

羊角槭愈伤组织诱导、增殖与分化

胡佳卉, 王小德

(浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 以羊角槭 *Acer yangjuechi* 幼嫩茎段和叶片为外植体, 研究基本培养基和植物生长调节剂 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA), 萘乙酸(NAA), 激动素(KT)和 N-苯基-N'-1,2,3-噁二唑-5-脲(TDZ)对愈伤组织诱导、增殖与分化的影响。试验通过植物组织培养技术诱导外植体产生愈伤组织, 并对愈伤组织进行增殖与分化。结果表明: 最适宜愈伤组织诱导的外植体为茎段, 基本培养基和适当的植物生长调节剂配比均能促进愈伤组织的诱导增殖与分化; 诱导效果最好的基本培养基为木本植物培养基(WPM 培养基)。在诱导中, 6-BA 的效果显著高于 NAA 和 KT。羊角槭愈伤组织诱导最佳培养基为 WPM+ 0.3 mg·L⁻¹ NAA +0.5 mg·L⁻¹ KT+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA, 诱导率达 62.9%; 愈伤组织增殖最佳培养基为 WPM+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA, 增殖倍数达 2.4 倍。TDZ 对分化有重要作用, WPM+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+1.5 mg·L⁻¹ TDZ 能促进愈伤组织产生最多不定芽芽点。表 7 参 16

关键词: 森林培育学; 羊角槭; 愈伤组织; 诱导; 增殖; 分化

中图分类号: S792.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2018)05-0975-06

Induction, proliferation, and differentiation of *Acer yangjuechi* callus

HU Jiahui, WANG Xiaode

(School of Landscape and Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To study the effect of basic mediums and plant hormones on callus induction, proliferation, and differentiation with *Acer yangjuechi*, stems and leaves were used as the explants. Data analysis included variance analysis and poor analysis. Results showed that the optimal explant for callus induction was stems. Basic medium and a proper phytohormone ratio both promoted callus induction, proliferation, and differentiation. The optimum medium for induction was woody plant medium (WPM). The effect of 6-benzylaminopurine (BA) on callus induction was better than 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and kinetin (KT). Data analysis of the experimental results showed that the best medium for callus induction was WPM + 0.3 mg·L⁻¹ NAA + 0.5 mg·L⁻¹ KT + 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA. The best medium for callus proliferation was WPM + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg·L⁻¹ NAA. Thidiazuron (TDZ) played an important role in differentiation with the medium WPM + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg·L⁻¹ NAA + 1.5 mg·L⁻¹ TDZ, promoting callus to produce the largest number of adventitious buds. [Ch, 7 tab. 16 ref.]

Key words: silviculture; *Acer yangjuechi*; callus; induction; proliferation; differentiation

羊角槭 *Acer yangjuechi* 是槭树科 Aceraceae 槭属 *Acer* 落叶乔木。该种仅分布于浙江西天目山狭窄的范围, 生长于海拔 700 m 的疏林中^[1], 为浙江省特有种, 其数量极少, 长势衰退。羊角槭种子繁殖能力低, 天然更新能力较弱, 已经陷入灭绝的险境, 是中国仅存 10 株以下的珍稀植物之一^[2], 被列为国家二级保护植物。羊角槭系古老的残遗种, 与产自日本的日本羊角槭 *Acer myabei* 关系密切, 对研究东亚植物区系的起源、演化以及古气候、古地理变迁具有重要价值。植物组织培养技术对物种种质保存、植

收稿日期: 2017-09-15; 修回日期: 2017-11-07

基金项目: 中央财政林业科技推广示范基金资助项目([2013]TS03)

作者简介: 胡佳卉, 从事园林植物及其应用研究。E-mail: 154408970@qq.com。通信作者: 王小德, 教授, 博士, 从事园林植物引种与应用、植物造景和生态园林等研究。E-mail: wxd65@zafu.edu.cn

