

# 马兜铃不含腋芽茎段不定芽的诱导

宋运贤<sup>1,2,3</sup>, 张强<sup>1,2</sup>, 杜雪玲<sup>1,2</sup>, 彭贺<sup>1</sup>, 唐润<sup>1</sup>, 张园园<sup>1</sup>, 陈耀锋<sup>3\*</sup>

(1. 淮北师范大学生命科学学院, 安徽 淮北 235000; 2. 资源植物生物学安徽省重点实验室, 安徽 淮北 235000; 3. 西北农林科技大学农学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 为建立马兜铃(*Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc)不含腋芽茎段的不定芽诱导体系, 采用正交设计方法研究植物生长调节剂、预培养方式和 AgNO<sub>3</sub> 对不定芽诱导的影响。结果表明: 植物生长调节物质对不定芽诱导的影响以 TDZ > 6-BA > IAA, 其中 TDZ 的影响极显著( $P < 0.01$ ), 6-BA 的影响显著( $P < 0.05$ )。不定芽诱导的最适培养基为 MS + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0.1 mg L<sup>-1</sup> IAA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> 6-BA + 2 mg L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> + 3% 蔗糖 + 0.6% 琼脂(pH 5.8); 预培养方式为在 MS + 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 3% 蔗糖 + 0.6% 琼脂培养基上暗培养 2 d。马兜铃不含腋芽茎段的不定芽诱导率最高可达 37.5%。

**关键词:** 马兜铃; 茎段; TDZ; 不定芽诱导; AgNO<sub>3</sub>

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.04.012

## Induction of Adventitious Buds from Stems without Axillary Bud of *Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc

SONG Yun-xian<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Qiang<sup>1,2</sup>, DU Xue-ling<sup>1,2</sup>, PENG He<sup>1</sup>, TANG Run<sup>1</sup>, ZHANG Yuan-yuan<sup>1</sup>, CHEN Yao-feng<sup>3\*</sup>

(1. College of Life Science, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China; 2. Anhui Key Laboratory of Plant Resources and Biology, Huaibei 235000, China; 3. College of Agronomy, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** In order to establish adventitious bud induction system from stem segments without axillary bud of *Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc, the effects of plant growth regulators, pre-culture pattern and AgNO<sub>3</sub> on the induction rate were studied by using orthogonal design method. The results showed that the effects of plant growth regulators on adventitious bud reduction from stems were in the order of TDZ > 6-BA > IAA, in which TDZ and 6-BA had significant influence at 0.01 and 0.05 levels, respectively. The optimum medium for adventitious bud induction was MS + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0.1 mg L<sup>-1</sup> IAA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> 6-BA + 2.0 mg L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> + 3% sucrose + 0.6% agar (pH 5.8). After the explants were pre-cultured on MS + 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 3% sucrose + 0.6% agar (pH 5.8) in dark for 2 days, and then transferred on adventitious bud induction medium, the rate of adventitious bud induction could reach to 37.5%.

**Key words:** *Aristolochia debilis*; Stem; TDZ; Adventitious bud induction; AgNO<sub>3</sub>

马兜铃(*Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc)为马兜铃科(Aristolochiaceae)马兜铃属植物, 其果实和根有重要的药用价值, 果实的药材名是马兜铃, 为

清肺镇咳化痰药; 茎的药材名为天仙藤, 能祛风活血; 根的药材名为青木香, 有解毒、利尿、理气止痛的功效; 故马兜铃又名青木香、天仙藤等<sup>[1]</sup>。然而,

收稿日期: 2013-11-18 接受日期: 2014-01-03

基金项目: 国家转基因生物新品种培育项目(2009ZX08002008B); 安徽省教育厅重点项目(KJ2013A232); 资源植物生物学安徽省重点实验室项目(ZYZWSW2014009, ZYZWSW2014004)资助

作者简介: 宋运贤(1976~), 男, 硕士, 副教授, 研究方向为农业生物技术。E-mail: songyunxian@aliyun.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: chenyf3828@126.com

