

水曲柳腋芽离体快繁研究初报

张丽杰 张丽玮 冯丹丹 赵霞 沈海龙*

(东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040)

摘要 以水曲柳带顶芽、腋芽茎段为外植体进行离体培养, 研究其适宜的灭菌方法、基本培养基种类和激素对腋芽萌发、丛芽产生、芽苗增殖的影响。结果表明, 水曲柳的腋芽茎段为快繁的适宜外植体, 茎段灭菌以用 0.05% HgCl_2 处理 2 min 最好。在萌芽培养中, BA 和 2ip 均可促进腋芽萌发, 但以 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 处理时萌发效果最好, 萌发率达 100%; 将腋芽萌发后长成的新枝转入添加 ZT 的培养基中, 出现丛芽, 在添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ZT 的培养基中增殖效果最好, 增殖系数达到 3.0。无论在萌芽培养还是增殖培养中均发现 WPM 培养基最适合水曲柳腋芽的离体快繁。

关键词 水曲柳; 离体快繁; 腋芽

In Vitro Culture of Axillary bud Sprouting of *Fraxinus mandshurica*

ZHANG Li-Jie ZHANG Li-Wei FENG Dan-Dan ZHAO Xia SHEN Hai-Long*

(School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract The proper sterilizing method, the effects of basic media and hormones for axillary bud sprouting and proliferation *in vitro* were studied. The explants were stem cuts with axillary or apical bud from one-year old seedlings of *Fraxinus mandshurica*. The sterilization was proved to be very difficult. Sterilizing the buds with 0.05% HgCl_2 for 2 min resulted in the lowest contamination. The effect of BA for bud germination was better than that of 2ip. Eight mg/L was proved to be the optimum level of BA, and the bud sprouting rate could reach 100% by this level. Shoot cluster could be obtained by transplanting the sprouted axillary buds onto medium with ZT, the best proliferation was observed on medium with one mg/L ZT, and the proliferation rate could reach three. WPM was proved to be the best medium either for the bud sprouting and shoot proliferation, that is, WPM medium is proper for *in vitro* axillary bud culture of *F. mandshurica*.

Key words *Fraxinus mandshurica*; *in vitro* culture; axillary buds

水曲柳 (*Fraxinus mandshurica*) 属于木犀科白蜡树属, 是一种高大落叶乔木, 为我国东北珍贵的“三大硬阔”之一, 木材材质优良, 纹理美观, 广泛应用于各领域。目前, 水曲柳主要靠种子繁殖, 但受种子园数量和产量所限, 优质苗木仍然很少。据我们调查, 用种子繁殖的苗木中, 有 5% ~ 7% 的超级苗, 其生长量超过该批苗木平均高的 2 倍。如果

能够把这些优良苗木扩繁, 用于造林, 则有望提高人工林生长速度。

腋芽培养已经被证明是树木组织培养快繁的最有效途径。该技术不仅提高了繁殖系数, 而且可以保持母本遗传的稳定性。近年来关于水曲柳的组织培养在国外尚未见到报道, 而国内此项研究也很少, 主要集中在未成熟胚的离体培养^[1]、下胚轴

基金项目: 黑龙江省留学回国基金(LC03C13)资助

第一作者简介: 张丽杰(1972—), 女, 硕士, 主要从事生物技术在森林培育中的应用。

* 通讯作者: E-mail: shenhl-cf@nefu.edu.cn

收稿日期: 2005-08-29

的培养^[2]方面。这方面曾进行过腋芽培养研究,但均由于外植体灭菌处理失败而未获得启动培养、增殖培养等方面的结果。本试验的主要目的是以带顶芽、腋芽的茎段为材料,探索出适合水曲柳顶芽、腋芽离体快繁的灭菌方法,筛选出适合其快繁的基本培养基和激素的种类及浓度,为今后开发一套适合于水曲柳快速离体扩繁的技术打下基础。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

于2003年10月选取用黑龙江省带岭水曲柳种子园生产的种子,在带岭苗圃培育的1年生水曲柳超级苗,假植于东北林业大学哈尔滨实验林场,次年4月取出试验。首先剪取带顶芽的茎段进行试验,然后将去除顶芽的苗木放于温度为20℃的培养室水培,每两天换一次水,培养2周后取新萌发的幼嫩的带腋芽的茎段为外植体。2004年6~8月选用东北林业大学哈尔滨实验林场内的1年生水曲柳天然更新苗,取带腋芽的茎段及顶芽、以及去顶芽后的苗桩上新萌发的幼嫩带腋芽的茎段为外植体。