物育种等方面具有促进作用。目前,国内对羊角槭的研究主要包括种子生物学特征的测定以研究种子深度休眠的原因^[3]、光能和水利用效率^[4]、基因组 DNA 提取^[5]及叶绿素荧光特性研究^[6]等方面,而以羊角槭外植体为材料进行愈伤组织诱导及植株再生方面的研究还未见报道。为解决羊角槭繁殖系数低、繁殖速度慢,优良品种的推广与培育受到限制,无法满足大规模生产需要的问题,以羊角槭的嫩茎和叶片为外植体材料,研究了不同消毒方法、不同基本培养基及不同植物生长调节剂组合对羊角槭愈伤组织的诱导、增殖及分化的影响,筛选出最适宜诱导愈伤组织的外植体及培养基配比,为建立羊角槭高效的快繁技术体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以 5~6 年生羊角槭当年生幼嫩茎段和叶片为外植体。试验在浙江农林大学园林学院组培室进行,样品于 2017 年 4~6 月采自浙江农林大学珍稀植物园。

1.2 方法

1.2.1 外植体处理及消毒 天气晴朗的清晨,剪取生长状况良好、无病虫害的羊角槭当年生幼嫩茎段和叶片,装袋带回实验室备用。用流水轻轻洗净表面污渍,后用洗洁精溶液浸泡 5 min,漂净后用流水冲洗 2 h,沥干水后置于超净工作台,用体积分数为 75%的乙醇消毒 30 s,无菌水冲洗 3~5 遍,后再用 1.0 g·kg⁻¹ 的氯化汞(HgCl₂)浸泡消毒,叶片消毒 8 min,茎段消毒 10 min,无菌水冲洗 3~5 遍,消毒完后用无菌滤纸吸干表面水分,在超净工作台上将叶片切成 0.5 cm × 0.5 cm 大小的方块,茎段切成 0.5~1.0 cm 的小段待接种。

1.2.2 外植体取样时间选择 分别于 4 月(处理 1)和 6 月(处理 2)剪取生长状况良好、无病虫害的羊角槭幼嫩茎段和叶片,处理消毒后接种于木本植物培养基(WPM 培养基)+0.5 mg·L⁻¹ 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)+0.3 mg·L⁻¹ 萘乙酸(NAA)的培养基中,接种 15 瓶·处理⁻¹,接种外植体 2 个·瓶⁻¹,重复 3 次,7 d 后统计不同月份取样的存活率、污染率。

1.2.3 外植体消毒方法选择 为确定外植体最佳消毒方法,选择乙醇 30 s+氯化汞 8 min(处理 1),乙醇 30 s+氯化汞 10 min(处理 2),乙醇 30 s+氯化汞 12 min(处理 3)3 种消毒方法对羊角槭外植体进行表面消毒,消毒完后接种于 WPM+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.3 mg·L⁻¹ NAA 的培养基中,接种 15 瓶·处理⁻¹,接种外植体 2 个·瓶⁻¹,重复 3 次,7 d 后统计污染率,30 d 后统计诱导率。

1.2.4 外植体类型对诱导的影响 分别以羊角槭的嫩茎(处理 1)和嫩叶(处理 2)为外植体,消毒处理后接种于 WPM + 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.3 mg·L⁻¹ NAA 的培养基中,接种 15 瓶·处理⁻¹,接种外植体 2 个·瓶⁻¹,重复 3 次,30 d 统计愈伤组织诱导情况。

1.2.5 愈伤组织诱导最佳培养基筛选 以 1/2MS, MS 和 WPM 为基本培养基,植物生长调节剂选择 NAA (0.1, 0.2, 0.3 mg·L⁻¹), 激动素(KT)(0, 0.5, 1.0 mg·L⁻¹), 6-BA(0.5, 1.0, 1.5 mg·L⁻¹), 根据 L₉(3)⁴ 设计四因素三水平正交试验表,共配置 9 组培养基,另配置 3 组只添加基本培养基不添加任何植物生长调节剂的培养基作为对照(表 1),接种 15 瓶·处理⁻¹,接种外植体 2 个·瓶⁻¹,重复 3 次,30 d 后统计愈伤组织诱导情况。愈伤组织诱导率=产生愈伤组织的外植体数/接种的外植体总数×100%。

