

南方红豆杉离体胚培养诱导不定芽研究

曾余力, 林新春, 桂仁意, 张翠萍, 黄丽春

(浙江农林大学 浙江省现代森林培育重点实验室, 浙江 临安 311300)

摘要: 以南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* 成熟胚为外植体, 筛选出外植体灭菌途径, 研究了基本培养基、生长调节剂等因子对其离体胚生长的影响。结果表明: 最优灭菌处理为 $25.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的次氯酸钠(NaClO)溶液真空灭菌 10 min, 其污染率仅为 6%, 出苗率可达 86%; 木本植物培养剂(WPM)为胚培养的最适基本培养基; 细胞激动素(KT) $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和玉米素(ZT) $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 最有效于不定芽的诱导, 不定芽为丛生芽; 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)和异戊烯基腺嘌呤(2iP)诱导不定芽较少; 噻苯隆(TDZ)不能诱导不定芽; 以萌动种胚为外植体对不定芽的诱导优于未萌动种胚。图 3 表 7 参 11

关键词: 森林培育学; 南方红豆杉; 胚培养; 植物生长调节剂; 不定芽

中图分类号: S723.1; Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2010)04-0614-06

Regeneration of *Taxus chinensis* var. *mairei* from adventitious bud formation using an in vitro embryo culture

ZENG Yu-li, LIN Xin-chun, GUI Ren-yi, ZHANG Cui-ping, HUANG Li-chun

(The Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: The effect of seed sterilization conditions, various basal media, and growth regulators on explants of mature *Taxus chinensis* var. *mairei* embryos were studied. Results showed optimal germination occurred with seeds soaked in a $25.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium hypochlorite solution for 10 min in a vacuum. The contamination rate was reduced to 6% and the germination rate reached 86%. A woody plant medium (WPM) was selected as the best basal medium with $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kinetin (KT) and $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ zeatin (ZT). This medium effectively induced more clusters of adventitious bud formation; whereas 6-benzylaminopurine (6-BA) and isopenlenyladenine (2iP) induced fewer adventitious buds while N-phenyl-N'-1, 2, 3-thidiazol-5-ylurea (TDZ) produced no adventitious bud differentiation. With WPM, germinated embryos effectively induced adventitious buds. [Ch, 3 fig. 7 tab. 11 ref.]

Key words: silviculture; *Taxus chinensis* var. *mairei*; embryo culture; plant growth regulators; adventitious buds

南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* 属国家一级濒危保护植物之一, 集材用、药用、观赏于一体, 经济价值极高。由于红豆杉属 *Taxus* 植物本身特殊的生物学特性, 种子在天然条件下, 需要两冬一夏才能萌发并且植株生长缓慢^[1], 常规育种难以保证市场的需要, 故通过离体胚培养技术克服红豆杉种子难以萌发的缺点, 以期加快植株生长。近年来, 国内外学者对短叶红豆杉 *Taxus brevifolia*, 欧洲红豆杉 *Taxus baccata*, 杂种红豆杉 *Taxus* × *media* var. *hicksii*, 东北红豆杉 *Taxus cuspidata* 等进行了离体胚培养研究^[2-3], 从不同角度证实离体胚的萌发、成苗与培养基、种子来源、培养条件等有密切

收稿日期: 2009-09-10; 修回日期: 2010-03-02

基金项目: 浙江省科学技术重点项目(2005C22067)

作者简介: 曾余力, 硕士, 从事植物组织培养研究。E-mail: zlyl456@163.com。通信作者: 黄丽春, 教授, 博士, 从事竹类、林木及其他经济植物生物技术研究。E-mail: bolch@gate.sinica.edu.tw

