

## 矮晚柚的组织培养与快速繁殖

毛艳萍<sup>1,2</sup>, 苏智先<sup>2\*</sup>, 邹利娟<sup>1,2</sup>, 余阿梅<sup>1,2</sup>, 曾艳<sup>1,2</sup>, 程昌凤<sup>3</sup>

(1. 西华师范大学 生命科学学院, 四川 南充 637002; 2. 四川省生态与环境技术重点实验室, 四川 绵阳 621000; 3. 重庆江津果树研究所, 重庆 江津 402260)

**摘要:** 以矮晚柚种子萌发的无菌苗为实验材料, 利用茎尖和上胚轴诱导丛生芽的发生, 利用丛生芽获得再生植株。实验表明: 矮晚柚成熟和未成熟种子在 1/2MS、MS 上均能萌发, 萌发率最高可达 96%, 成熟种子萌发的无菌苗更利于后期的分化。最适外植体为无菌苗的上胚轴, 筛选出丛生芽最佳增殖培养方案为 MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>+蔗糖 40 g·L<sup>-1</sup>+靠近茎尖上胚轴, 最高增殖系数达 8.4, 最佳生根培养基为 1/2MS+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+活性炭 0.2 g·L<sup>-1</sup>, 生根率达 90% 以上。移栽至蛭石+珍珠岩+营养土(1:1:2)的营养钵上, 成活率可达 80%。

**关键词:** 矮晚柚; 丛生芽诱导; 组织培养; 快速繁殖。

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)03-0416-06

## Tissue culture and rapid propagation of dwarf-late pomelo

MAO Yan-Ping<sup>1,2</sup>, SU Zhi-Xian<sup>2\*</sup>, ZOU Li-Juan<sup>1,2</sup>,  
YU A-Mei<sup>1,2</sup>, ZENG Yan<sup>1,2</sup>, CHENG Chang-Feng<sup>3</sup>

(1. College of Life Science, China West Normal University, Nanchong 637002, China; 2. Sichuan Provincial Key Laboratory of Ecology and Environmental Technology, Mianyang 621000, China; 3. Chongqing Jiangjin Fruit Trees Institute, Chongqing 402260, China)

**Abstract:** Aseptic seeding of dwarf-late pomelo were used as the materials in the study, We induced cespitose buds from meristem and epicotyl of the seedlings, then regenerated plants from the induced shoots, and results showed that both mature and immature seeds could be germinate on 1/2MS and MS medium, the highest germination rate could reach 96%, and the aseptic seeding from mature seeds were more suitable for the further differentiation. The epicotyl was found to be the optimal explants, the optimal protocol for cespitose buds proliferation was to culutre upicotyl on MS medium with 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA and 40 g·L<sup>-1</sup> sucrose, and the achieved multiplication coefficient was 8.4. The optimal rooting medium was 1/2MS medium with 0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 0.2 mg·L<sup>-1</sup> IBA 0.2 g·L<sup>-1</sup> AC, from which 90% rooting rate was obtained. After ransplanted to nutrition bowl, 80% plants survived.

**Key words:** dwarf -late pomelo; cespitose buds induction; tissue culture; rapid proliferation

矮晚柚(*Citrus grandis*)系台湾晚白柚的芽变品种, 是一种较新的柚类品种, 属芸香科(Rutaceae)柑橘属(*Citrus*)柚类植物。该品种的果实品质上

等, 适应性广, 是目前生产中最矮化的柚子品种, 可做为盆景的优良观赏树种(李盛先等, 1998)。矮晚柚具有健胃、润肺、补血、清肠、利便等功效, 对败血

收稿日期: 2009-03-16 修回日期: 2009-10-15

基金项目: 国家自然科学基金(30670209); 四川省教育厅重点项目(2003A175)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670209); Key Item of Education Department of Sichuan Province(2003A175)]

作者简介: 毛艳萍(1985-), 女, 四川绵阳人, 硕士, 主要从事植物组织培养及植物生理方面的研究工作, (E-mail) yanping\_mao@126.com.

