

文章编号:1000-8551(2007)02-156-04

牡丹组织培养研究进展

赵鑫^{1,2} 詹立平³ 邹学忠²

(1. 东北林业大学林学院/黑龙江省林木遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040;

2. 辽宁林业职业技术学院, 辽宁 沈阳 110101; 3. 辽宁中医药大学职业技术学院, 辽宁 沈阳 110101)

摘要:本文从牡丹组织培养对品种、外植体的选择、基本培养基类型、生长调节物质选择和组培苗的移栽等方面论述了牡丹组织培养的研究现状。牡丹的组织培养中,外植体多采用胚、腋芽、顶芽、茎尖、幼叶、叶柄和土芽(地下芽)等,并且培养经过低温诱导后的鳞芽,可显著提高萌发率;在愈伤组织诱导试验中,选择分化程度较低的材料(如土芽),容易脱分化,获得愈伤组织;在牡丹的增殖培养中,6-BA起到了不可或缺的作用;生根培养中常使用的生长调节物质有 IBA、NAA 和 IAA。此外,还探讨了牡丹组织培养研究中存在的问题,以及未来的研究和发展方向。

关键词:牡丹;组织培养;外植体;培养基;生根

TISSUE CULTURE ADVANCES OF TREE PEONY

ZHAO Xin^{1,2} ZHAN Li-ping³ ZOU Xue-zhong²

(1. College of Forestry, Northeast Forestry University/Key Laboratory of Forestry Genetics and Breeding, Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang 150040;

2. Liaoning Forestry Vocation-technical College, Shenyang, Liaoning 110101;

3. The Professional and Technological Department of Liaoning University of TCM, Shenyang, Liaoning 110101)

Abstract: This paper summarized the advances of *Paeonia suffruticosa* tissue culture, including the varieties, explant selection, plant growth regulators, types of basic medium, transplantation and so on. Embryo, axillary bud, apical bud, stem apex, young leaf, petiole and underground bud are often adopted in *Paeonia suffruticosa* tissue culture, and germination rate of culturing scaly buds is obviously improved after low temperature induction. In the experiment of callus induction, the explants of low degree dedifferentiation (such as underground bud) is easier to get callus; 6-BA is not absence in the proliferation culture; IBA, NAA and IAA are often used in the rooting culture of tree peony. Main problems in *Paeonia suffruticosa* tissue culture were analyzed, the research and development direction in the future was also discussed.

Key words: *Paeonia suffruticosa*; tissue culture; explants; medium; rooting

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)为芍药科芍药属木本植物,是原产于中国的传统名花。牡丹作为观赏植物实行人工栽培,至今已有 1600 年的历史^[1]。因其花大,色、姿、香、韵俱佳,不仅受到国人所喜爱,也受到世界上其他国家人们的欢迎^[2]。

牡丹的传统繁殖方式有种子繁殖、分株繁殖、压条繁殖、嫁接繁殖、扦插繁殖等。常规的无性繁殖方式不但需要大量的繁殖材料,而且受季节限制,无法满足牡

丹的产业化和商品化生产需求。应用植物组织培养技术进行牡丹快速繁殖可以缩短繁育周期,并且可以保持母株的优良性状,还有望在大量的繁殖后代中得到一定数量的突变体。本文将近 20 年的牡丹组织培养研究进行综述,以期以后的研究提供有价值的参考。

收稿日期:2006-11-06

基金项目:辽宁省教育厅青年基金“牡丹优良品种组织培养研究”(05L198)

作者简介:赵鑫(1977-),男,助教,在读博士,主要从事牡丹组织培养及转基因研究, E-mail: zxxlp@126.com

1 牡丹组织培养品种及外植体的选择

1.1 牡丹组织培养品种

牡丹组织培养研究的早期报道是 1965 年 Partanen^[3] 和 1969 年 Demoise 等^[4] 将牡丹种子的合子胚分离出来并建立了愈伤组织培养体系。我国最早关于牡丹组织培养的报道是 1982 年李玉龙^[5] 对洛阳黑牡丹等品种的研究,并初步取得成功。此后,有关牡丹的组织培养研究日益增多。