关系，但对南方红豆杉离体胚培养的研究较少，仅见臧新等^[4-5]对南方红豆杉离体胚萌发影响因素的研究。本研究在前人的研究基础上以南方红豆杉的成熟胚为外植体，筛选外植体灭菌途径，基本培养基、植物生长调节物质等因子对离体胚生长和分化不定芽的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料购自浙江省嵊州市常青花木场，于 4℃ 冰箱中冷藏备用。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体灭菌 选取均匀饱满的种子，剥去外种壳，流水冲洗 12 h，置于超净工作台内，分别置于 5.0, 10.0, 25.0 g·L⁻¹ 的次氯酸钠(NaClO)溶液中真空灭菌 5, 10, 15 min，无菌水分别冲洗 5 遍。最后在解剖显微镜下切除胚乳挑取种胚，接入 MS(Murashige and Skoog)培养基中，1 个种胚·管⁻¹，各接种 100 管。接种后先暗培养 2 d，然后再光培养。

1.2.2 不同基本培养基与植物生长调节物质对离体胚培养的影响 试验一，挑取种胚分别接种于 MS, 1/2MS, 1/3MS, 1/4MS, WPM(woody plant medium)和 B₅(Gamborg)等 6 种基本培养基中，测试基本培养基的影响；试验二，以 WPM 为基本培养基，测试不同种类和质量浓度的植物生长调节物质的影响：噻苯隆(TDZ)为 0, 0.000 1, 0.001 0, 0.010 0, 0.100 0 mg·L⁻¹，细胞激动素(KT)，6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)，异戊烯基腺嘌呤(2iP)和玉米素(ZT)为 0, 0.030 0, 0.300 0, 1.000 0, 3.000 0, 10.000 0 mg·L⁻¹。

1.2.3 种胚萌动对离体胚培养的影响 根据种胚大小、颜色分别选取萌动(长度为 0.7 ~ 0.8 cm，颜色转微黄色)和未萌动(长度为 0.4 ~ 0.5 cm，颜色白色)的种胚，测试不同发育时期对胚培养的影响。以 WPM 为基本培养基，附加 0, 0.010 0, 0.100 0, 1.000 0 mg·L⁻¹ 的 6-BA。以上试验培养条件：温度为 (25 ± 2)℃，光照度为 2 500 ~ 2 800 lx，光周期(昼/夜)16/8 h。对照组(ck)为 WPM 基本培养基。

1.2.4 驯化移栽 将带根的试管苗置于驯化室中，在强光(2 万 lx)下练苗 4 周，然后取出试管苗，冲净根部培养基，将植株移至泥炭：珍珠岩：蛭石为 1：1：1 的人工基质中。

1.3 统计分析

以上各试验设计 3 个重复，各试验的结果分析均采用生物统计法将平均值及其标准误差^[6]和 95% 的可信度进行差异显著性分析^[7]。

2 结果与分析

2.1 外植体灭菌

培养 28 d 后调查，结果见表 1。最优灭菌处理为 25.0 g·L⁻¹ 次氯酸钠溶液真空灭菌 10 min，其污染率仅 6%，出苗率达 86%。试验结果表明，随次氯酸钠质量浓度升高，污染率显著降低，而灭菌时间加长也能有效降低污染。由于南方红豆杉胚乳较厚，高质量浓度次氯酸钠浸泡不会损伤到离体胚的萌发生长，各处理的萌发率为 93% ~ 98%。

2.2 不同基本培养基与植物生长调节剂对离体胚培养的影响

2.2.1 不同基本培养基对离体胚培养的影响 将南方红豆杉离体种胚接于不同基本培养基中，培养 2 个月，MS 培养基中的胚，叶色淡绿，茎较长较粗，但根较短无侧根，根长约 2.0 cm。在不同 MS 质量浓度(1/3MS, 1/2MS, MS)培养基的胚，随无机盐质量浓度升高，芽长增长；在 1/3MS 中根长最长，根数最多。可能是南方红豆杉茎伸长生长需要高质量浓度的无机盐离子，根生长则以低质量浓度无机盐离子为宜，而茎叶和根的平衡生长则需要大量元素的协调配比。对应 MS 培养基，WPM 培养基中离体胚茎段细长，叶色深绿，并有许多侧根生成，根系好，主根长度达 3.8 cm，平均根数达 4.3 条，是南方红豆杉胚培养的最佳基本培养基；B₅ 培养基由于茎细弱，叶色发黄，不适于南方红豆杉的胚培养(图 1 ~ 3)。