临床上出现的马兜铃酸肾毒性现象和潜在的致癌作用引起了国际医药界的高度重视,因此,国家食品药品监督管理局于2004年8月取消了青木香药用标准,凡国家药品标准处方中含有青木香的中成药品种应替换为土木香<sup>[2-3]</sup>。但是,有研究表明,土木香在植物来源、亲缘关系、功效主治、化学成分、药理作用和临床应用等方面与青木香有很大差异,因此,二者不应相互替代<sup>[4]</sup>。

在明确马兜铃酸药效和作用机理的基础上运用现代基因工程手段对其进行定点改造,以消除其肾毒性是解决这一问题的有效途径。而建立高频率的离体再生体系是遗传转化获得成功的前提和基础。目前,国内外对马兜铃的研究主要集中于成分分析、药理作用、肾毒性作用、栽培措施、快速繁殖等方面<sup>[3-10]</sup>,对再生体系的研究报道主要通过愈伤组织阶段的再生<sup>[11-12]</sup>,而无腋芽茎段直接诱导不定芽再生植株还未见报道。本文以马兜铃不含腋芽的茎段为材料,通过研究不同植物生长调节剂的配比和不同预处理方式对不定芽诱导的影响,以期建立高效的马兜铃茎段再生体系,为开展马兜铃遗传转化的研究奠定技术基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

马兜铃无菌组培苗经西北农林科技大学农学

院陈耀锋教授鉴定为马兜铃科马兜铃属马兜铃(*Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc)。选取大小基本一致的马兜铃组培苗,切取两腋芽之间的无腋芽茎段,修剪成1 cm左右的长度,横放接种于培养基中。

### 1.2 植物生长调节剂的影响

采用 $L_9(3^4)$ 正交设计,研究6-BA、IAA和TDZ对马兜铃茎段不定芽诱导的影响(表1)。以MS为基本培养基,所有培养基均含 $30\text{ g L}^{-1}$ 蔗糖和 $6\text{ g L}^{-1}$ 琼脂,pH调至5.8。

### 1.3 $\text{AgNO}_3$ 的影响

以 $\text{MS} + 0.5\text{ mg L}^{-1}\text{ 6-BA} + 0.1\text{ mg L}^{-1}\text{ IAA} + 0.5\text{ mg L}^{-1}\text{ TDZ} + 3\%\text{ 蔗糖} + 0.6\%\text{ 琼脂}$ 为不定芽诱导培养基,分别添加0.5、2.0、5.0、10.0和20.0  $\text{mg L}^{-1}$ 的 $\text{AgNO}_3$ 。

### 1.4 预培养方式的影响

采用双因素设计研究2,4-D和黑暗预培养时间对马兜铃不含腋芽茎段不定芽诱导的影响。茎段预培养以MS为基本培养基,2,4-D设置0、0.1、0.5、1.0和2.0  $\text{mg L}^{-1}$ 共5个水平;黑暗预培养时间设置0、2、4、6和8 d。诱导培养基为 $\text{MS} + 0.5\text{ mg L}^{-1}\text{ 6-BA} + 0.1\text{ mg L}^{-1}\text{ IAA} + 0.5\text{ mg L}^{-1}\text{ TDZ} + 3\%\text{ 蔗糖} + 0.6\%\text{ 琼脂}$ ,pH 5.8。

表1 植物生长调节剂对不定芽诱导的影响

Table 1 Effects of plant growth regulators on adventitious bud induction

	6-BA ( $\text{mg L}^{-1}$ )	IAA ( $\text{mg L}^{-1}$ )	TDZ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	外植体数 Number of explants	诱导不定芽数 Number of adventitious buds induced	不定芽诱导率 Rate of adventitious bud (%)
1	0.5	0.1	0.5	100	22	22.00±0.54
2	0.5	0.5	1.0	104	4	3.85±0.32
3	0.5	1.0	1.5	78	6	7.69±0.75
4	1.5	0.1	1.0	96	4	4.17±0.43
5	1.5	0.5	1.5	110	2	1.82±1.28
6	1.5	1.0	0.5	116	22	18.97±0.59
7	2.5	0.1	1.5	94	2	2.13±1.46
8	2.5	0.5	0.5	108	10	9.26±0.15
9	2.5	1.0	1.0	144	2	1.39±0.93
$K_1$	11.18a	9.43a	16.74a			
$K_2$	8.32a	4.98a	3.13b			
$K_3$	4.26b	9.35a	3.88b			
R	6.92	4.46	13.61			