1.2 外植体的表面灭菌

带腋芽的幼嫩茎段:用流水反复冲洗45 min,洗后用蒸馏水冲洗4~5次,然后用70%酒精预灭菌10 s,滴两滴吐温20,选择适宜的灭菌试剂和相应的时间不停搅拌,供试的试剂有0.05% HgCl₂ (2、4 min)、10% NaClO₃ (8、10 min)、8% H₂O₂ (8、10 min),然后立刻到超净工作台上用无菌水冲洗6~8次。1年生带顶芽、腋芽的茎段:用流水反复冲洗30 min后用蒸馏水冲洗4~5次,然后用70%酒精预灭菌两次(每次25 s),滴两滴吐温20,选择适宜的灭菌试剂和时间,供试的有0.05% HgCl₂ (5、10 min)、10% NaClO₃ (8、10 min)、8% H₂O₂ (8、10 min),不停搅拌必要时用封闭容器反复不停的振荡,然后立刻到超净工作台上用无菌水冲洗6~8次。

1.3 培养基及培养条件

腋芽培养的基本培养基采用MS^[3],1/2MS(大量元素减半),WPM^[4],DKW^[5],供试细胞分裂素有BA(3.0,5.0,7.0,8.0,9.0,10.0 mg·L⁻¹),2ip(0.5,1.0,1.5 mg·L⁻¹)和ZT(0.5,0.8,1.0,1.5 mg·L⁻¹),用1 mol·L⁻¹ NaOH和HCl将pH值调至5.78,所有培养基都加入20 g·L⁻¹蔗糖,6 g·L⁻¹琼脂,在121℃下高压灭菌20 min。培养室

温度25±2℃,光强1500~2000 lx,光/暗周期16 h/8 h,湿度60%~70%。

1.4 统计分析

萌发率 = 萌发的茎段数/外植体数 × 100%

污染率 = 污染的茎段数/外植体数 × 100%

褐化率 = 褐化的茎段数/外植体数 × 100%

平均增殖数 = 增殖不定芽数/萌发苗数 × 100%

(萌发苗是指由顶芽或腋芽萌发的新生苗,将其用于不定芽的增生)

在腋芽增生的诱导中,对腋芽平均增殖数做差异显著性检验(LSD法),该统计分析所用软件为浙江大学唐启义开发的DPS系统。

2 结果与分析

2.1 外植体的灭菌

从表1中可以看出,两种外植体的灭菌效果差距很大,尤其是对于1年生茎段而言,只有在0.1% HgCl₂灭菌10 min的处理中污染率稍低(65%),而其它灭菌剂处理的污染率都很高,最高达到100%,严重阻碍了试验的进行。以幼嫩茎段为外植体,在3个不同灭菌试剂和灭菌时间中,以0.05% HgCl₂灭菌2 min为最好,污染率和褐化率都较低,分别为20%和5%,成活率最高,达75%;若加长灭菌时间,污染率虽然降低,但成活率大幅度下降(25%),褐化率升高(75%)。在其它几种灭菌处理中,虽然污染率不高,但是茎段褐化率都特别严重,最终成活率很低。

2.2 不同基本培养基对腋芽萌发的影响

在供试基本培养基上,腋芽的萌发率、生长势及芽平均高如表2所示。从表中可以看出,4种培养基对腋芽萌发率的诱导效果依次为WPM > 1/2MS > MS > DKW。不同培养基对腋芽的生长影响较大。其中MS明显不如1/2MS,不仅生长速度慢,而且长势也不理想。原因可能是,对于水曲柳的腋芽生长来说,高浓度的无机盐会抑制其生长甚至对其有毒害作用。在DKW培养基中,腋芽的萌发率虽然稍高于MS,但是生长速度慢,叶片细小,不利于增殖培养。而在WPM培养基中,腋芽萌发率高,生长速度快,叶片伸展,而且长势很好。