2.2.2 不同植物生长调节物质对离体胚培养的影响 将离体种胚接种于含有不同质量浓度的 6-BA 的培养基中，50 d 调查结果如表 2。与对照组相比，6-BA 质量浓度递增时，离体胚抽出茎叶的长度递

表1 种子表面灭菌对离体种胚培养的影响

Table 1 Effect of factorial tests among various concentrations of NaClO vs. its durations on germination of excised embryos

编号	次氯酸钠质量浓度/(g·L ⁻¹)	灭菌时间/min	萌发率/%	出苗率/%	污染率/%
1	5.0	5	97 a (95.14 ~ 100.00)	53 g (42.76 ~ 63.05)	24 ab (16.02 ~ 33.57)
2	5.0	10	98 a (90.93 ~ 99.68)	47 h (36.94 ~ 57.24)	23 b (15.17 ~ 32.49)
3	5.0	15	94 a (85.49 ~ 97.86)	55 fg (44.73 ~ 64.97)	23 b (15.17 ~ 32.49)
4	10.0	5	96 a (88.61 ~ 99.16)	57 f (46.71 ~ 66.36)	26 a (17.74 ~ 35.73)
5	10.0	10	97 a (90.46 ~ 99.30)	60 e (49.72 ~ 69.67)	11 d (5.62 ~ 18.83)
6	10.0	15	96 a (89.68 ~ 99.24)	70 d (60.02 ~ 78.76)	18 c (11.03 ~ 26.95)
7	25.0	5	99 a (94.15 ~ 99.97)	77 c (67.51 ~ 84.83)	7 e (2.86 ~ 13.89)
8	25.0	10	98 a (92.52 ~ 99.74)	86 a (77.63 ~ 92.13)	6 e (2.23 ~ 12.60)
9	25.0	15	93 a (82.62 ~ 97.62)	80 b (70.82 ~ 87.33)	6 e (2.23 ~ 12.60)

说明: 小写字母标注不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。括号内数值表示 95% 的可信度。

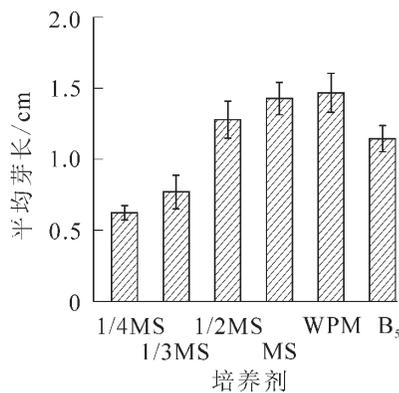


图1 不同基本培养基对芽体生长的影响

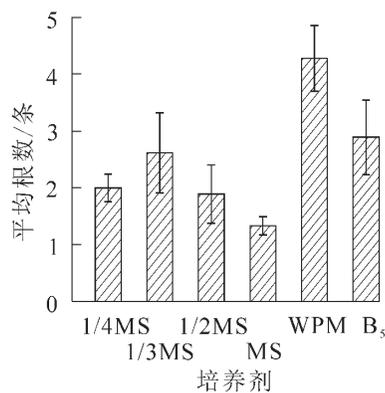
Figure 1 Effects of basal media on shoot growth of *Taxus chinensis* var. *mairei*

图2 不同基本培养基对根数的影响

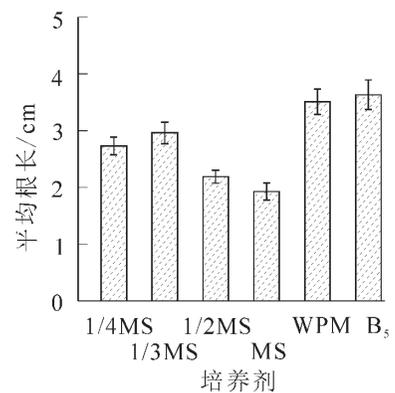
Figure 2 Effects of basal media on root number of *Taxus chinensis* var. *mairei*