以上各种处理均重复3次,培养温度为(25±2)℃,光照强度为25 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>,光照时间14 h d<sup>-1</sup>。

### 1.5 数据处理和统计

培养35 d后统计不定芽诱导率。不定芽诱导率=诱导不定芽的茎段数/接种的茎段数×100%。运用SPSS对试验数据进行方差分析,多重比较采用LSD法。

## 2 结果和分析

### 2.1 植物生长调节剂的影响

将马兜铃不带腋芽的茎段接种在诱导培养基上,培养5 d后茎段的两端开始膨大,9 d后在茎段伤口处开始有愈伤组织长出,15 d时愈伤组织继续长大并开始变绿,25 d后茎段上开始分化出不定芽。由表1可知,植物生长调节剂对马兜铃不含腋芽茎段的不定芽诱导率的影响以TDZ > 6-BA > IAA;且在6-BA (0.5 mg L<sup>-1</sup>)、IAA (0.1 mg L<sup>-1</sup>)、TDZ (0.5 mg L<sup>-1</sup>)的配比下,不定芽的诱导率达22.0%。方差分析(表2)表明:TDZ对马兜铃不含腋

芽茎段的不定芽诱导率有极显著影响( $P < 0.01$ ),6-BA有显著影响( $P < 0.05$ ),而IAA无显著影响( $P > 0.05$ )。

综上分析,马兜铃不含腋芽茎段的不定芽诱导的最适培养基为MS + 0.5 mg L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg L<sup>-1</sup> IAA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ, pH调至5.8。

### 2.2 AgNO<sub>3</sub>的影响

由表3可知,在培养基中添加不同浓度的AgNO<sub>3</sub>,马兜铃不含腋芽茎段的不定芽诱导率不同。添加2.0 mg L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>的不定芽诱导率达到最大,为28.72%,而不添加AgNO<sub>3</sub>的不定芽诱导率仅为14.29%,两者之间的差异显著。随着AgNO<sub>3</sub>浓度的增加,马兜铃茎段诱导的愈伤组织也逐渐减少,在添加20.0 mg L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>培养基中,马兜铃茎段几乎不能诱导出愈伤组织,也几乎不能诱导出不定芽。

### 2.3 预培养的影响

将马兜铃不含腋芽茎段先接种在含不同浓度的2,4-D培养基上,并在黑暗下预培养一定时间。结果表明,预培养基中添加0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D有

表2 植物生长调节剂对不定芽诱导的方差分析

Table 2 Variance analysis of plant growth regulators on adventitious bud induction

因素 Factor	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	均方 Mean squares	F	P
6-BA	2	72.55	36.275	20.75	0.046*
IAA	2	38.995	19.497	11.15	0.082
TDZ	2	351.159	175.580	100.44	0.010**
误差 Error	2	3.496	1.748		
合计 Total	8	466.200			

表3 AgNO<sub>3</sub>对马兜铃不定芽诱导的影响

Table 3 Effect of AgNO<sub>3</sub> on adventitious bud induction of *Aristolochia debilis*

AgNO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	接种外植体数 Number of explants	诱导的不定芽数 Number of adventitious bud induced	不定芽诱导率(%) Rate of adventitious bud induction
0	98	14	14.29±0.46C
0.5	104	18	17.31±2.39B
2.0	94	27	28.72±0.77A
5.0	100	8	8.00±0.84D
10.0	90	4	4.44±0.66E
20.0	120	1	0.83±0.72F

数据后不同大写字母表示差异极显著(采用LSD法,  $\alpha = 0.01$ )。

Data followed different capital letters indicate significant differences at 0.01 level by LSD test.