1.2.6 愈伤组织增殖最佳培养基筛选 根据愈伤组织诱导结果,选取 WPM+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 为培养基固定成分,分别添加 0, 0.05, 0.10, 0.15 mg·L⁻¹ 的 NAA,将诱导出的生长较好的愈伤组织切成大小相近的颗粒,接种到增殖培养基中,30 d 后测定愈伤组织的鲜质量增量,统计增殖倍数。愈伤组织增殖倍数=培养后愈伤组织质量/接入时愈伤组织质量。

1.2.7 愈伤组织分化最佳培养基筛选 以 WPM 为基本培养基,1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA 为固定植物生长调节剂成分,分别添加 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg·L⁻¹ 的 TDZ,将诱导及增殖出的生长较好的愈伤组织切成大小相近的颗粒,接种到分化培养基中,30 d 后统计出芽数及分化率。愈伤组织分化率=分化出芽的

表 1 诱导培养各因素质量浓度设置

水平	因素			
	培养基	$\rho_{\text{NAA}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{KT}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{6BA}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
1	1/2MS	0.1	0	0.5
2	MS	0.2	0.5	1.0
3	WPM	0.3	1.0	1.5

愈伤组织数/接种的愈伤组织总数×100%。

1.3 培养条件

所有培养基均添加蔗糖 30 g·L⁻¹，琼脂粉 7 g·L⁻¹，调节 pH 值至 pH 5.8，并在 121 ℃，1.1 kg·cm⁻² 压力下高温高压灭菌 20 min 待用。培养基接种外植体 2 个·瓶⁻¹，接种 15 瓶·处理⁻¹，3 次重复。接种后的材料在光照强度 2 000 lx，光照 12 h·d⁻¹，温度(25±2) ℃的培养室中进行培养。

1.4 数据统计与分析

试验数据采用 SPSS 19.0 进行方差及极差分析^[7]，对于差异显著者采用 Tukey 多重比较，字母法标记；作图在 Excel 软件下完成。

2 结果与分析

2.1 外植体取样时间选择

处理 1 的外植体污染率为 11.5%，处理 2 同样消毒方法处理的外植体接种后污染率为 61.7%(表 2)，显著($P<0.05$)高于处理 1，且处理 1 的愈伤组织膨大早、生长速度较快，而处理 2 的愈伤组织生长较为缓慢，说明 4 月为羊角槭嫩茎嫩叶采样的最佳时期。

表 2 不同取样时间的污染率

Table 2 Contamination rate at different sampling times		
处理	取样月份	污染率/%
1	4	11.5 A
2	6	61.7 B

说明：同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)

2.2 外植体消毒方法选择

3 种处理污染率存在显著差异($P<0.05$)，从高到底依次为处理 1，处理 2 和处理 3，污染率分别为 25.0%，20.6%和 4.7%，而 3 种处理的诱导率也存在显著差异($P<0.05$)，从高到低依次是处理 2，处理 3 和处理 1，诱导率分别为 79.1%，68.3%和 67.8%(表 3)。随着氯化汞消毒时间的增加，污染率依次降低，诱导率先升高后降低，说明适当时间的氯化汞消毒有利于防治外植体污染，但消毒时间过长可能导致外植体失去生活力从而抑制诱导。综合污染率和诱导率来看，羊角槭外植体最适合的消毒方法为体积分数为 75%的乙醇 30 s+1.0 g·kg⁻¹ 氯化汞 10 min。

表 3 不同消毒方法的污染率和诱导率

Table 3 Contamination rate and Induction rate by different disinfection methods				
处理	消毒方法		污染率/%	诱导率/%
1	75%乙醇 30 s	1.0 g·kg ⁻¹ 氯化汞 8 min	25.0 A	67.8 B
2	75%乙醇 30 s	1.0 g·kg ⁻¹ 氯化汞 10 min	20.6 B	79.1 A
3	75%乙醇 30 s	1.0 g·kg ⁻¹ 氯化汞 12 min	4.7 C	68.3 C

说明：同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)