由于不同牡丹品种具有不同的自然习性,在启动培养过程中,品种间存在着明显的差异。张桂花等^[6] 在对黑花魁、豆绿、金星雪浪和大胡红 4 个品种的鳞芽培养中发现,在自然条件下繁殖较慢的品种,在组培条件下繁殖系数也小;孔祥生等^[7] 以姚黄、胭脂红、夜光白、催花品种“洛阳红”的休眠芽为外植体的研究中发现,洛阳红和胭脂红最易分化、增殖和生根,而姚黄和夜光白的增殖系数小,生根率低,这与其在常规繁殖中的难易程度相符。安佰义^[8] 对 60 个牡丹品种的扩繁特性及扩繁系数进行比较后,认为扩繁能力的大小取决于基因型。但陈笑蕾^[9] 的研究中,自然条件下,在洛阳红、胡红、肉芙蓉、鲁荷红、乌龙捧盛和朱砂垒 6 个品种里,乌龙捧盛的增殖系数较低。但在以鳞芽为外植体的研究中,其增殖系数最高。这可能是因为不同品种其内源激素水平不同,或适宜生长调节物质的浓度和生长状况不同所造成的结果。

1.2 外植体的选择

目前,已报道牡丹组织培养中所采用的外植体有多种,如胚^[10-13]、花药^[14]、腋芽、顶芽^[6]、茎尖^[15-17]、幼叶^[8,9,18,19]、主根韧皮部^[20]、叶柄^[8,9,19,21]、土芽(地下芽)^[19,22]、心皮、雄蕊^[19]、萌生条^[7]、花丝和花瓣^[23] 等。不同外植体具有不同的愈伤组织诱导潜力。陈怡平等^[19] 对紫斑牡丹不同外植体诱导愈伤组织的研究中发现,试管苗的幼芽和土芽诱导率最高,为 100%,其次是叶柄,为 60%,叶片的诱导率最低,为 30.8%,且愈伤组织出现时间最长;而生殖器官雄蕊和心皮未能诱导成功。在所有鳞芽中,以土芽的分化表现最好,分化率可达 94%,花芽最差,仅为 16%^[24]。表明了叶片组织的分化程度较高,叶柄和顶芽组织分化程度较低,而土芽的组织分化程度最低,最易脱分化,产生愈伤组织。在诱导愈伤组织的试验中,幼苗的顶芽和叶柄是较为理想的材料,土芽是最理想的材料。而生殖器官组织分化程度较高,难以脱分化产生愈伤组织,不宜作外植体。

在以鳞芽为外植体的研究中,不同取材时期对芽培养也有影响。孔祥生等^[7] 的研究结果表明,2 月份取即将萌动的芽进行培养效果最好,11 月和 8 月份取休眠芽进行培养次之,而 3 月份以萌生条作外植体效果最差,说明经过冬季低温发育的休眠芽已经通过了休眠期,芽内积累有丰富的营养物质,在适宜的条件下,很快就可萌芽分化,健壮生长。因此,牡丹芽培养最适宜材料是休眠后期即将萌动的芽。另外,陈怡平等^[22] 在对紫斑牡丹 (*Paeonia rockii* T. Hong et Li J. J.) 的休眠地下芽进行研究时发现,720h 的低温处理对地下芽的萌发率及发育速度效果最佳。牡丹种子具有上胚轴休眠的特性^[25]。为了打破上胚轴的休眠,杨红超等^[11] 对牡丹种子进行了组织培养前的三种比较,分别为:① 于 300g/L GA3 溶液中浸泡 24h;② 于 50℃ 温水中浸泡 24h;③ 于 4℃ 培养箱中砂藏 4~6 周。结果发现经过 4℃ 砂藏处理的种子在胚培养中萌芽最快,且萌芽率高达 82.5%。安佰义^[8] 研究了不同时间低温层积处理对凤丹白成熟胚丛生芽诱导的影响,结果表明,经过 40d 低温层积的种胚具有较高的丛生芽诱导率,为 43.33%;而 CK、10d、20d 低温层积处理的种胚诱导率分别为 3.33%、10.00% 和 23.33%。可见,通过低温处理,可以打破牡丹休眠地下芽和种子上胚轴的休眠。