利于不定芽的诱导(表 4, 图 1), 较高浓度的 2,4-D ( $1\sim 2\text{ mg L}^{-1}$ ) 会抑制不定芽的诱导, 与对照差异显著, 甚至部分茎段还分化出不定根(图 1)。黑暗预

培养时间以 2 d 为宜, 时间延长使不定芽诱导率呈下降趋势。马兜铃不含腋芽茎段在添加  $0.1\text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 培养基上黑暗预培养 2 d, 不定芽诱导率可达

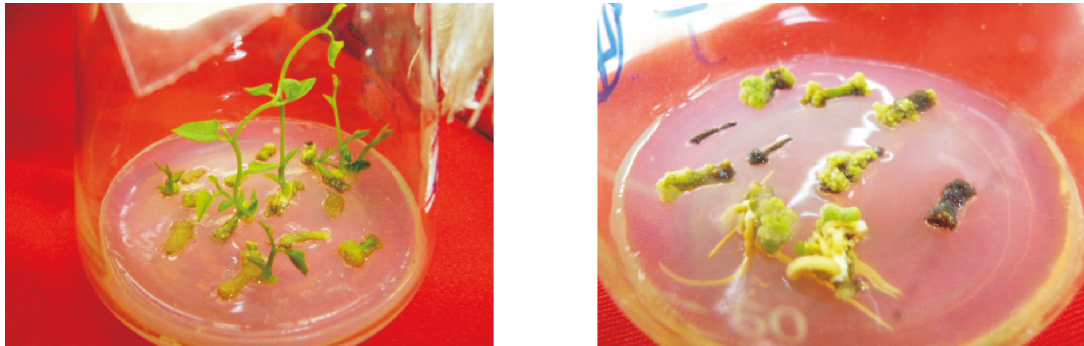


图 1 预培养对不定芽诱导的影响。A: 2,4-D  $0.1\text{ mg L}^{-1}$ , 预培养 2 d; B: 2,4-D  $1\text{ mg L}^{-1}$ , 预培养 8 d。

Fig. 1 Effect of pre-culture on adventitious bud induction. A: Pre-cultured for 2 days with  $0.1\text{ mg L}^{-1}$  2,4-D; B: Pre-cultured for 8 days with  $1\text{ mg L}^{-1}$  2,4-D.

表 4 2,4-D 和黑暗预培养时间对马兜铃不定芽诱导的影响

Table 4 Effects of 2,4-D and pre-culture in dark on adventitious bud induction of *Aristolochia debilis*

2,4-D ( $\text{mg L}^{-1}$ )	黑暗预培养时间 Pre-culture days in dark	接种外植体数 Number of explants	诱导的不定芽数 Number of adventitious buds induced	不定芽诱导率 (%) Rate of adventitious bud induction
0	0	107	11	10.28±1.50
	2	107	17	15.89±1.37
	4	101	18	17.82±0.82
	6	109	17	15.60±1.49
	8	96	7	7.29±1.58
0.1	0	105	10	9.52±1.65
	2	104	39	37.50±2.37
	4	108	22	20.37±1.60
	6	99	18	18.18±0.55
	8	100	12	12.00±0.21
0.5	0	101	11	10.89±1.54
	2	104	22	21.15±1.51
	4	104	12	11.54±0.19
	6	102	12	11.76±0.35
	8	114	6	5.26±0.14
1.0	0	108	10	9.26±1.60
	2	105	18	17.14±0.49
	4	100	7	7.00±1.60
	6	114	7	6.14±1.52
	8	100	0	0.00±0.00
2.0	0	102	11	10.78±1.46
	2	100	11	11.00±1.66
	4	122	4	3.28±0.99
	6	104	3	2.88±0.05
	8	110	0	0.00±0.00

表5 2,4-D 和黑暗预培养时间对马兜铃不定芽诱导的多重比较

Table 5 Multiple comparison of 2,4-D and pre-culture in dark on adventitious bud induction of *Aristolochia debilis*