2.3 外植体类型对诱导的影响

不同的羊角槭外植体接种到相同的培养基上，第 7 天后茎段开始膨大，从切口处慢慢开始出现瘤状物，叶片在第 5 天后开始卷曲，在第 18 天后切口靠近叶脉处开始出现颗粒状物，且极为细小。30 d 后统计结果如表 4 所示：茎段和叶片的诱导率存在显著差异($P<0.05$)，茎段的诱导率为 54.7%，叶片的诱导率为 34.0%，茎段愈伤组织颗粒大、愈伤量多，叶片虽也有一定程度的愈伤量，但愈伤组织颗粒小、不能成块。由此可见，茎段是羊角槭愈伤组织诱导的最佳外植体。

表 4 不同外植体的出愈数与诱导率

Table 4 Amount of callus and induction rate of different explants				
处理	外植体	接种数	出愈数	诱导率/%
1	茎段	50	27.3 A	54.7 A
2	叶片	50	17.0 B	34.0 B

说明：同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)

2.4 愈伤组织诱导最佳培养基筛选

不同基本培养基^[8]和植物生长调节剂组合均对羊角槭愈伤组织的诱导有不同程度的促进作用。从不同外植体来看，茎段愈伤组织诱导率高于叶片愈伤组织，茎段膨大产生颗粒较大的淡黄色或略偏红色的或紧致或疏松的愈伤组织，叶片蜷缩，且仅在靠近叶柄的位置长出淡青色的颗粒极小的愈伤组织，均不利于继代增殖。茎段在添加了植物生长调节剂的培养基中均诱导出愈伤组织，愈伤诱导率为 21.17%~62.90%，愈伤组织的数量及形态方面存在差异。1~3 号诱导出的愈伤组织偏红色，呈小颗粒状，愈伤发生量较少，4~6 号诱导出的愈伤组织呈白淡黄色，质地松软，颗粒较大，7~9 号诱导出的愈伤组织呈淡黄色淡绿色，大颗粒状，有致密有松软。

表 5 显示：基本培养基对愈伤组织诱导率有显著影响($P<0.05$)，NAA，KT 和 6-BA 对愈伤组织诱导率的影响不显著，但影响程度略有差异，从高到低依次为 6-BA，NAA 和 KT。综合表 5 数据可得，最适宜于羊角槭愈伤组织诱导的培养基为 WPM+0.3 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ KT+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA。

表 5 愈伤组织诱导正交试验结果

Table 5 Orthogonal design and results for callus induction

处理	基本培养基	$\rho_{\text{NAA}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{KT}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{6BA}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	诱导率/%	
					茎段	叶片
1	1/2MS	0.1	0	0.5	23.37 D	5.37 C
2	1/2MS	0.2	0.5	1.0	23.17 D	19.23 BC
3	1/2MS	0.3	1.0	1.5	26.80 D	14.23 BC
4	MS	0.1	0.5	1.5	21.17 D	9.73 BC
5	MS	0.2	1.0	0.5	32.57 CD	9.60 BC
6	MS	0.3	0	1.0	22.57 D	10.87 BC
7	WPM	0.1	1.0	1.0	38.83 C	22.93 B
8	WPM	0.2	0	1.5	51.33 B	37.03 A
9	WPM	0.3	0.5	0.5	62.90 A	41.67 A
10	1/2MS	0	0	0	0	0
11	MS	0	0	0	0	0
12	WPM	0	0	0	0	0
K_1	24.44	27.79	32.42	39.61		
K_2	25.44	35.69	35.75	28.19		
K_3	51.02	37.42	32.73	33.10		
R	26.58	9.63	3.33	11.42		
F	10.880	0.301	0.035	0.384		
P	0.01	0.751	0.965	0.697		

说明：同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)

2.5 愈伤组织增殖最佳培养基筛选

由表 6 可知：植物生长调节剂对愈伤组织的增殖有促进作用。当 6-BA 质量浓度不变时，愈伤组织的增殖倍数随着 NAA 质量浓度的增加先变大后减小，不添加 NAA 的处理组增殖不明显，4 个处理之间增殖倍数差异不显著($P>0.05$)，添加 0.1 mg·L⁻¹NAA 的处理 3 增殖倍数最大，为 2.40，增殖效果最佳，愈伤组织膨大最明显，新产生呈淡绿色的愈伤组织。由此可见，最适宜于羊角槭愈伤组织增殖的培养基为 WPM+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA。