2 基本培养基及生长调节物质选择

2.1 基本培养基

因供试牡丹的品种不同,试验的侧重点不同,并且采用不同的外植体,故所选用的基本培养基有所差异。在已报道的牡丹组织培养研究中一般采用 MS 和 1/2MS 为基本培养基,也有用 WPM 作为基本培养基的报道^[8],并有研究者研究了不同培养基对牡丹组织培养的影响。如安佰义^[8] 用经过 30d 低温层积处理后的种胚为外植体,接种于 WPM、MS 和 B5 3 种培养基中,50d 后在不同培养基上丛生芽的诱导率出现了差异。WPM 培养基丛生芽诱导率最高,为 36.66%,比 MS 培养基高 6.66%,最低的为 B5 培养基,只有 20%。Wang 等^[26] 发现 *Paeonia suffruticosa* Andr: cv ‘Cai Lan’、‘Xue Li Zi Yu’ 和 ‘Zi Xia Lin’ 3 种矮牡丹在 MS、1/2MS 和 WPM 均不能正常生长存活。幼苗在 WPM (3mmol/L Ca^{2+}) 培养基上表现出褐化和萎蔫的症状,这是缺钙的信号。当在 WPM 中加入 6mmol/L Ca^{2+} 时,这些症状消失并恢复正常生长。另外,Razmologv VP^[27] 在牡丹花药培养中,尝试使用了 MS、White、N6 培养基,结果发现只有在 N6 上有一些花药可以分化,产生多细胞组织,

而在 MS 和 White 上,小孢子发生退化,不能发育。而黄守印^[14]和 ZenktelerM 等^[28]采用 MS 作为基本培养基进行牡丹花药培养时,均获得了成功。

2.2 生长调节物质选择

植物在进行组织培养过程中,失去了协调生长的调节机制,并且这种不协调的代谢机制在离体培养中一直保持。因此,在植物组织培养过程中就需要外加生物调节物质来特异性诱导器官或组织的发生。

2.2.1 增殖培养 增殖培养是一个既要保障试管苗健壮生长,又要保证隐芽、腋芽以及不定芽的分化和生长的过程。芽的增殖和生长受到培养基中的细胞分裂素和生长素含量的控制^[9]。杨红超等^[11]对不同激素组合对牡丹胚离体培养的影响进行了研究,认为 6-BA 是牡丹离体胚萌发的必需植物生长调节物质,且只有在适宜的浓度时才有利于胚的萌发;当 6-BA 与 NAA 浓度接近时胚易愈伤组织化,低浓度 NAA 也较利于胚的萌发;GA3 对胚的萌发几乎没有影响,使用与否,胚生长情况和萌发率差别也不大。曹小勇等^[12]对紫斑牡丹胚离体培养研究后认为 6-BA 对胚生长,尤其是对子叶生长具有明显的促进作用。孔祥生等^[7]认为单独加入 6-BA,就可以促进牡丹芽的增殖和生长,加入少量的生长素(IAA 或 NAA)后,虽然提高了增殖倍数,但刺激了愈伤组织的形成,降低了有效新梢率;加入 GA3 后,对牡丹的增殖和生长均有一定的促进作用。李志军等^[15]以牡丹茎尖为外植体,研究不同激素配比对牡丹簇生芽分化的影响中发现,在 MS + 6-BA 2.0mg/L + NAA 0.2mg/L 的培养基中,簇生芽的分化数量最多,质量最好,分化率达到 100%;当 6-BA 和 NAA 浓度分别为 2.0mg/L 和 0 时,其分化率也达到了 90%。陈怡平等^[22]研究了 6-BA、NAA 和 2,4-D 不同浓度配比对紫斑牡丹休眠地下芽生长速度的影响,结果表明,当三者浓度比为 2:1:1 时,其生长速度最快。也有使用如 2ip^[29]、TDZ^[8]、KT^[15,16,30]等植物生长调节物质的报道,但这几种生长调节物质又是配合 6-BA 一同使用的。可见,6-BA 在牡丹的增殖培养中起到了不可或缺的作用。