2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	不定芽诱导率 (%) Rate of adventitious bud induction	黑暗预培养时间 Pre-culture days in dark	不定芽诱导率 (%) Rate of adventitious bud induction
0	13.36±4.26b	0	10.13±1.47b
0.1	19.49±10.24a	2	20.49±9.49a
0.5	11.72±5.35b	4	12.00±6.73b
1.0	7.86±5.84c	6	10.90±5.94b
2.0	5.57±4.71c	8	4.48±4.76c

同列数据后不同小写字母表示差异显著(采用 LSD 法,  $\alpha=0.05$ )。

Data followed different small letters within column indicate significant differences at 0.05 level by LSD test.

37.5%。方差分析结果表明, 2,4-D 和黑暗预培养时间对马兜铃不含腋芽茎段不定芽诱导率有极显著影响( $P<0.01$ )。多重比较(表 5)的结果表明, 预培养基中添加 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 与对照的差异显著, 黑暗预培养 2 d 与对照的差异显著。

### 3 讨论

建立高效的组织培养再生体系是利用遗传转化技术获得转基因植株的重要前提之一。近年来, 有关植物遗传转化的研究报道所采用的再生体系主要有原生质体再生<sup>[13]</sup>、体细胞胚发生<sup>[14]</sup>、愈伤组织再生<sup>[10-12]</sup>和再生苗茎段、叶的器官直接发生等<sup>[15-16]</sup>, 其中通过植株的器官直接发生的途径, 较前几种再生系统具有周期短、操作简便、培养过程中发生的变异少的特点, 是采用最多的再生系统。迄今为止, 建立的马兜铃再生体系多以愈伤组织为主<sup>[10-12]</sup>, 由愈伤组织再生植株过程中发生无性系变异的可能性较大, 转化的外源基因稳定性较差。另外由于马兜铃叶片较小, 取出培养瓶后易脱水卷曲, 不易切割培养。本试验以不含腋芽的茎段为材料建立再生体系, 具有操作简便、周期短、嵌合体相对较低、遗传稳定性高等优点。通过初步探索, 目前已初步建立了较为高效的再生体系, 为后续进一步优化建立转基因受体系统打下了良好的基础。

TDZ 是一种新型的植物生长调节剂, 具有很强的细胞分裂素活性, 可以促进植物不定芽的再生和繁殖、打破芽的休眠、延缓植物衰老等<sup>[17]</sup>。TDZ 可通过抑制叶片的脂质过氧化作用来保护细胞膜结构的完整性、阻止叶片叶绿素的降解、延缓离体叶片和茎段的衰老、抑制 POD 活性, 从而提高再生效率<sup>[18]</sup>。但高浓度的 TDZ 容易导致试管苗的变形、

坏死、褐变, 从而不利于芽或根的发生<sup>[19]</sup>。崔波等<sup>[15]</sup>的研究表明, TDZ 在火龙果(*Hylocereus undulatus*) 茎段再生过程中起着重要的作用, 0.4 mg L<sup>-1</sup> TDZ 有利于植株的再生。黄芩(*Scutellaria baicalensis*) 茎段的诱导研究也表明, TDZ 诱导不定芽的能力优于其它植物生长调节剂。本研究结果也表明, TDZ 是促进马兜铃不含腋芽茎段不定芽诱导的主要因子, 较低浓度对不定芽的诱导有很好的促进作用, 随着浓度的升高, 不定芽诱导率迅速下降。Heutteman 等<sup>[20]</sup>的研究表明, 高浓度的 TDZ 促进了木本植物愈伤组织的形成。本研究结果也表明, 高浓度的 TDZ 会导致茎段切口边缘部位产生较多的愈伤组织, 进而降低了不定芽的诱导率。