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: zxsu2008@163.com)

症等有良好的辅助疗效,柚皮含有生理活性物质柚皮甙,可降低血液的黏滞度,减少血栓的形成,故而对脑血管疾病,如脑血栓、中风等也有较好的预防作用。

目前,我国学者在研究柚类组培方面的试材已有沙田柚(韩美丽等,2004;董高峰等,2001)、砧板柚(梁倩华等,1994)、文旦柚、下河蜜柚(邹金美等,2006)和酸柚(王任翔等,1996)等,但尚未见矮晚柚的组织培养快速繁殖的研究报道。利用传统的方式进行繁殖,存在播种发芽率低,嫁接发芽率高但成本高等很多弊端,不能适应市场对良种柚类的大量需求。通过高效组织培养再生体系的建立,能有效克服上述弊端,为柚类的原体苗木快速繁殖、遗传育种、基因转化提供了一条新的途径。本研究以矮晚柚的无菌苗为试材,对比研究了不同外植体及其放置方式、不同的激素配比对丛生芽增殖的影响,筛选出矮晚柚的最佳繁殖体系,试图为芸香科其他物种的快速繁殖提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试材

2008年9月,在重庆市江津果树研究所采集矮晚柚种子,取用成熟及未成熟的种子萌发的无菌苗。

### 1.2 方 法

1.2.1 相关化学试剂的配制 75%酒精,0.1%升汞,1 mg/mL 6-BA 及 1 mg/mL NAA 的配制均参照王玉英等(2006)的方法进行。

1.2.2 种子的消毒 取矮晚柚成熟和未成熟的新鲜种子,用自来水洗去表面胶质,晾干后剥去外种皮,75%酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 2~3 次,然后在

0.1%升汞溶液中消毒 10 min,无菌水冲洗 3~5 次。

1.2.3 启动培养 种子消毒后,用无菌滤纸吸去多余水分,剥去内种皮,接种于不同类型的启动培养基上,分光照与黑暗两种方式培养,选取适宜的种子类型和光照条件。

1.2.4 丛生芽诱导培养 无菌苗长至 8~10 cm 时,取无菌苗的三部分作为外植体:①靠近茎尖的上胚轴;②靠近子叶的上胚轴;③茎尖,每种外植体切成 2~3 cm。外植体放置方式为:①,②外植体按照↑(形态学上端在上);↓(形态学下端在上),→(平放);③外植体按照切口端在下,接种于丛生芽诱导培养基上,30 d 后统计增殖系数及出芽率。增殖系数=增殖芽总个数/出芽的外植体总数,出芽率=(出芽的外植体数/接种的外植体总数)×100%。

1.2.5 生根培养及移栽 选取生长良好的幼苗转接至含有不同浓度激素的 1/2MS 培养基上,诱导生根。当根长约 4 cm 时开盖炼苗,然后移栽。除启动培养基外,其他基本培养基均为 MS 培养基,pH 调至 5.9~6.0,培养温度为(25±2)℃,光照强度 36 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>左右,光照培养时间 12h·d<sup>-1</sup>,每种培养基接种外植体 30 个,重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同类型种子与培养条件对种子萌发及后期分化的影响

将成熟与未成熟种子接种于不加激素的 1/2MS、MS 的固体和半固体启动培养基上,光照与黑暗两种条件下培养,正交设计 L8 不同培养组合与直观分析结果见表 1。

表 1 种子萌发的直观分析结果及生长情况  
Table 1 Visual analysis of seed germination and the growth conditions

实验号 No.	基本培养基 Basic medium	培养基状态 Medium state	种子类型 Seed types	光照条件 Light condition	萌发率(%) Germination rate	生长情况 Growth status
1	MS	固体	成熟	光	78	萌发晚,生长良好
2	MS	固体	成熟	暗	67	萌发较早,部分黄化
3	MS	半固体	未成熟	光	82	萌发早,幼苗生长较好
4	MS	半固体	未成熟	暗	76	萌发早,生长缓慢
5	1 / 2MS	固体	未成熟	光	88	萌发较晚,幼苗较瘦弱
6	1 / 2MS	固体	未成熟	暗	96	萌发早,幼苗黄化,瘦弱
7	1 / 2MS	半固体	成熟	光	89	萌发较晚,幼苗生长瘦弱
8	1 / 2MS	半固体	成熟	暗	90	萌发较早,幼苗瘦弱
k1	75.750	82.205	81.000	84.250*		
k2	90.750*	84.250*	85.500*	82.250		
R	15.000	2.000	4.5000	2.000		