2.6 愈伤组织分化最佳 TDZ 质量浓度筛选

将生长良好的愈伤组织分别接种到 TDZ 质量浓度不同的 4 种处理培养基中诱导不定芽，培养 30 d 后，4 种处理培养基中均无明显的不定芽产生，但其生长情况有所不同。4 种处理中愈伤组织均有增殖膨大，表面有颗粒状突起，产生或浅绿色或白绿色的芽点，处理 2 新增愈伤组织呈深红褐色，处理 3 呈浅绿色。4 种处理中，随着 TDZ 质量浓度的增加，产生的芽点数量也随之增加，说明 TDZ 质量浓度对愈伤组织的分化有一定影响，较高质量浓度的 TDZ 能促进愈伤组织产生较多不定芽芽点，对愈伤组织分化有促进作用。

3 结论与讨论

3.1 结论

本研究分别在 4 和 6 月进行羊角槭愈伤组织诱导。结果表明：4 月愈伤组织生长快、出愈率大、污染率低。4 月正值羊角槭生长季节，较 6 月更适宜做愈伤组织诱导试验。在外植体消毒试验中，选用了乙醇与氯化汞不同消毒时间的组合。根据培养后外植体的污染率和诱导率，得出羊角槭外植体最佳消毒方法为体积分数为 75%乙醇消毒 30 s+1.0 g·kg⁻¹ 氯化汞消毒 10 min。根据培养后愈伤组织生长情况可

表 6 植物生长调节剂对愈伤组织增殖的影响

Table 6 Effect of different plant hormones on callus proliferation

处理	培养基	$\rho_{6BA}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{NAA}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	增殖倍数
1	WPM	1.0	0	1.30 A
2	WPM	1.0	0.05	1.85 A
3	WPM	1.0	0.10	2.40 A
4	WPM	1.0	0.15	2.00 A

说明：同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)

表 7 植物生长调节剂对愈伤组织分化的影响

Table 7 Effect of different plant hormones on callus differentiation

处理	$\rho_{TDZ}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	生长情况
1	0.5	愈伤组织增殖膨大，未分化出明显不定芽，表面颗粒凸起产生芽点 1~2 个·组 ⁻¹
2	1.0	新长出的愈伤组织呈深红褐色，产生浅绿色芽点 2~3 个·组 ⁻¹
3	1.5	愈伤组织膨大较明显，浅绿色，无明显不定芽，产生绿色芽点约 4 个·组 ⁻¹
4	2.0	愈伤组织增殖扩大无明显不定芽发生，产生白绿色芽点 3~4 个·组 ⁻¹

知，最适宜于羊角槭愈伤组织诱导的外植体是其嫩茎，嫩茎愈伤组织诱导率高、诱导出的愈伤组织量大，利于继代培养。羊角槭愈伤组织诱导最佳培养基为 WPM+0.3 mg·L⁻¹NAA+0.5 mg·L⁻¹KT+0.5 mg·L⁻¹6-BA，增殖最佳培养基为 WPM+1.0 mg·L⁻¹6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA，TDZ 质量浓度的增加有利于羊角槭愈伤组织产生更多不定芽芽点，但诱导其愈伤组织分化出明显不定芽的培养基配比还有待进一步研究。

3.2 讨论

4 月取材的羊角槭外植体较之 6 月取材的外植体污染率低，且萌动早、生长速度快，出愈率高，更适宜于做初代培养。4 月羊角槭处于叶芽萌动、展叶时期，此时植株长速快，新生幼嫩茎叶易于灭菌。6 月取材的羊角槭外植体污染率较高，提高氯化汞灭菌时间也难以降低其污染率，且出愈率较低，可能因为其茎叶生长成熟，菌类等污染物侵入木质部等细胞组织，表面消毒难以达到消毒目的。组培所选外植体若为茎段，应选中度木质化的材料。不同树种的采条最佳时间不同，不同的发生途径对最佳外植体有一定的要求，因此，外植体选择与发生途径应同时考虑，将两者有机结合起来^[9]。