图3 不同基本培养基对根生长的影响

Figure 3 Effect of basal media on root growth of *Taxus chinensis* var. *mairei*

降, 胚根长度变短甚至不萌发, 胚轴上有突起发生。在 6-BA 0.03 mg·L⁻¹ 时, 胚轴有突起形成, 少数有不定芽分化; 质量浓度增加至 0.10 mg·L⁻¹, 不定芽数量增加; 但 6-BA 质量浓度增高到 1.00 mg·L⁻¹ 时, 突起变少, 且突起不能分化为不定芽, 并随之褐化。将离体种胚接种于含有不同质量浓度的 KT

表2 6-BA 对种胚培养诱导不定芽分化的影响

Table 2 Effect of 6-BA on induction of adventitious buds by embryo culture

6-BA 处理/(mg·L ⁻¹)	接种数	不定芽诱导率/%	生长状况
0(ck)	20	0 b (0.00 ~ 16.84)	茎叶抽出, 叶色深绿, 胚根长, 多侧根
0.03	20	15 a (3.21 ~ 37.89)	茎叶抽出, 叶色深绿, 胚根短, 不定芽个数 1 ~ 2 个, 着生于胚轴
0.10	20	15 a (3.21 ~ 37.89)	茎叶抽出较矮, 叶色偏黄, 胚根短, 不定芽个数 3 ~ 5 个, 着生于胚轴
0.30	20	10 a (1.23 ~ 31.70)	无茎叶抽出, 无胚根, 胚轴有 1 ~ 2 个不定芽, 培养基褐化
1.00	20	0 b (0.00 ~ 16.84)	无茎叶抽出, 无胚根, 胚轴有少量突起, 培养基褐化
3.00	20	0 b (0.00 ~ 16.84)	胚肿胀, 颜色黄褐
10.00	20	0 b (0.00 ~ 16.84)	褐化愈合组织

说明: 小写字母标注不同表示差异显著 ($P < 0.05$); 括号内数值表示 95% 的可信度。

的培养基中，50 d 调查结果如表 3。由表 3 可知，0.10 mg·L⁻¹ KT 的培养基中离体胚无茎叶抽出和胚根伸长，但可见丛生不定芽的分化，诱导率达 30%。与 6-BA 相比，KT 更优于不定芽的分化，但对

表 3 KT 对种胚培养诱导不定芽分化的影响

Table 3 Effect of KT on induction of adventitious buds by embryo culture

KT 处理/(mg·L ⁻¹)	接种数	不定芽诱导率%	生长状况
0(ck)	20	0 c (0.00 ~ 16.84)	茎叶抽出,叶色深绿,胚根长,且有较多侧根
0.03	20	0 c (0.00 ~ 16.84)	茎叶抽出,胚根较长
0.10	20	30 a (11.89 ~ 54.28)	无茎叶抽出,胚根短,子叶处有丛生不定芽
0.30	20	10 b (1.23 ~ 31.70)	无茎叶抽出,无胚根,子叶处有丛生不定芽,胚轴肿胀突起
1.00	20	5 bc (0.13 ~ 24.87)	无茎叶抽出,无胚根,子叶处有丛生不定芽,胚轴肿胀
3.00	20	0 c (0.00 ~ 16.84)	无茎叶抽出,无胚根,胚轴开裂,培养基轻微褐化
10.00	20	0 c (0.00 ~ 16.84)	胚无生长,颜色褐色

说明：小写字母标注不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。括号内数值表示 95% 的可信度。