2.2.2 生根培养 提高牡丹无根苗的生根率一直是牡丹离体再生系统的难点,也是影响牡丹工厂化育苗的关键。生根培养中常使用的生长调节物质有 IBA、NAA 和 IAA,这 3 种激素是单独使用还是混合使用更有利于牡丹的生根,目前看法不一。

李玉龙等^[30]认为牡丹试管苗生根所需的生长素种类专一,使用 IAA 或 NAA 不能诱导生根。孔祥生等^[7]认为,用 IBA 诱导生根,根部形成的愈伤组织少,生根数量多,生根率高;用 IAA 诱导生根,生根率低,生

根数量少,而且由愈伤组织分化形成的根比 IBA 多,移栽时易断根,苗成活率低。张子学等^[31]对凤丹无根苗诱导生根的研究表明,在 MS 培养基中单独添加 IBA 或 IBA + NAA 均能诱导生根,其中以单独添加 IBA 0.8mg/L 和 1.2mg/L 生根率最高,分别达到 80% 和 81.5%;IBA + NAA 虽能诱导生根,但生根率仅为 15% ~ 22%,达不到工厂化生产的要求。安佰义^[8]以 1/2WPM 培养基为基本培养基研究不同浓度 NAA 和 IBA 对不定芽生根的影响。结果表明:添加 IBA 的培养基根发生的时间要早于添加 NAA 的培养基;诱导根发生的 IBA 最佳浓度为 2.0mg/L,诱导率达 60%,NAA 的最佳浓度为 1.0mg/L,诱导率达 45%。李志军等^[15]在 1/2MS 中单独添加 NAA 0.1mg/L 诱导大胡红无根苗生根获得成功,每个嫩茎生根 3 ~ 5 条,长约 2 ~ 3cm,生根率达到了 100%。杨红超等^[11]单独使用 IAA 0.5mg/L 诱导牡丹生根也获得了成功,生根率为 80%。

也有人认为单一的生根激素无法使牡丹试管苗生根。张桂花等^[6]采用了两种方案:①按常规的根诱导方法进行,培养基为 MS + NAA (0.1 ~ 0.5 mg/L)(下同)、MS + IBA (0.2 ~ 0.5 mg/L)、MS + IAA (0.2 ~ 0.5 mg/L);②在无菌条件下将无根试管苗在生根激素浓度分别为 NAA 0.2mg/L、IBA 0.4mg/L、IAA 0.3mg/L 的溶液中处理 2 ~ 3h,再分别转入 1/2MS + NAA (0.1 ~ 0.2mg/L)、1/2MS + IBA (0.2 ~ 0.5mg/L)、1/2MS + IAA (0.2 ~ 0.5mg/L)生根培养基中诱导生根。两种方案均未能诱导根的产生。

3 组培苗的移栽

组培苗移栽是关系到能否实现工厂化育苗的关键,目前对牡丹组培苗移栽报道的主要是从基质、移栽温度和湿度方面的研究。李志军等^[15]在保持 20℃ 左右的温度条件下,采用蛭石 + 草炭土(1:1)和泥炭 + 珍珠岩(1:1)两种基质对生根苗移栽的影响进行了研究。结果表明,两者对移栽成活率的影响差异不显著,但对小苗后期生长速率有影响,移栽 30d 后,平均苗高分别为 18.4cm 和 11.5cm。因此认为,蛭石 + 草炭土(1:1)更适于小苗的生长。孔祥生等^[7]认为在较低温度下移栽有利于小苗成活。在 15℃ ~ 20℃ 条件下,以蛭石为基质,其移栽成活率(36%)比 25℃ ~ 30℃ 条件下(8%)提高 3.5 倍;在 15℃ ~ 20℃ 条件下,以腐殖土(经高压灭菌)为基质的移栽成活率(48%)可比蛭石的提高 33%,且移栽苗的生长也比较健壮。安佰义^[8]选用的移栽基质为园土、珍珠岩、木屑、鸡粪、马粪,并以 2:2:

3:2:1 的比例混合, 严格保持温度为 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度大于 80%, 移栽苗成活率高达 80%。