植物生长调节剂是植物组织培养中的关键物质。外植体的诱导和增殖不仅与植物生长调节剂的种类有关，还与其质量浓度及配比有关^[10-11]。植物生长调节剂在植物不同的发育阶段起决定性作用，其作用和效果也与外植体及愈伤组织本身内源激素的种类和质量浓度有重要关系。在植物组织培养过程中，适宜质量浓度的细胞分裂素 6-BA 可以有效地诱导芽的萌发与不定增殖，而适宜质量浓度的生长素可以促进茎的伸长^[12]；2,4-D，KT，NAA 等植物生长调节剂的配比使用有利于外植体愈伤组织的形成，且 NAA 质量浓度越高，形成的愈伤组织质地越好^[13]。本研究结果表明：基本培养基类型，6-BA，NAA 和 KT 等植物生长调节剂的质量浓度配比都能促进羊角槭愈伤组织诱导，但愈伤组织的诱导率、生长状态存在一定差异。本本植物培养基(WPM)较之 MS 和 1/2MS 对愈伤组织诱导有更好的效果。在 3 种植物生长调节剂中，6-BA 处理对羊角槭愈伤组织诱导的效果最明显。愈伤组织在培养基上生长一段时间后，营养物质枯竭，水分散失，并已经积累了一些可能对愈伤组织产生有害影响的代谢产物，此时需要将这些组织转移到新的培养基上^[14]。在愈伤组织增殖阶段，愈伤组织的增殖倍数随着 NAA 质量浓度的增加先上升后下降，NAA 质量浓度为 0.1 mg·L⁻¹ 时，增殖倍数最大为 2.40，说明 NAA 对愈伤组织增殖有促进作用，但 NAA 质量浓度过高会抑制愈伤组织的发生，NAA 与 6-BA 的质量浓度配比为 1:10 时增殖效果最佳。这与刘艳丽等^[15]诱导盾叶薯蓣 *Dioscorea zingibernsis* 愈伤组织的结果相似。愈伤组织诱导不定芽分化的试验中，植物生长调节剂的种类比例对分化的影响十分重要。本研究愈伤组织分化阶段，添加 TDZ 有利于羊角槭愈伤组织产生更多不定芽芽点，说明 TDZ 是诱导不定芽分化的重要生长调节剂。这与白芨 *Bletilla striata*^[16]愈伤组织分化成不定芽的试验结果相似。但本研究中愈伤组织只分化出芽点，并未分化出明显不定芽，这可能是试验方案中 6-BA，NAA 与 TDZ 的植物生长调节剂组合对羊角槭愈伤组织分化出芽的影响不明显，促使其分化成芽的植物生长调节剂组合配比还有待进一步的研究。

4 参考文献

[1] 方文培, 包士英. 中国植物志: 第 46 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1981.
[2] 张若蕙. 浙江珍稀濒危植物[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1994.
[3] 许小连, 金荷仙, 陈香波, 等. 濒危树种羊角槭种子基本生物学特征[J]. 林业科技开发, 2012, 26(3): 46 -