茎叶和胚根生长的抑制较明显；当 KT 质量浓度升高至 0.30 mg·L⁻¹ 时不定芽的诱导率降低，而且随 KT 质量浓度的升高，对胚根发育的抑制越强；当质量浓度提高至 10.00 mg·L⁻¹ 时，离体胚无生长、褐化。试验发现，接种于含 6-BA 的培养基中的离体胚仅在胚轴上有突起产生，分化少量不定芽，而接种于含 KT 培养基中的离体胚在胚轴、子叶和生长点均有不定芽的分化。将离体种胚接种于含不同浓度 ZT 的培养基中，50 d 调查结果如表 4。由表 4 可知，ZT 也能有效诱导不定芽的分化。当 ZT 的质量浓度在 0.10 ~ 1.00 mg·L⁻¹ 时，胚轴、生长点和子叶均有不定芽分化，且多为丛生芽，当 ZT 质量浓度为 1.00 mg·L⁻¹ 时诱导率高达 50%，与 KT 不同的是，ZT 对茎叶抽出抑制不明显，KT 质量浓度为 0.10 mg·L⁻¹ 时无茎叶抽出，而 ZT 的质量浓度为 1.00 mg·L⁻¹ 时仍有茎叶抽出，但节间较短，并且有轻微水化现象；当 ZT 升至 3.00 mg·L⁻¹ 时，水化更为明显。在含不同质量浓度 2ip 的培养基中，2ip 对

表 4 ZT 对种胚培养诱导不定芽分化的影响

Table 4 Effect of ZT on induction of adventitious buds by embryo culture

ZT 处理/(mg·L ⁻¹)	接种数	不定芽诱导率/%	生长状况
0(ck)	20	0 d (0.00 ~ 16.84)	茎叶抽出,叶色深绿,胚根长,且有较多侧根
0.03	20	0 d (0.00 ~ 16.84)	茎叶抽出,节间短,胚根短,胚轴褐色
0.10	20	10 c (1.23 ~ 31.70)	茎叶抽出,胚根短,胚轴有 2 ~ 3 个不定芽
0.30	20	20 b (5.73 ~ 43.66)	茎叶抽出,胚根短,子叶、胚轴有丛生不定芽
1.00	20	50 a (27.20 ~ 72.80)	茎叶抽出,无胚根,子叶、胚轴有丛生不定芽
3.00	20	0 d (0.00 ~ 16.84)	胚肿胀,有水化现象
10.00	20	0 d (0.00 ~ 16.84)	黄色愈合组织

说明：小写字母标注不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。括号内数值表示 95% 的可信度。

不定芽的诱导较 6-BA 强(表 5)，对南方红豆杉离体胚不定芽的诱导率最高，质量浓度为 0.30 mg·L⁻¹ 时，诱导率高达 70%，但仅有 1 ~ 2 个单芽·胚⁻¹，而 KT 和 ZT 的不定芽多为丛芽。对茎叶抽出抑制效果低于 6-BA，当质量浓度为 3.00 mg·L⁻¹ 茎叶仍有抽出，叶色较绿。添加 TDZ 的试验处理，都无不定芽分化。低质量浓度 TDZ 中试管苗生长与对照组相似，质量浓度高于 0.100 0 mg·L⁻¹，胚轴膨胀，试管苗有水化现象；当质量浓度增加到 1.000 0 mg·L⁻¹，种胚呈黄褐色愈合组织(表 6)。

2.3 种胚萌动对离体胚培养的影响

由表 7 可知，将萌动的种胚接种到含 0.10 ~ 1.00 mg·L⁻¹ 6-BA 的培养基上，离体胚分化出大量不

表5 2iP对种胚培养诱导不定芽分化的影响

Table 5 Effect of 2iP on induction of adventitious buds by embryo culture

2iP 处理/(mg·L ⁻¹)	接种数	不定芽诱导率/%	生长状况
0(ck)	20	0 c (0.00 ~ 16.84)	茎叶抽出,叶色深绿,胚根长,且有较多侧根
0.03	20	0 c (0.00 ~ 16.84)	茎叶抽出,叶色绿,胚根长
0.10	20	30 b (11.89 ~ 54.28)	茎叶抽出,叶色绿,胚根短,胚轴有1~2个不定芽
0.30	20	70 a (45.72 ~ 88.1)	茎叶抽出,叶色绿,胚根短,胚轴有1~2个不定芽
1.00	20	25 b (8.66 ~ 49.10)	茎叶抽出,胚根无,胚轴有1~2个不定芽
3.00	20	0 c (0.00 ~ 16.84)	茎叶抽出,胚根无,胚轴绿色膨胀
10.00	20	0 c (0.00 ~ 16.84)	黄褐色愈合组织