表2 种子萌发方差分析

Table 2 Analysis of variance of seed germination

因素 Factors	平方和 SS	自由度 df	F比 F ratio	F临界值 F critical value	显著性 Significance
基本培养基 Basic medium	450.000	1	900.000	161.000	*
培养基状态 Medium state	8.000	1	16.000	161.000	
种子类型 Seed types	40.500	1	81.000	161.000	
光照条件 Light condition	8.000	1	16.000	161.000	
误差 Error	0.50	1			

注: 接种 15 d 后统计,  $\alpha=0.05$ 。

Note: Data were recorded after 15 days of culture,  $\alpha=0.05$ .

表3 外植体不同放置方式对丛生芽诱导的影响

Table 3 Effect of different ways of explant placing on the induction of clustered shoots

外植体放置方式 Ways of explants placing	增殖系数 Multiplication coefficient	出芽率 Budding rate(%)
↑	4.7	64
↓	1.8	45
→	3.6	48

试验表明: 黑暗条件下, 种子在接种 3d 后开始萌发; 光照条件下, 种子接种 5d 后开始萌发; 光照条件下培养的种子后期生长更加良好, 无黄化苗出现。种子萌发后, 固体培养基上的无菌苗生长更为健壮, 且在分化能力更强, 相同条件下的出芽数和出芽率较半固体培养基上萌发的无菌苗更高。后期分化芽中, 未成熟种子萌发出的外植体分化出芽早, 但是芽

长势不佳, 成熟种子萌发出的外植体分化稍晚, 长势更加良好。从表 1 可以看出, 光照条件下, 种子萌发的最佳方案是未成熟种子在固体 MS 培养基上培养。方差分析表明, 在  $\alpha=0.05$  水平下, 基本培养基的类型对种子萌发的影响达到显著水平, 其他因素的影响均不显著(表 2)。综上所述, 成熟种子在半固体的 MS 培养基培养发苗, 于黑暗条件下启动培养, 待种子开始萌发后, 转至固体 MS 于光照条件下培养更有利于最佳试验材料的获得。

## 2.2 不同放置方式与不同激素配比对丛生芽诱导的影响

2.2.1 不同放置方式对出芽的影响 以成熟种子的上胚轴为 1 材料, 三种方式放置, 分别接种于 MS + 6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 蔗糖  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  上, 结果见表 3。培养 7 d 后, 外植体与培养基接触端开始膨大, 20 d 后, ↑ 上端, ↓ 下端, → 一端已有芽长出。↑ 上端芽长势较好, 叶片平展呈绿色; ↓ 下端芽畸形芽较多, 芽矮小且叶片弯曲; → 一端出芽少, 叶片小。30 d 后统计结果, 放置方式以形态学上端在上(↑)最好, 其出芽率和增殖系数最高。

2.2.2 不同激素配比对丛生芽诱导的影响 将无菌苗的上胚轴(①, ②)和茎尖(③)剪下, 分别接种于不同的诱导培养基上。正交设计 L<sub>9</sub> 与试验结果见表 3。结果表明, 接种 7 d 后, 三种外植体插入培养基端均出现愈伤化, 15 d 后①上胚轴 1 上端开始出现芽点, 20 d 后丛生芽开始长出。由此看出出芽率和增殖系数呈正相关, 因此只对增殖系数进行方差分析。