- 49.
- XU Xiaolian, JIN Hexian, CHEN Xiangbo, *et al.* Biological characteristics of the seed in *Acer yanjuechi*, an endangered species [J]. *For Sci Technol*, 2012, **26**(3): 46 – 49.
- [4] 王晓燕, 杨淑贞, 赵明水, 等. 濒危植物天目铁木和羊角槭的光合及蒸腾特性日动态比较[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2015(2): 113 – 121.
- WANG Xiaoyan, YANG Shuzhen, ZHAO Mingshui, *et al.* Comparative diurnal variations in photosynthesis and transpiration of endangered plant species, *Ostrya rehderiana* and *Acer yangjuechi* [J]. *J East China Norm Univ Nat Sci*, 2015(2): 113 – 121.
- [5] 李倩中, 刘晓宏, 苏家乐, 等. 羊角槭基因组 DNA 提取及 SRAP-PCR 体系优化[J]. 江苏农业学报, 2009, **25**(3): 538 – 541.
- LI Qianzhong, LIU Xiaohong, SU Jiale, *et al.* Extraction of genomic DNA from *Acer yangjuechi* and system optimization of SRAP-PCR [J]. *J Jiangsu Agric Sci*, 2009, **25**(3): 538 – 541.
- [6] 钟泰林, 李根有, 石柏林. 3 种浙江特产濒危植物气体交换特征和叶绿素荧光特性研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2009, **27**(2): 149 – 152, 176.
- ZHONG Tailin, LI Genyou, SHI Bailin. Comparison of gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in three endangered species of Zhejiang Province [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ Agric Sci*, 2009, **27**(2): 149 – 152, 176.
- [7] 李洪成, 姜宏华. SPSS 数据分析教程[M]. 北京: 人民邮电出版社, 2012.
- [8] ABOBKAR I M, AHMED M, ABOBKAR I M, *et al.* Plant tissue culture media [C]//LEVA A, RINALDI L M R. *Recent Advances in Plant in Vitro Culture*. Rijeka: Janeza Trdine, 2012: 30 – 40.
- [9] 黄烈健, 王鸿. 林木植物组织培养及存在问题的研究进展[J]. 林业科学研究, 2016, **29**(3): 464 – 470.
- HUANG Liejian, WANG Hong. Advances in tissue culture techniques of trees and the problems existed [J]. *For Res*, 2016, **29**(3): 464 – 470.
- [10] 韩登媛, 李旦, 赵健, 等. 华北落叶松胚性愈伤组织诱导影响因子的研究[J]. 林业科学研究, 2013, **26**(4): 454 – 458.
- HAN Dengyuan, LI Dan, ZHAO Jian, *et al.* Factors affecting induction of embryogenic callus of *Larix principis-rupprechtii* [J]. *For Res*, 2013, **26**(4): 454 – 458.
- [11] CAI Xiaodong, WANG Guiyuan, CAO Wenjuan. In vitro induction and proliferation of callus from immature cotyledons and embryos of *Juglans regia* cv. ‘Xiangling’ [J]. *Not Bot Horti Agrobot*, 2013, **41**(2): 378 – 384.
- [12] 陈菊, 陈国惠. 6-BA 与 NAA 浓度配比对何首乌不定芽增殖的影响[J]. 中国农学通报, 2006, **22**(11): 173 – 175.
- CHEN Ju, CHEN Guohui. Study of the concentration of 6-BA and NAA in the rapid propagation of *Polygonum multiflorum* Thunb. [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2006, **22**(11): 173 – 175.
- [13] 何诗虹, 王跃华, 唐旭, 等. 羌活植物离体培养及植株再生研究[J]. 中药材, 2017, **40**(7): 1525 – 1528.
- HE Shihong, WANG Yuehua, TANG Xu, *et al.* Study on vitro culture and plant regeneration of *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang [J]. *J Chin Med Mat*, 2017, **40**(7): 1525 – 1528.
- [14] AHMAD I, HUSSAIN T, ASHRAF I, *et al.* Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture [J]. *Agric Environ Sci*, 2013, **13**(4): 539 – 547.
- [15] 刘艳丽, 姚家玲, 张友德. 盾叶薯蓣愈伤组织诱导研究[J]. 华中农业大学学报, 2004, **23**(4): 389 – 392.
- LIU Yanli, YAO Jialing, ZHANG Youde. Study on callus inducement from *Dioscorea zingiberensis* Wright [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 2004, **23**(4): 389 – 392.
- [16] 石云平, 赵志国, 唐凤鸾, 等. 白芨愈伤组织诱导、增殖与分化研究[J]. 中草药, 2013, **44**(3): 349 – 353.
- SHI Yunping, ZHAO Zhiguo, TANG Fengluan. Induction, proliferation, and differentiation of *Bletilla striata* callus [J]. *Chin Trad Herbal Drugs*, 2013, **44**(3): 349 – 353.