4 问题与展望

国内外牡丹的组织培养技术已经有了一定的基础, 但还没有形成一个比较完善的技术体系, 还不能实现牡丹的工厂化育苗。其主要原因有: (1) 外植体表面灭菌污染率高; (2) 培养物容易褐化和玻璃化。褐化和玻璃化是受多种因素影响的, 如外植体的发育阶段及灭菌方法^[26]、基本培养基的类型^[8, 9, 21]、外源激素的浓度^[8]、培养时的光照^[9, 21]和温度^[32]等; (3) 繁殖系数低。目前报道的牡丹组织培养繁殖系数一般在 $2 \sim 5$ ^[8, 23], 无法满足工厂化育苗的需要; (4) 生根培养困难。一是生根率不高, 一些品种甚至尚未获得生根苗; 二是根由苗基部的愈伤组织产生, 使根与茎中间形成离层, 影响下一步的移栽工作; (5) 移栽成活率低。一是在移栽过程中容易断根; 二是组培苗移栽阶段感病严重和死亡率高。这些都是实现牡丹工厂化育苗的瓶颈。在以后的工作中, 要加强牡丹不同品种组织培养技术体系的研究, 研制出针对不同品种的高效、实用、标准的组培快繁体系; 其次, 在外植体处理及诱导、增殖分化、生根壮苗等各个阶段, 以及在不同培养基、植物生长调节物质、培养基添加物的选择、培养条件等方面对牡丹组培体系需进行优化。

外植体的幼化程度直接影响着组织培养的结果, 而其又与植物的年龄和着生部位关系密切, 这一点在木本植物的组织培养中表现尤为突出。一般来源于幼年木本植物的外植体比来源于成年的容易培养。如果必须从成年植物上选取外植体时, 应考虑从成年植株的下部幼年期的部位取材。外植体的位置效应, 同时也适用于幼年树, 即同株植物体中, 一般较低部位的外植体要比上部位的容易启动, 培养成功可能性大^[33]。因此, 外植体的位置效应和年龄效应对牡丹组织培养的影响也是今后研究的重要内容。

此外, 在牡丹组培快繁体系的基础上, 应拓宽研究方向。如通过转基因技术, 在基因水平上改变其性状表现: 提高牡丹的抗寒性, 扩大牡丹在北方的栽植面积; 改变牡丹的花色、延长花期等, 给人们带来更丰富的视觉感受; 矮化植株和缩短根长, 以实现牡丹由田间种植到室内培养的转变。单倍体育种可与转基因研究相结合, 获得单倍体转基因植株后, 进行染色体加倍, 从而获得纯合的转基因植株, 避免外源基因的沉默。辐射育种能引起遗传物质的突变, 如染色体的畸变、

DNA 分子的变异, 因此也能够从基因水平上改变其性状表现。但目前牡丹的辐射育种研究仍属空白。今后应加强牡丹的辐射育种研究, 有望通过辐射育种得到不同花色、矮化植株、抗性提高的牡丹新品种。

参考文献:

- [1] 江泽慧主编. 中国牡丹培育与鉴赏及文化渊源. 北京: 中国林业出版社, 2000
- [2] 李佳珏主编. 中国牡丹与芍药. 北京: 中国林业出版社, 1999
- [3] Partanen C R. Cytological behaviour of plant tissues *in vitro* as a reflection of potentialities *in vivo*. WHITE PR. Proc Int Conf Plant Tissue Culture. Berkeley: Cuthan Publ CO, 1965, 1~9
- [4] Demoise C F, Partanen C R. Effects of subculturing and physical condition of medium on the nuclear behavior of plant tissue culture. Am J Bot, 1969, 56(2): 147~152
- [5] 李玉龙, 吴德玉, 等. 名贵花卉组织培养研究. 河南农业科学, 1982, 12: 2
- [6] 张桂花, 王洪梅, 王连祥. 牡丹组织培养技术研究. 山东农业科学, 2001, 5: 16~18
- [7] 孔祥生, 张妙霞. 牡丹离体快繁技术研究. 北方园艺, 1998, 3(4): 87~89
- [8] 安佰义. 牡丹组培离体再生系统的建立. 东北林业大学优秀硕士学位论文, 2005
- [9] 陈笑蕾. 牡丹组织培养的初步研究. 河南农业大学优秀硕士学位论文, 2005
- [10] 何桂梅, 成仿云, 李萍. 两种牡丹胚珠与幼胚离体培养的初步研究. 园艺学报, 2006, 33(1): 185
- [11] 杨红超, 裴冬丽. 牡丹种子胚培养研究. 广西农业科学, 2006, 37(2): 108~110
- [12] 曹小勇. 濒危植物紫斑牡丹胚离体培养. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(2): 35~36
- [13] 周仁超, 姚崇怀. 紫斑牡丹胚培养与植株再生(简报). 亚热带植物科学, 2001, 30(3): 62
- [14] 黄守印. 牡丹胚培养与植株再生. 植物生理学通讯, 1987, (2): 54~55
- [15] 李志军, 王国栋, 等. 牡丹组织培养快繁新技术. 莱阳农学院学报(自然科学版), 2006, 23(2): 122~125
- [16] 李志军, 刘治国, 李红梅. 牡丹组培快繁技术研究. 山东林业科技, 2006, 3: 39~40
- [17] 范小峰, 范小玲. 三种牡丹茎尖培养研究. 陇东学院学报(自然科学版), 2005, 15(2): 38~41
- [18] 李丽霞, 曲复宁, 等. 正交设计方法筛选牡丹(*Paeonia suffruticosa*)愈伤诱导培养基的研究. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2005, 18(1): 41~44
- [19] 陈怡平, 丁兰, 赵敏桂. 用紫斑牡丹不同外植体诱导愈伤组织研究. 西北师范大学学报(自然科学版), 2001, 37(3): 66~69
- [20] 时侠清, 张子学. 凤凰山牡丹药用器官的愈伤组织培养. 核农学报, 2005, 19(3): 186~19
- [21] 何松林, 陈笑蕾, 等. 牡丹叶柄离体培养中褐化防止的初步研究. 河南科学, 2005, 23(1): 47~50

3 讨论

LK-1 的抗病表现为隐性,感病为显性,单基因控制的质量性状遗传,这是番木瓜栽培种中所报道的第 1 个隐性单基因控制的抗 PRSV 基因,本文将该基因暂命名为 *rys* 基因。一般认为番木瓜栽培品种对 PRSV 的抗性为多基因性状,由复杂的基因控制,为数量遗传模式^[2,8]。周国辉等^[3]通过辐射获得的抗病变异抗 PRSV 基因为显性单基因控制,这表明番木瓜对 PRSV 的抗病性既有复杂的多基因控制的数量性状遗传模式,也有单基因控制的质量性状遗传模式,单基因控制的质量性状既有显性遗传模式,又有隐性遗传模式,这充分反映了番木瓜栽培品种对 PRSV 的抗性的复杂机制。本试验结果表明,果实大小、糖酸含量及丰产性等经济性状表现为典型的数量性状特征,这与相关实验结果^[9,10]相似,Escudero 等^[11]分析了 3 个番木瓜品种的抗病性与产量的基因型,认为丰产优质品种的抗病性普遍较差。本试验结果表明,抗病性与大果型特性、植株高度之间存在连锁关系,而抗病性与果肉颜色及糖酸含量两个性状之间不存在连锁关系。

F₂ 代群体中抗病单株对 PRSV-Ys 和 PRSV-Vb 2 个株系具高度抗性,但未发现有完全抗 PRSV-Sm 的单株,推断 LK-1 抗病性具有一定的病毒株系专化性。考虑到 PRSV-Sm 的致病力远比 PRSV-Ys 和 PRSV-Vb 强的实际情况,因此,出现这种现象也可能与 PRSV-Sm 的强致病力有关。在华南地区 PRSV-Ys 是优势株系,PRSV-Sm 发生少。生产上只要对优势株系进行了有效的防治,基本上可以保证番木瓜的抗病生产,因此 LK-1 的抗病性具有很高的实际应用价值。本研究在分析 LK-1 抗病性遗传规律的基础上,已用 LK-1 与其他优

良品种杂交,将其抗病基因与优良品种相结合,构建抗病番木瓜种质群体,为进一步选育高抗优质番木瓜新品种奠定了基础。目前,选育的抗病、植株矮化、小果丰产型的番木瓜新类型正在中试,表现良好,可望成为高抗优质番木瓜新品种。