表4 丛生芽诱导正交设计表及结果

Table 4 Induction of cepitose bud and its orthogonal design

实验号 No.	A 6-BA ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	B NAA ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	C 蔗糖 Sucrose( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	D 外植体 Explants	增殖系数 Multiplication coefficient	出芽率(%) Budding rate
1	1.0	0.1	30	①	6.34	82.76
2	1.0	0.2	40	②	2.56	42.86
3	1.0	0.5	50	③	4.40	54.56
4	2.0	0.1	40	③	8.40	100.00
5	2.0	0.2	50	①	6.96	83.33
6	2.0	0.5	30	②	4.90	66.67
7	3.0	0.1	50	②	5.70	77.78
8	3.0	0.2	30	③	5.60	72.72
9	3.0	0.5	40	①	7.30	83.33
k <sub>1</sub>	4.433	6.813*	5.613	6.867*		
k <sub>2</sub>	6.753*	5.040	6.087*	4.387	总和=52.16	
k <sub>3</sub>	6.200	5.533	5.687	6.133		
R	2.320	1.773	0.474	2.480	最佳点 A2B1C2D1	

注: k<sub>1</sub>、k<sub>2</sub>、k<sub>3</sub> 表示增殖系数的水平均值, R 表示增殖系数的极差, 30 d 后统计出芽情况。

Note: k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> and k<sub>3</sub> stand for the level averages of multiplication coefficient, R stands for range, data was recorded after 30 days of culture.

直观分析(表 4)表明,四种因素的极差大小依次是:D>A>B>C,四种因素对外植体出芽影响大小依次是:外植体的种类>6-BA 的浓度>NAA 的浓度>蔗糖的浓度。经方差分析表明,在  $\alpha=0.05$  水平下,6-BA 与外植体种类对丛生芽的增殖有显著影响,其他因素均未达到显著水平,因此 6-BA 浓度与外植体种类是丛生芽增殖影响的主要因素。综上所述,丛生芽增殖最优组合为  $A_2B_1C_2D_1$ ,即 MS+6-BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +蔗糖  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +靠近茎尖的上胚轴。

表 5 丛生芽增殖方差分析表  
Table 5 Proliferation of cespitose bud and analysis of variance

因素 Factors	平方和 SS	自由度 df	F 比 F ratio	F 临界值 F critical value	显著性 Significance
A	8.810	2	22.648	19.000	*
B	5.026	2	12.920	19.000	
C	0.389	2	1.000	19.000	
D	9.739	2	25.036	19.000	*
误差 Error	0.39	2			

### 2.3 单因素对出芽的影响

2.3.1 6-BA 对丛生芽发生的影响 表 4 表明,除外植体外,细胞分裂素 6-BA 对出芽的影响是最大的。对 6-BA 进行作图分析(图 1):出芽率和增殖系数在整体上的变化趋势是较一致的;较低浓度的 6-BA 时,出芽率和增殖系数都明显较低;6-BA 浓度增大时,出芽率和增殖系数都明显增大。当 6-BA 浓度在  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,出芽率和增殖系数均达最大值,浓度继续增大,出芽率和增殖系数开始出现降低的趋势,与前面正交分析的结果相符。说明加入适当浓度的 6-BA 对出芽率和增殖系数有一定的促进作用,当浓度大于  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,就会在一定程度上抑制出芽和芽的生长,这与董高峰等(2006)的结论一致。因此,6-BA 的最适浓度是  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.2 NAA 对丛生芽发生的影响 由正交分析(表 4)可以得出,NAA 对出芽的影响仅次于 6-BA,从图 2 看出,NAA 对增殖系数和出芽率的影响也较为明显。当 NAA 浓度为  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,丛生芽的增殖系数和出芽率分别达到了 4.56 和 50.4%。随着 NAA 的浓度升高,增殖系数和出芽率都有一定的增长,当 NAA 浓度达到  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,增殖系数和出芽率均达到了最大值。NAA 浓度大于  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,丛生芽增殖系数和出芽率开始降低。

一般来说,高浓度的细胞分裂素和低浓度的生长素更有利于丛生芽的生长(李群等,2004),NAA 的添加浓度应低于  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此,NAA 的最适浓度是  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (李国平等,2005)。