外植体切口部位的细胞会产生大量自身保护物质乙烯。有研究指出, 在组织培养中外植体产生的高含量乙烯会引起外植体褐化死亡和植株畸形发育; Beyer 认为 Ag<sup>+</sup> 是一种较好的乙烯活性抑制剂<sup>[21]</sup>, 对许多单子叶和双子叶植物离体形态发生有促进作用, 可以使植株再生率显著提高。Radke<sup>[22]</sup>等报道, 分化培养基中添加 AgNO<sub>3</sub>, 可以促进芽原基的产生和伸长。但 Neidz 等<sup>[23]</sup>认为 AgNO<sub>3</sub> 在子叶植株再生中并无促进作用。Laurie<sup>[24]</sup>等在研究茛青子叶再生中认为低浓度 AgNO<sub>3</sub> (5.9~29.4 μmol L<sup>-1</sup>) 利于子叶再生, 高浓度(>117.7 μmol L<sup>-1</sup>) 起到明显的抑制作用<sup>[24]</sup>。本研究结果也表明: 适宜浓度的 AgNO<sub>3</sub> 对马兜铃茎段不定芽诱导有促进作用, 与对照相比, 外植体褐化现象减轻, 当添加 2 mg L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> 时, 不定芽诱导率达到最大, 而 AgNO<sub>3</sub> 浓度高于 5 mg L<sup>-1</sup> 对马兜铃不含腋芽茎段不定芽诱导有抑制作用。

牛建新等<sup>[25]</sup>指出, 组织培养过程中暗培养可以促进不定芽的高效诱导, 这可能是由于 IAA 在光下

的分解减少,从而相对提高了 IAA 浓度,进而刺激了不定芽的产生。有学者认为葡萄再生需要一个暗处理过程,时间为 1~4 周<sup>[26]</sup>。本试验结果也表明,适当的暗培养有助于诱导不定芽形成,最佳暗培养时间为 2 d,这比其他的研究结果偏短,可能是由于物种的差异造成的。至于暗培养促进不定芽诱导的机理还有待进一步研究。

已有研究表明,2,4-D 预培养可以显著提高不定芽的诱导率,白菜型油菜(*Brassica campestris*) 在添加 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 培养基上预培养 3 d,再生率由 43.5% 提高到 89.0%<sup>[27]</sup>。芜菁(*Brassica rapa ssp. rapifera*) 在 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 的分化培养基上预培养 2 d,可将不定芽再生率由 81.2% 提高到 92.0%<sup>[28]</sup>。但李文静等<sup>[29]</sup>指出,较高的 2,4-D 浓度会抑制植株再生能力。本研究结果表明,预培养基中添加 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 可以促进马兜铃不含腋芽茎段诱导不定芽,但 2,4-D 浓度达 1~2 mg L<sup>-1</sup> 时,不定芽诱导率明显降低,同时生根明显增加,这与前人的研究结果一致。研究结果还表明,在高浓度 2,4-D 和短时间黑暗预培养,容易诱导出不定芽;相同条件下预培养时间长则容易诱导出不定根(图 1),这为我们后继试验中利用差异克隆方法去克隆芽、根诱导相关基因打下了基础,这也是我们下一步研究的方向。

