叶片和茎的木质部的分化有直接作用;采用固体培养基时,适当增加琼脂的量;高温季节要有降温措施;适当增加光照以及适当增加无机盐等方法,都可以有效减少试管苗的玻璃化^[31]。

8 结 语

总之,木本植物诱导不定芽的研究是提高树木育种效率的有效途径之一,但是对于野生木本植物的相关研究并不多。通常木本植物组织培养比较难,不像胡萝卜、烟草等草本植物那样很容易建立一套再生体系的研究方法,这可能与木本植物生长周期长,次生代谢物分泌较多有关。在诱导不定芽的过程中,激素的种类及质量浓度直接影响着组织的脱分化及再分化,在直接诱导不定芽的途径中,有些木本植物由于内源激素的影响,想直接诱导不定芽很困难,有时还需要进行几次短时间的前处理后才能诱导芽的发生^[32]。间接诱导不定芽的途径中,愈伤组织形成后,在诱导培养基上相当长一段时间内形态上几乎没有变化,但其内部却在进行着各种生理生化反应,有研究者认为这时培养基配方中的酸性物质使植物叶片处于酸性环境中并导致植物正常细胞首先发生细胞壁酸性降解,随后出现原生质体脱离细胞壁,进一步发生细胞器重组或细胞重建^[33]。在愈伤组织形成后,如果转移过早,还未形成成熟的脱分化组织,过晚,愈伤可能褐化或丧失进一步分化的能力。所以探索出合适愈伤组织的转移及其分化时刻也是间接诱导不定芽途径非常重要的工作环节。今后还应在继代培养,不同时期的细胞切片以及次生代谢物方面作深入的研究,从而在生

理的基础上,了解其生长发育的机制。特别如能从分子水平上检测木本植物不同发育阶段对各种理化因子的需求等,深入探索木本植物不同生长期对各种激素的应答机制,了解不同激素之间和树木的相互作用,建立一套针对许多树种都适用的普遍研究方法,那么就能大大提高木本植物不定芽诱导的频率,提升木本植物优良树种的培育效率,最大限度地发挥树木的生态和社会效益。

参考文献:

- [1] 韦荣华. 没有树木的国家没有希望[J]. 中国林业, 2007 (02B): 10-11.
- [2] 李霞. 生物柴油的发展及在江苏发展的潜力分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(3): 1191-1193.
- [3] 贾小明, 樊军凤, 王娟娟. 河北杨和新疆杨离体叶片诱导不定芽[J]. 西北农林科技大学学报, 2006, 34(12): 110-114.
- [4] 李慧, 陈晓阳, 李云, 等. 银白杨叶片不定芽再生影响因素的研究[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(3): 46-50.
- [5] 马同富, 马宗新. 杨树叶片高效离体再生系统的构建[J]. 中国农业通报, 2007, 23(12): 88-92.
- [6] 何晓兰, 刘桂华, 于建明, 等. 悬铃木叶片不定芽再生[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(3): 225-228.
- [7] Wen hao Dai, Cielo Castillo. Factors affecting plant regeneration from leaf tissues of *Buddleia* species[J]. Hortscience, 2007, 42(7): 1670-1673.
- [8] 赖明航. 马尾松愈伤组织诱导条件的研究[J]. 三峡大学学报: 自然科学版, 2007, 29(5): 457-460.
- [9] 李霞, 陈婷, 周月兰. 籼梗稻成熟胚愈伤组织培养力比较[J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 2005, 28(4): 103-108.
- [10] 李玉铃, 王三红, 刘莉莉, 等. 澳洲青萍离体叶片不定芽再生系统的建立[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(1): 48-52.
- [11] Huettemanca, Preece. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody culture[J]. Plant cell tiss cult, 1993, 33(6): 105.
- [12] Donnai Ledbetter, John EPreece Thidiazuron stimulates adventitious shoot production from *Hydrangea quercifolia* Bartr. leaf explants[J]. Scientia Horticulture, 2004 (5): 121-126.
- [13] 陈喜文, 范晖, 裴立群. AgNO_3 对苹果叶片培养的影响及其与乙烯产生的关系[J]. 核农学报, 1997, 11(1): 39-44.
- [14] ARMSTRONG C L. Establishment and maintenance of firable, embryonic maize callus and the involvement of L-proline[J]. Planta, 1985, 164: 207-214.
- [15] 李代丽, 康向阳. 植物愈伤组织培养中内外源激素效应的研究现状与展望[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(3): 546-548.
- [16] 王秀红. 水稻不同外植体的组织培养能力及其内源激素分析[J]. 四川农业大学, 2004, 37(12): 1819-1823.
- [17] 李焕秀, Murch S J, Sacena P K. TDZ 诱导的黄芩外植体再生研究[J]. 四川农业大学学报, 2000, 18(4): 325.
- [18] Ledbetter Donna I, Preece John E. Thidiazuron stimulates adventitious shoot production from *Hydrangea quercifolia* Bartr. leaf explants[J]. Scientia horticulturae, 2004, 101(7): 121-126.
- [19] Wang H C, Chen J T, Wu SP, et al. Plant regeneration through shoot formation from callus of *Areca catechu*[J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 2003, 75(8): 95.
- [20] 刘涤, 迟静芬, 刘桂芸. 烟草愈伤组织器官发生过程中外源激素的作用[J]. 植物生理与分子生物学报, 1986, 12(1): 1041.
- [21] 汤国庆, 李文安. 在离体条件下拐芹形成愈伤组织和非胚性愈伤组织过程中几种内源激素的变化[J]. 实验生物学报, 1995, 28(2): 203.
- [22] Sang-Ho Lee, Rajesh Kumar Tewari, Kee-Yoeup Paek. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal. plantlets[J]. Plant cell, Tiss org cult, 2007, 90(3): 141-151.
- [23] 关亚丽, 黄敏仁, 王明麻. 赤桉叶片的离体培养与植株再生[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2005, 29(3): 45-48.
- [24] 刘莉莉, 蔡斌华, 刘丹, 等. 新红星苹果离体高效再生体系的建立[J]. 果树学报, 2007, 24(5): 679-681.
- [25] Matu E N, Lindsey K L, Staden J van. Micropropagation of *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell[J]. South African Journal of Botany, 2006, 72(6): 409-415.
- [26] 蒋泽平, 梁珍海, 吴纲, 等. 秤锤树的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(2): 191-191.
- [27] 蒋泽平, 梁珍海, 刘根林, 等. 秤锤树离体培养和植株再生[J]. 园艺学报, 2005, 32(3): 537-540.
- [28] 李霞, 曹昆, 杨秋华, 等. 不同培养基组分对乌柏组培植株生长与生根的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(9): 3555-3556.
- [29] 沈海龙. 植物组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 2005.
- [30] 邹英宁, 吴强盛. 果树组织培养中褐变现象及其抑制研究进展[J]. 长江大学学报: 农学卷, 2007, 9(3): 47-49.
- [31] 吴桂荣. 植物组织培养的应用及存在问题[J]. 高教论坛, 2007, 6(3): 119-121.
- [32] Xiao ling Cao, Freddi A. Hammerschlag. A two-step pretreatment significantly enhances shoot organogenesis from leaf explants of Highbush Blueberry cv Bluecrop[J]. Hortscience, 2002, 37(5): 819-821.
- [33] 祖元刚, 于景华, 唐中华, 等. 植物叶片愈伤组织形成的可能机制[J]. 植物研究, 2005, 25(1): 1-2.