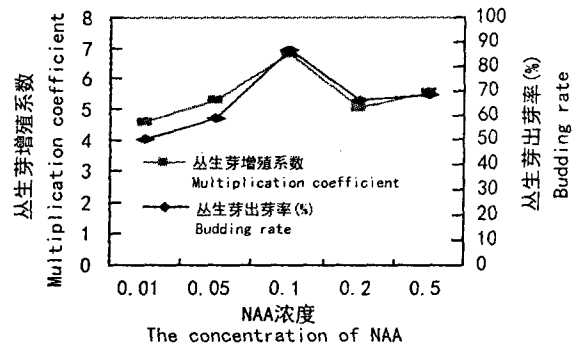


图 1 不同浓度 6-BA 对丛生芽诱导的影响  
Fig. 1 Effect of different concentrations of 6-BA on sprouting rate of cespitose bud

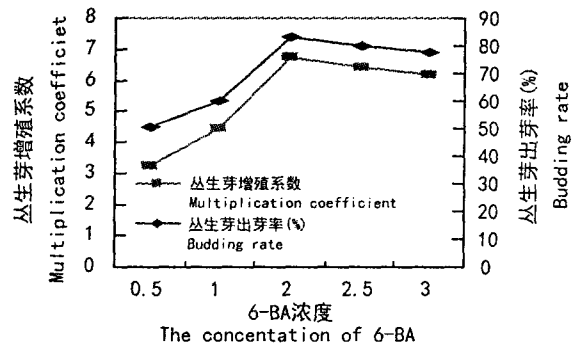


图 2 不同浓度 NAA 对丛生芽诱导的影响  
Fig. 2 Effect of different concentrations of NAA on sprouting rate of cespitose bud

### 2.4 植株的生根

选取生长良好的丛生芽,转接到附加活性炭  $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的生根培养基上诱导生根,10 d 后,各培养基内的芽均有根长出,其中以  $1/2\text{MS} + \text{NAA} 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA} 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{活性炭} 0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  诱导出的根系最为发达,根较长,利于炼苗成功(李国平等,2005),生根率 90% 以上。根长至 3~4 cm 时,开盖炼苗,湿度保持在 80% 以上,3 d 后,将根上的培养基洗去,移栽至蛭石+珍珠岩+营养土(1:1:2)的营养钵上,10 d 后统计成活率,可达 80%。