2.3 不同分裂素对腋芽萌发及芽增殖的影响

以WPM为基本培养基添加不同浓度的BA和2ip,如表3,发现均能诱导腋芽萌发。经方差分析,各处理间差异并不显著,但从腋芽萌发的生长状况

来看,在添加 BA 的组合中,以 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 为最优,腋芽萌发率达 100%,并且腋芽萌发的速度快、长势好,苗平均高 3 cm,明显优于其它浓度诱导的萌发。在添加 2ip 的组合中,其萌发率虽然稍低于 BA,但是其诱导萌发的腋芽长势却是最好的,在观察中也发现其诱导的腋芽萌发比较迅速,而且个别腋芽有增生现象。这说明 2ip 比 BA 启动腋芽萌发的作用要强。当 BA 浓度超过 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,萌发率开始下降,对诱芽的形成有抑制作用;而 2ip 当低浓度时($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)诱导萌发效果很好。

当腋芽萌发后将其从叶腋处切割下来,转接到增殖培养基培养 30 d 后,发现 ZT 的不同浓度间芽增殖存在显著差异(表 4, $p < 0.01$),尤以 1.0

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时平均增殖数最高为 3.0。在增殖试验中我们还发现,BA、KT 对水曲柳腋芽的增殖作用甚小,仅有极个别腋芽增生,不能达到增殖的目的。

实验发现,较高浓度的 BA 可以促进幼芽及芽原基分生组织分化,但是过高浓度反而不利于腋芽的萌发和不定芽的产生及增殖。在含有较高浓度 ZT 的培养基中,不定芽增殖速度快,而不定芽的增殖需要不断从培养基中吸取养分,过快的增殖使养分需求的压力增大,营养不足,造成芽苗纤细,高矮不一。ZT 浓度较低的处理($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),细胞分裂较慢,不定芽增殖的速度相对减慢,营养竞争压力减少,不定芽能得到较为充足的营养,故而粗壮均匀,而且不定芽增殖数高。

表 1 培养 15 d 后不同的灭菌试剂及时间对外植体污染率、成活率的影响

Table 1 Effect of different sterilizing disinfectant and time on contamination and survival rate after 15 days culture

茎段类型 Types of stem cut	灭菌试剂及浓度 Disinfectant and concentration		灭菌时间 Sterilizing time (min)	外植体数 Number of explants	污染率 Contamination rate(%)	褐化率 Browning rate (%)	成活率 Survival rate (%)
带腋芽的幼嫩茎段 Tender stem cut with axillary bud	HgCl ₂	0.05%	2	96	20	5	75
			4	98	18	75	25
	NaClO ₃	10%	8	96	23	60	10
			10	96	21	88	14
	H ₂ O ₂	8%	8	100	25	87	8
			10	98	26	90	9
1 年生带芽茎段 Current year stem cut with bud	HgCl ₂	0.05%	5	96	95	15	3
			10	98	65	5	20
	NaClO ₃	10%	8	96	98	12	2
			10	96	97	14	5
	H ₂ O ₂	8%	8	100	99	10	3
			10	98	100	9	5

表 2 培养 15 d 后不同基本培养基对腋芽的萌发和生长的影响

Table 2 Effect of different basal media for axillary bud sprouting and growth after 15 days culture

序号 No.	培养基 Media	外植体个数 Number of explants	萌发率 Sprouting rate (%)	生长势 Growth potential	芽平均高 Mean height of sprouted bud(mm)	褐化率 Browning rate (%)	污染率 Contamination rate (%)
1	WPM	37	97.30	生长旺盛 Flourish	5.59	0.00	10.81
2	MS	16	50.00	生长较显著 Grow remarkably	3.15	43.75	0.00
3	1/2MS	17	88.24	生长旺盛 Flourish	4.87	0.00	17.65
4	DKW	16	68.75	生长缓慢但没有停滞 Grow slowly but not stagnate	2.58	25.00	43.75

表 3 不同分裂素浓度对带腋芽幼嫩茎段的腋芽萌发的影响

Table 3 Effect of different Cytokinin contents on sprouting of axillary bud from yung stem cuts after 15 days culture

分裂素 Cytokinins ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	外植体个数 Number of explants	萌发率 Sprouting rate (%)	芽生长状况 Growth status
6-BA	3.0	40	生长缓慢但没有停滞 Grow slowly but not stagnate
	5.0	35	生长缓慢但没有停滞 Grow slowly but not stagnate
	7.0	20	生长较显著 Grow remarkably
	8.0	20	生长显著,腋芽萌发抽高生长达 3 cm Grow remarkably, axillary buds sprout to 3 cm
	9.0	20	生长缓慢但没有停滞 Grow slowly but not stagnate
	10.0	20	生长缓慢但没有停滞 Grow slowly but not stagnate
2ip	0.5	20	生长较缓慢,腋芽萌发抽高生长达 3 cm,个别有增生 Grow remarkably, axillary buds sprout to 3 cm, some proliferated
	1.0	20	生长较显著 Grow remarkably
	1.5	20	生长缓慢但没有停滞 Grow slowly but not stagnate