说明:小写字母标注不同表示差异显著($P<0.05$)。括号内数值表示95%的可信度。

表6 TDZ对种胚培养诱导不定芽分化的影响

Table 6 Effect of TDZ on induction of adventitious buds by embryo culture

TDZ 处理/(mg·L ⁻¹)	接种数	不定芽诱导率/%	生长状况
0(ck)	20	0 (0.00 ~ 16.84)	茎叶抽出,叶色深绿,胚根长,且有较多侧根
0.000 1	20	0 (0.00 ~ 16.84)	茎叶抽出,叶片舒展,胚根长淡黄色,有侧根
0.001 0	20	0 (0.00 ~ 16.84)	茎叶抽出较高,胚根长,无侧根
0.010 0	20	0 (0.00 ~ 16.84)	茎叶抽出,节间较短,胚根短
0.100 0	20	0 (0.00 ~ 16.84)	茎叶抽出,胚根短,胚轴膨胀水化
1.000 0	20	0 (0.00 ~ 16.84)	黄褐色愈合组织

说明:括号内数值表示95%的可信度。

表7 种胚萌动前后对胚培养的影响

Table 7 Effect of with or without breaking seed dormancy on germination of excised embryos

6-BA 处理/(mg·L ⁻¹)	接种数	未萌动	萌动
0(ck)	30	茎叶抽出,叶色淡绿,胚根长,多侧根,胚轴细	茎叶抽出,茎叶黄,胚根长,多侧根,胚轴粗
0.01	30	茎叶抽出,胚根短,胚轴有突起形成	茎叶抽出,叶片细,胚根短,胚轴表面褶皱
0.10	30	茎叶抽出,叶少,胚根短,有突起形成	子叶处抽出叶片,无胚根,胚轴膨大较松软不定芽多
1.00	30	无茎叶抽出,有少量突起,培养基褐化	无茎叶抽出,无胚根,胚轴褶皱不定芽较少
3.00	30	胚肿胀,颜色黄褐	胚轴变粗,胚轴褶皱,局部灰褐

定芽;而且随6-BA质量浓度增高,胚轴分化不定芽的数量呈现先升高后下降的趋势;但是将未萌动的种胚接种到相同的培养基中,仅在胚轴处产生突起,没有不定芽的分化。

2.4 驯化移栽

将试管苗置于模拟自然环境中,经1个月练苗驯化后,移至混合人工基质中,成活率达到90%。

3 结论与讨论

木本植物组织培养困难之一是建立无菌材料。在建立无菌材料时,外植体表面灭菌将影响试验成败。本研究采用25.0 g·L⁻¹次氯酸钠溶液真空灭菌10 min,污染率仅为6%,出苗率达86%。而且由于南方红豆杉胚乳较厚,高质量浓度的次氯酸钠溶液不会伤害到内部的胚,对其萌发无影响。试验还发现南方红豆杉种胚在MS培养基上能够较好的萌发生长,萌发率在95%左右,而陈永勤等^[8]曾报道红豆杉在MS培养基上的萌发较差,这与本研究结果不一致。

臧新等^[5]对 MS 和 B₅ 等培养基进行研究, 认为这几种培养基对南方红豆杉的离体胚培养影响差别不大, 而我们在研究中发现不同基本培养基对离体胚培养影响较大。WPM 培养基能促进根系产生和茎叶生长, 是南方红豆杉离体种胚培养最适宜的基本培养基。MS 培养基对南方红豆杉茎段生长亦较佳, 但不利其根系的生长。B₅ 培养基也不适于南方红豆杉的胚培养。

在不同细胞分裂素对离体种胚培养的影响试验中发现, 不加细胞分裂素时试管苗生长最好, 添加细胞分裂素不利于种胚的伸长生长, 但可诱导不定芽的产生且不需经过愈合组织而直接分化产生不定芽, 其中 KT 和 ZT 最适于南方红豆杉的不定芽诱导。对于大多数树种, 诱导不定芽时, 外植体需接种在细胞分裂素与生长素配比的培养基中, 但在许多针叶树培养中, 单独使用细胞分裂素, 足以诱导不定芽发生^[9-10], 这与本试验研究结果相一致。