参考文献:

- [1] 肖火根,真冈哲夫,骆学海. 华南地区番木瓜环斑病毒和畸形花叶病毒调查鉴定研究. 华南农业大学学报, 1997, 18(4): 52 ~ 53
 - [2] Conner R A, Litz R E. Progress in breeding papaya with tolerance to papaya ringspot virus. Proceedings of Florida State Horticultural Society, 1997, 91(1): 182 ~ 184
 - [3] 周国辉,李华平,张曙光,等. 番木瓜环斑花叶病突变体抗性遗传及 RAPD 标记. 植物病理学报, 2001, 31(2): 157 ~ 163
 - [4] Conover R A, Litz R E. Progress in breeding papayas with tolerance to papaya ringspot virus. Proceedings Florida State Horticultural Society, 1978, 91: 182 ~ 184
 - [5] 孙广宇,宗兆锋主编. 植物病理实验技术. 北京: 中国农业出版社, 2002: 78 ~ 82
 - [6] 沈德绪主编. 果树育种学实验指导. 北京: 农业出版社, 1992, 70 ~ 84
 - [7] Storey W B. Segregation of sex types in solo papaya and their application to the selection of seed. Journal American Society Horticultural Science, 1938, 35: 83 ~ 85
 - [8] 黄建昌,肖 艳,梁关生,等. 抗环斑型花叶病毒番木瓜新品种选育研究初报. 西南农业大学学报, 2004, 1: 25 ~ 28
 - [9] Chen Y K. Progress in breeding of F1 papaya hybrids in Malaysia. Acta Horticulture, 1992, 292, 41 ~ 49
 - [10] Subramanyam M D, Iyer C P A. Exploitation of heterosis in papaya. India Journal. Horticulture, 1984, 41: 40 ~ 46
 - [11] Escudero J, Acosta A, Ramirez L, et al. Yield of three papaya genotypes and their tolerance to papaya ringspot virus in Puerto Rico. The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico, 1994, 78(3/4): 111 ~ 115
- ~~~~~
- (上接第 159 页)
- [22] 陈怡平,廉永善,王勋陵. 紫斑牡丹休眠地下芽在组织培养条件下的发育研究. 西北植物学报, 2003, 23(2): 314 ~ 317
 - [23] Beruto M, Lanteri L, Portogallo C. Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 79: 249 ~ 255
 - [24] 李艳敏,罗晓芳. 牡丹离体培养与快速繁殖研究进展. 西南林学院学报, 2004, 24(1): 70 ~ 73
 - [25] 郑相穆,周阮宝,等. 凤丹种子的休眠和萌发特性. 植物生理学通讯, 1995, 31(4): 260 ~ 262
 - [26] Wang H, Staden van J. Establishment of *in vitro* cultures of tree peonies. South African Journal of Botany, 2001, 67: 358 ~ 361
 - [27] Razmology V P. Tissue induction from anther culture of *Paeonia × hybrida*. In Stimulatory I INgibitory Pretsesscv u Rastenii. Moscow, 1988, 62 ~ 64
 - [28] Zenktele M, Misiura E, Pointka A. Induction of androgenic embryoids in the vitro cultured anthers of several species. Experientia, 1975, 3: 289 ~ 291
 - [29] Harris R A, Mantell S H. Effect of stage II subculture duration on the multiplication rate and rooting capacity of micropropagated shoots of tree peony. J Hort Sci, 1991, 66(1): 95 ~ 102
 - [30] 李玉龙,吴德玉,等. 牡丹试管苗繁殖技术的研究. 科学通报, 1984, (8): 500 ~ 502
 - [31] 张子学,丁为群,等. 凤丹组织培养研究. 现代中药研究与实践, 2004, 18(1): 18 ~ 21
 - [32] 储成才,李大卫. 牡丹组织培养中玻璃化现象的出现及初步观察. 河南师范大学学报(自然科学版), 1992, 20(1): 70 ~ 73
 - [33] 沈海龙主编. 植物组织培养. 北京: 中国林业出版社, 2005