表 4 ZT 不同浓度处理对腋芽增殖的影响

Table 4 Effect of different level of ZT on bud proliferation after 30 days culture

浓度 Concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	外植体数 Number of explants	增殖株数 Number of proliferation	植株分支数 Number of snag	平均增殖数(个/株) Mean amount of proliferation	新生叶数 New leaves	芽生长状况 Shoot growth status
0.5	45	1	51	1	C	181 生长极缓慢 Almost no growth
0.8	54	14	92	2.21	AB	326 生长缓慢但没有停滞 Grow slowly but not stagnate
1.0	50	13	120	3.0	A	310 生长较显著 Grow remarkably
1.5	20	5	18	2.6	BC	126 生长缓慢但没有停滞 Grow slowly but not stagnate

表 5 带顶芽茎段和腋芽茎段的芽萌发及增殖对比

Table 5 The sprouting and proliferation of stem cuts with apical bud or with axillary buds

茎段类型 Type of stem cuts	接种后 天数 Culture days	芽萌发 The sprouting				芽增殖 The proliferation			
		外植体数 No. of Explants	萌发率 Sprouting ratio (%)	平均高 Mean height (mm)	污染率% Rate of contamin- ation(%)	萌发苗个数 No. of sprouting	增殖株数 No. of prolife- ration	平均增殖数 (个/株) Shoots of proliferation	污染率 Rate of contami- nation(%)
带顶芽茎段 Stem cut with apical bud	15	120	44.5	6.8	53.8	54	10	0.5	80
	30	120	46.1	10.1	56.8	55	20	0.64	95
带腋芽茎段 Stem cut with axillary bud	15	122	30.7	9.7	19.0	38	28	1.7	10
	30	122	57.3	23.4	20.7	70	52	2.6	15

2.4 含顶芽茎段和含腋芽的幼嫩茎段的芽萌发及增殖

在不同时间接种 3 组茎段,每组包括含顶芽的茎段和含腋芽的幼嫩茎段各 40 株左右,于 WPM + BA $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中,接种 15 d 后转入相同的培养基中继续培养 15 d,则外植体培养 15 d 和

30 d 的最终统计结果如表 5。试验表明:接种后 15 d 含顶芽茎段平均每株萌发数高于含腋芽的茎段,但苗平均高差异不大;而在 30 d 后含腋芽茎段的平均每株萌发数明显增加,而且幼苗健壮,长势好。另外,带顶芽茎段由于不是新萌发的枝条,所以生长力也没有刚萌生的茎段强,更重要的是其抗污染

能力差,成活率较低,尽管有少量生存下来的顶芽生长较好,但是在继续培养过程中仍然易被芽内部的微生物所污染,这种内部微生物的污染控制较难,因此即使进行增殖培养,也因污染造成增殖实验失败,所以仅选取带腋芽的茎段作为水曲柳快繁外植体。