## 参考文献

- [1] Zhao G P, Dai S, Chen R S. Dictionary of Chinese Material Medicine [M]. Shanghai: Shanghai Science & Technology Press, 2008: 131-139.  
赵国平,戴慎,陈仁寿. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008: 131-139.
- [2] Cen X N. Discussion on medicinal standards of containing aristolochic acid medicine canceled [J]. Liuzhou Med, 2008, 21(4): 201-203.  
岑显娜. 对含马兜铃酸类中药被取消药用标准的讨论 [J]. 柳州医学, 2008, 21(4): 201-203.
- [3] Qiao H X, Liu Y Y, Wu L M, et al. Nephrotoxicity of Radix Aristolochice and its substitution material Radix Inulae in rats [J]. Chin J Chin Mat Med, 2007, 32(19): 2048-2051.  
乔洪翔,刘永晔,吴理茂,等. 青木香与其替代药材土木香对大鼠肾毒性的研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(19): 2048-2051.
- [4] Gao W D, Li W M, Gao Y, et al. Can radix inulae replace radix Aristolochiae as medicinal material? [J] China Pharm, 2006, 17(7): 556-557.  
高卫东,李卫民,高英,等. 土木香能否代替青木香用药的探讨? [J]. 中国药房, 2006, 17(7): 556-557.
- [5] Sun R, Zhang L L, Luo Z W, et al. Overview of utilization value and cultivation technique of the medicinal plants *Aristolochia contorta* Bunge [J]. J Anhui Agri Sci, 2011, 39(24): 14620-14621.  
孙睿,张丽丽,罗志文,等. 药用植物北马兜铃的开发利用价值与栽培技术概述 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(24): 14620-14621.
- [6] Shao H, Sun R, Zhang L M, et al. Study on the technique of tissue culture and rapid propagation of *Aristolochia contorta* Bunge [J]. North Hort, 2012, 16(18): 128-130.  
邵红,孙睿,张丽敏,等. 北马兜铃组培快繁技术 [J]. 北方园艺, 2012, 16(18): 128-130.
- [7] Gu D Z, Cong X L, Song L L, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Aristolochia manshuriensis* Kom [J]. Plant Physiol Commun, 2008, 44(1): 136.  
顾地周,丛小力,宋丽利,等. 木通马兜铃的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(1): 136.
- [8] Su W P, Zhang M H, Li P. Tissue culture and rapid propagation of *Aristolochia elegans* Mast. [J]. Guangxi Trop Agri, 2008, 26(1): 13-14.  
苏文潘,张美华,黎萍. 美丽马兜铃的组织培养和快速繁殖 [J]. 广西热带农业, 2008, 26(1): 13-14.
- [9] He W J, He J W, Li Y, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Aristolochia delavayi* Franch [J]. Plant Physiol Commun, 2010, 46(12): 1273-1274.  
和文佳,和加卫,李燕,等. 贯叶马兜铃的组织培养与快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(12): 1273-1274.
- [10] He C X, Ma G H, Jian S G, et al. Tissue culture and plant regeneration of *Aristolochia labiata* Willd [J]. Plant Physiol Commun, 2008, 44(3): 525-526.  
何长信,马国华,简曙光,等. 公鸡花的组织培养与植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(3): 525-526.
- [11] Yang X Q, Zeng Q P. Tissue culture and plant regeneration of *Aristolochia contorta* Bunge [J]. J Guangzhou Univ Trad Chin Med, 2006, 23(1): 65-68.  
杨雪芹,曾庆平. 马兜铃的组织培养与植株再生 [J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(1): 65-68.
- [12] Zan Q, Yang Z F, Jiang L, et al. Establishment of regeneration system of *Aristolochia contorta* [J]. Agri Techn, 2009, 29(6): 40-45.  
管琦,杨兆菲,姜璐,等. 北马兜铃再生系建立的研究 [J]. 农业与技术, 2009, 29(6): 40-45.
- [13] Zhang Q. Establishment of *Citrus* protoplast transient expression systems and creation of *GFP* transgenic Murcott Tangor germplasm [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009: 1-62.  
张倩. 柑橘原生质体瞬时表达体系的建立及默科特橘橙转 *GFP* 种质的创造 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009: 1-62.
- [14] Zeng Y L, Zhang L, Tan Y D, et al. Somatic embryogenesis of *Caesalpinia decapetala* leaves and regeneration [J]. J CS Univ