萌动后的南方红豆杉种子具有较强的生长势和生理活性, 而且此时内源激素含量高于其他时期, 而未萌动的种子中发芽抑制物的含量较高^[11], 抑制种子的萌发生长。南方红豆杉种胚萌动对胚培养的影响, 试验得知以萌动后的种胚为外植体更容易诱导出不定芽, 这可能与南方红豆杉种胚内源激素随种胚成熟度而发生变化有关。

参考文献:

- [1] 程广有, 唐晓杰, 高红兵, 等. 东北红豆杉种子休眠机理与解除技术探讨[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26 (1): 5 - 10.
CHENG Guangyou, TANG Xiaojie, GAO Hongbing, *et al.* Dormancy mechanism and relieving techniques of seeds of *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. [J]. *J Beijing For Univ*, 2004, 26 (1): 5 - 10.
- [2] 陈永勤, 朱蔚华. 红豆杉属植物的组织、细胞及胚培养[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33 (3): 213 - 219.
CHEN Yongqin, ZHU Weihua. Tissue, cell and embryo culture of *Taxus* [J]. *Plant Physiol Commun*, 1997, 33 (3): 213 - 219.
- [3] 王水, 贾勇炯, 魏峰, 等. 云南红豆杉的组织培养及植株再生[J]. 云南植物研究, 1997, 19 (4): 407 - 410.
WANG Shui, JIA Yongjiong, WEI Feng, *et al.* Tissue culture and plant regeneration of *Taxus yunnanensis* [J]. *Acta Bot Yunnan*, 1997, 19 (4): 407 - 410.
- [4] 臧新, 吕晓辉, 杨冬之, 等. 激素对 2 种红豆杉离体胚培养的影响[J]. 华中农业大学学报: 自然科学版, 2006, 25 (3): 310 - 312.
ZANG Xin, LÜ Xiaohui, YANG Dongzhi, *et al.* Effects of hormones on the embryo culture of two *Taxus species in vitro* [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 2006, 25 (3): 310 - 312.
- [5] 臧新, 吕晓辉, 杨冬之, 等. 2 种红豆杉的离体胚培养[J]. 郑州大学学报: 理学版, 2006, 38 (2): 107 - 112.
ZANG Xin, LÜ Xiaohui, YANG Dongzhi, *et al.* The embryo culture in vitro of two *Taxus species* [J]. *J Zhengzhou Univ Nat Sci Ed*, 2006, 38 (2): 107 - 112.
- [6] COLQUHOUN D. *Lectures on Biostatistics* [M]. Oxford: Clarendon Press, 1971.
- [7] SNEDECOR G W. *Statistical Methods* [M]. 4th Ed. Iowa: Iowa State College Press, 1946.
- [8] 陈永勤, 戴均贵, 朱蔚华. 红豆杉成熟胚的离体培养[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34 (3): 191 - 193.
CHEN Yongqin, DAI Jungui, ZHU Weihua. *In vitro* culture of mature embryos of *Taxus chinensis* [J]. *Plant Physiol Commun*, 1998, 34 (3): 191 - 193.
- [9] 成小飞, 花晓梅, 李文钿. 马尾松离体培养条件下的微繁殖和菌根的形成[J]. 林业科学研究, 1995, 8 (3): 241 - 246.
CHENG Xiaofei, HUA Xiaomei, LI Wendian. Micropropagation and mycorrhizae formation of *Pinus massoniana* Lamb. *in vitro* [J]. *For Res*, 1995, 8 (3): 241 - 246.
- [10] AITEKEN J, HORGAN K J, THORPE T A. Influence of explant selection on the shoot forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata* [J]. *Can J For Res*, 1981, 11 (1): 112 - 117.
- [11] 张艳杰, 高捍东, 鲁顺保. 南方红豆杉种子中发芽抑制物的研究 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, 31 (4): 52 - 56.
ZHANG Yanjie, GAO Handong, LU Shunbao. Germination inhibitors in methanol extract from *Taxus chinensis var. mairei* seed [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2007, 31 (4): 52 - 56.