3 讨论

3.1 腋芽增殖植株是白蜡植株再生应用最多的形态发生形式,它与器官发生植株再生的培养程序基本相同,不同之处在于幼芽的原始来源^[6]。腋芽增殖中的幼芽来自外植体中现存的腋芽原基。并且组织发育的时间不同,在母株上着生位置不同,其生理状况不同,增殖情况也有差异。欧洲白蜡树种叶腋幼芽的形成具有明显的位置效应,叶轴的近端、中央及远端幼芽形成能力明显不同^[7]。Sinott 认为,组织的幼嫩程度与形态发生能力和植株分化能力相关是由于成熟的组织失去了再生能力,因此与茎尖分生组织接组织的组织具有较强的形态发生能力^[8]。许多学者在其他木本植物组织培养中都观察到外植体成熟程度和形态发生能力成反比关系^[9,10]。枣(*Zizyphus*)的茎段和茎端继代培养时增殖率分别为 234.06% 和 77.03%^[11]。四倍体刺槐茎段和茎端培养时,茎端生长扭曲,没有丛生芽出现^[12]。在水曲柳中,我们发现含顶芽的茎段的萌发不如含腋芽茎段,其原因可能是由于腋芽受顶芽的抑制,正常情况下一般不萌发或长势很弱。当切段转接继续培养过程中,含腋芽的茎段最初受原顶芽的抑制,腋芽生长缓慢,培养 15 d 后,原顶端优势作用逐渐消失,腋芽的生长速度逐渐加快,表现为与顶芽生长的差别逐渐变小,甚至明显高于顶芽的生长能力。这种腋芽后期生长迅速的情况在稍微半木质化的茎段中表现得更为突出,原因可能是在半木质化的茎段中积累了丰富的营养物质,可供芽的短期生长所需,类似情况在黑树莓的组织培养中也有发生^[13]。在不定芽的增殖过程中,顶芽茎段由于内部污染的影响增殖数低。在所有的茎段中,尤以叶腋处萌发出来的新生幼苗的丛生芽诱导率高,所以,笔者建议以从叶腋处萌发出来的新生幼苗为外植体进行水曲柳的快繁。

3.2 白蜡树属树种无论是顶芽还是腋芽都有很多的细毛,这是其茎段灭菌成功率低的主要原因。Hammatt 在早期研究欧洲白蜡(*F. excelsior*)的微繁过程中,当从成熟的白蜡取材时,由于所有

外植体受到微生物的污染,阻挠了早期工作的开展,所以他选择从幼苗上取材^[14]。这在许多种植物的微繁中亦有发生^[15]。另外,灭菌时间对外植体的影响也很大,何碧珠等试验表明,对于柰嫩梢切段,以 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HgCl}_2$ 作为灭菌剂,最佳时间为 13 min,灭菌时间短于 10 min 则污染率太高,大部分外植体因污染而死亡,灭菌时间太长,则由于灭菌剂对外植体的伤害太严重而大大降低存活率^[16]。吴霞等报道,樱桃外植体用 0.1% HgCl_2 在灭菌时间为 5 ~ 15 min 范围内,其灭菌效果相同,灭菌 5 min 效果最好,且试管苗增殖比较容易^[17]。尚敏克等用浓度 0.1% HgCl_2 灭菌 3 min 左右,桃(*Prunus persica*)即可达到较好的灭菌效果^[18]。灭菌时间过长会对材料本身产生杀伤作用,使外植体变褐,影响成活率。对于水曲柳而言,经过试验,我们认为带腋芽幼嫩茎段为外植体时,可用 HgCl_2 灭菌 3 ~ 4 min 达到最佳灭菌效果;对于非幼嫩茎段,则仍然存在严重的微生物污染的现象;对于带顶芽茎段,还存在内生菌严重阻碍芽的增殖过程,笔者认为这些还尚待研究。

3.3 不同树种对营养的需求各不相同。在白蜡树属最早的腋芽增生试验中,在添加 BA 的 WPM 培养基中获得了增生腋芽^[19]。欧洲白蜡萌发幼苗的子叶节用 DKW 附加 6-BA 培养,可使腋芽获得有效的诱导与伸长^[20]。不同的培养基对水曲柳腋芽的诱导也有很大的影响,在本实验中发现,MS 培养基不适合水曲柳腋芽的增殖诱导,这可能与 MS 培养基中的高无机盐浓度有关,而 WPM 培养基对于诱导水曲柳腋芽增殖的效果最好,这与对节白蜡茎段芽的诱导、生长和增殖中使用的培养基一致^[21]。

3.4 试验结果表明 BA 和 2ip 均能诱导腋芽的萌发,而 BA 浓度为 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时效果最好。在增殖培养中,使用 ZT 的效果最好,而 BA、KT 和 2ip 的增殖效果都很差(未给数据),原因可能是较高浓度的 ZT 在培养过程中植株体内进行积累作用,促进了腋芽原基形成,产生了较高的繁殖系数^[22]。ZT 在水曲柳组培中促进芽分化与生长有非常明显的的作用,这与夏光敏等和毕艳娟等的组织培养诱导效果相同^[23,24]。另外,在诱导萌芽的过程中,启动细胞分裂时促进了细胞迅速伸长,从而造成的萌芽率较高,但在以后的培养中,由于细胞的迅速伸长,有机物的积累和运输不足^[25],更主要的是水曲柳本身存在着细胞分裂繁殖困难的特点,致使增殖率