- For Techn, 2012, 32(2): 89–94.  
曾艳玲, 张琳, 谭运德, 等. 云实叶片体细胞胚发生及植株再生 [J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(2): 89–94.
- [15] Cui B, Wu S, Jiang S H, et al. Establishment of regeneration system on stems of *Hylocereus undulatus* cv. vietnam [J]. North Hort, 2011, 35(8): 146–147.  
崔波, 武思, 蒋素华, 等. 火龙果茎段再生体系的建立 [J]. 北方园艺, 2011, 35(8): 146–147.
- [16] Wu X H, Zhang Y L, Zhou Y, et al. Establishment of high frequency and direct regeneration system from leaf of ‘Hayward’ Kiwifruit *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang et A. R. Ferguson [J]. Acta Phytophysiol Sin, 2013, 49(8): 759–763.  
吴秀华, 张艳玲, 周月. ‘海沃德’猕猴桃叶片高频直接再生体系的建立 [J]. 植物生理学报, 2013, 49(8): 759–763.
- [17] Murthy B N S, Murch S J, Praveen K S. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis [J]. *In vitro* Cell Dev Biol-Plant, 1998, 34(4): 267–275.
- [18] Fan C J, Zeng B S, Qiu Z F, et al. *In vitro* culture and plant regeneration from the seedling leaves and stems of *Eucalyptus urophylla* × *E. camaldulensis* clone DH201-2 [J]. J Fujian Coll For, 2009, 29(1): 74–78.  
范春节, 曾炳山, 裘珍飞, 等. 尾赤桉叶片及茎段的离体培养与植株再生 [J]. 福建林学院学报, 2009, 29(1): 74–78.
- [19] Zhihui S, Tzitzikas M, Raemakers K, et al. Effect of TDZ on plant regeneration from mature seeds in pea (*Pisum sativum*) [J]. *In vitro* Cell Dev Biol-Plant, 2009, 45(6): 776–782.
- [20] Heutteman C A, Preece J E. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1993, 33(2): 105–119.
- [21] Beyer E M. Silver ion: a potent anti-ethylene agent in cucumber and tomato [J]. Hort Sci, 1976, 11(2): 195–196.
- [22] Radke S E, Turner J C, Facciotti D. Transformation and regeneration of *Brassica napus* using *Agrobacterium-tumefaciens* [J]. Plant Cell Rep, 1992, 11(3): 499–505.
- [23] Neidz R P, Smith S S, Dunbar K B, et al. Factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1989, 18(3): 313–319.
- [24] Laurie B, Maryanne A, Stephen Y, et al. Enhancement of shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica rapa* ssp. *oleifera* through pretreatment with auxin and cytokinin and use of ethylene inhibitors [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1994, 37(3): 253–256.
- [25] Niu J X, Lu X Y, Yu Y H. Effects of explant and cultural factors on the induction of indefinite bud of strawberry [J]. North Hort, 1999, 23(3): 30–31.  
牛建新, 鲁晓燕, 于艳华. 外植体和培养因子对草莓不定芽诱导的影响 [J]. 北方园艺, 1999, 23(3): 30–31.
- [26] Torregrosa L, Bouquet A, Goussard P G. Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine [M]. Netherland: Kluwer Academic Pub., 2001: 281–326.
- [27] Qiang Y. Factors affecting shoot regeneration of hypocotyl of *Brassica campestris* at high frequency from *in vitro* culture [J]. J Chongqing Coll Edu, 2006, 19(6): 13–15.  
蹇宇. 影响白菜型油菜下胚轴外植体芽高频再生的因素 [J]. 重庆教育学院学报, 2006, 19(6): 13–15.
- [28] Ma G, Zhou B, Li Y H. Establishment and optimization of a high-frequency shoot regeneration system of turnip (*Brassica rapa* L. ssp. *rapifera*) [J]. Acta Hort Sin, 2008, 35(6): 833–840.  
马光, 周波, 李玉花. 芜菁高频再生体系的建立及优化 [J]. 园艺学报, 2008, 35(6): 833–840.
- [29] Li W J, Li X Q, Jia M M, et al. Effects of 6-BA, NAA and 2,4-D on callus induction, growth and plantlet regeneration of Shepherd’s Purse [J]. Acta Phytophysiol Sin, 2012, 48(2): 141–146.  
李文静, 李学强, 贾毛毛. 6-BA、NAA和2,4-D不同配比对荠菜愈伤组织诱导、生长及植株再生的影响 [J]. 植物生理学报, 2012, 48(2): 141–146.