低,需使用强效用的细胞分裂素才能使其增生。为此在整个培养过程中分两步进行。即萌芽期和增殖期。萌芽期使用细胞分裂素 BA,在增殖期使用细胞分裂素 ZT,以便达到快繁之目的。

参 考 文 献

1. 张惠君,罗凤霞. 水曲柳未成熟胚的离体培养研究[J]. 林业科学,2003,39(3):63-70.
2. 谭燕双,沈海龙. 水曲柳下胚轴的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯,2003,39(6):623.
3. Murashige T, F Skoog. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. *Physiol Plant*, 1962(15):473-479.
4. Lloyd G, B H McCown. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel by use of shoot: pculture [J]. *Proc Intern Plant Prop*, 1980, Soc30:421-427.
5. McGranahan G H, Leslic C A. Agrobacterium-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants [J]. *Bio/Technology*, 1988, 6:800-804.
6. 孔冬梅,谭燕双,沈海龙. 白蜡树属植物的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯,2003,39(6):677-680.
7. Hammatt N. Shoot initiation in the leaflet axils of compound leaves from micropropagated shoots of juvenile and mature common ash (*Fraxinus excelsior* L.) [J]. *J Exp Bot*, 1994,45 (275): 871-875.
8. Sinnott E W. *Plantmorphogenesis* [M]. Newyork: McGraw Hill, 1960.
9. Stamp J A, Colby S M. Improved shoot organogenesis from leaves of grape [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1990, 115(6): 1038-1042.
10. Regener F, Roman H. Regeneration of grapevine by means of organogenesis [J]. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 1994, 44(5): 168-174.
11. 朱文勇,杜学梅,郭黄萍,等. 影响枣试管苗生长分化的因素 [J]. 植物生理通讯,1995,31(4):276-278.
12. 郭军战,舒庆艳,王丽玲,等. 四倍体刺槐组织培养中的外植体选择和灭菌研究 [J]. 西北林学院学报,2002,17(1):15-18.
13. 徐桂娟,罗晓芳,姚洪军. 黑树莓的组织培养与快速繁殖 [J]. 北京林业大学学报,2002,24(1):99-100.
14. Hammatt N. *Fraxinus excelsior* L. (common ash) [M]. // Bajaj PS. *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Trees IV*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlin, 1996,35:172-193.
15. Silveira, C E, Cottignies A. Period of harvest, sprouting ability of cuttings, and in vitro plant regeneration in *Fraxinus excelsior* [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1993,72: 261-267.
16. 何碧珠,陈振光. 柞的离体繁殖 [J]. 福建农业大学学报,1998,27(3):296-300.
17. 吴霞,上官小霞,李燕娥. 樱桃组织培养和快速繁殖技术体系的研究 [J]. 山西农业科学,2002,30(2):49-51.
18. 尚敏克,姜国斌,尹伟伦,等. 晚熟桃的离体组织培养 [J]. 辽宁林业科技,2002,20(3):5-7.
19. Preece J E, Christ P H, Ensenberger L, et al. Micropropagation of ash (*Fraxinus*) [J]. *Comb Proc Intl Plant Prop Soc*, 1987,37:366-372.
20. Silveira C E, Nougarede A. Micropropagation of *Fraxinus excelsior*: the multiplication phase a focal point for the initiation of various morphogenetic pathways [J]. *Sciences de la Vie*, 1995,318(2):199-207.
21. 王彩云,白吉刚,杨玉萍,等. 对节白蜡的组织培养及植株再生 [J]. 植物生理学通讯,1999,35(4):299.
22. 毕艳娟,高书国,乔亚科,等. 植物生长调节剂对白玉兰组织培养的影响 [J]. 河北职业技术师范学院学报, 2002,16(3):14-16.
23. 夏光敏,陈惠民. 植物生长调节物质对石防风体细胞胚发生及发育的影响 [J]. 植物学报,1993,5(8):644-648.
24. 毕艳娟,高书国,乔亚科. 植物生长调节剂对丰花月季茎段培养的影响 [J]. 河北农业技术师范学院学报,1994,8(3):26-29.
25. 毕艳娟,高书国,乔亚科,等. 植物生长调节剂对月季组培萌芽和成芽的影响 [J]. 河北农业技术师范学院学报,1996,10(4):37-40.