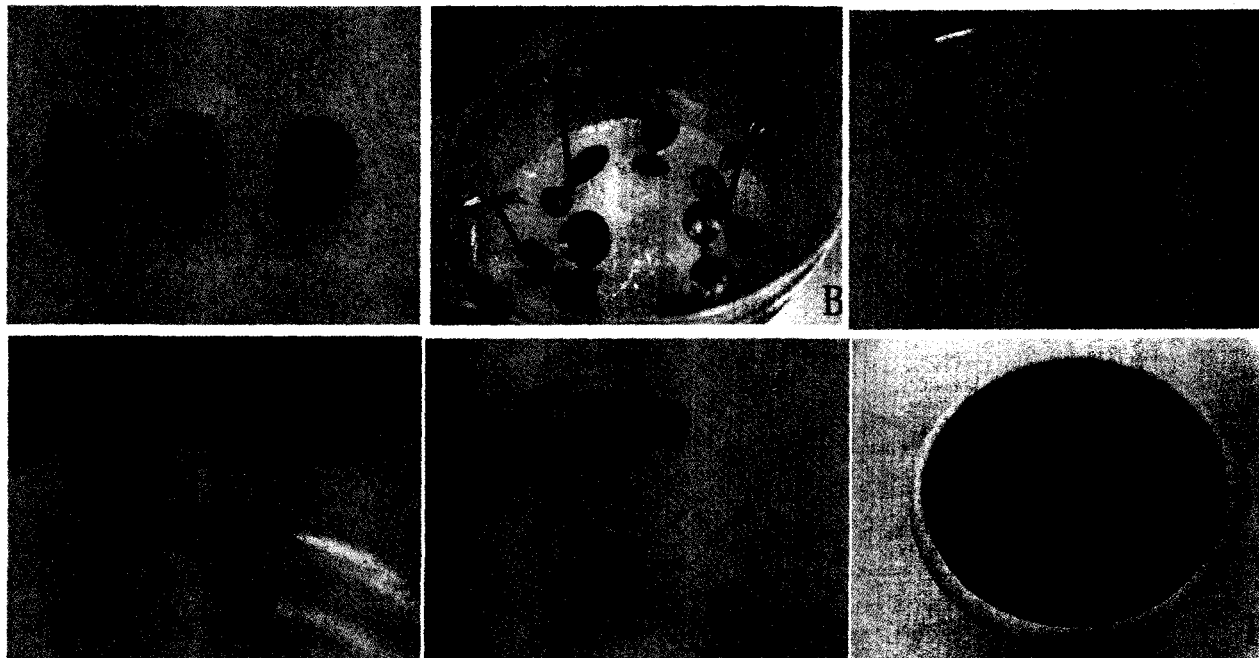
## 3 讨论

### 3.1 培养基类型对种子萌发的影响

一般,固体  $1/2\text{MS}$  培养基是常用于种子萌发的

培养基。矮晚柚在种子萌发阶段中,种子在半固体培养基比固体培养基更容易启动萌发,这可能与半固体培养基有更好的流动性有关,使营养成分能与种子充分的接触,更容易充分吸收营养。MS培养

基作为组培常用的培养基,其上萌发出的无菌苗比1/2MS培养基上萌发的无菌苗更粗壮,这可能与MS含有较高含量的无机元素有关。发苗的最佳方案是成熟种子在半固体1/2MS于黑暗条件下萌发



图版 I 矮晚柚快速繁殖与植株再生过程 A. 矮晚柚种子; B. 无菌苗; C. 茎尖分化出丛生芽; D. 上胚轴分化出丛生芽; E. 再生植株; F. 移栽 20 d 后的再生植株。

Plate I The whole course of tissue culture and rapid propagation of dwarf-late pomelo A. Seeds of the dwarf-late pomelo; B. Plant; C. Differentiated cespitose buds from shoot apex; D. Differentiated cespitose buds from hypocotyl; E. Regenerative plant; F. Regenerative plant 20 days after transplantation.

后,转至固体 MS 上于光照条件下培养。

### 3.2 植物激素对丛生芽诱导的影响

在植物组织培养中,器官的发生是一个极其复杂的过程,受内源和外源激素的调节(谭文澄等,1991),同时外植体的来源也是影响植物快繁成功的重要因素之一(林小桦等,2007)。本试验通过不同外植体丛生芽诱导能力的比较,丛生芽增殖的最适外植体是靠近茎尖的上胚轴,在适宜的诱导培养基上,增殖系数可达 7.3,这可能与其有较强的分生组织有关。和上胚轴相比,茎尖的增殖系数稍低,推测是由于茎尖具有顶端优势,本身就有较高的内源激素,在加入外源激素后,使得激素总体水平提高,过高的激素水平反而会抑制芽的生长。最适合芽增殖的培养基是  $MS + 6-BA 2.0 \text{ mg} \cdot L^{-1} + NAA 0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1} + \text{蔗糖 } 40 \text{ g} \cdot L^{-1}$ 。

### 3.3 上胚轴放置方式对丛生芽诱导的影响

外植体放置方式对丛生芽增殖的影响已有部分

研究,均以形态学上端在上的方式最佳。矮晚柚上胚轴三种放置方式中,都只有一端有丛生芽长出,且同样以按形态学上端在上(↑)的增殖系数和出芽率最高,这与外植体内源激素的分布和再分配的能力有关(徐晓峰等,2002)。植物生长素有极性运输和非极性运输两种运输方式,而在茎段和根的运输方式属于极性运输,即生长素在植物体内从形态学的一端向形态学的另一端单向运输(夏石头等,2003)。上胚轴最终会发育成茎段,根据植物生长素的极性运输,对上胚轴而言形态学一端本身就具有更高的生长素浓度,更具有出芽的优势,因此各种放置方式都只有一端有芽的长出。矮晚柚上胚轴的最佳放置方式是以形态学上端在上。最适合生根的培养基为  $1/2 MS + NAA 0.2 \text{ mg} \cdot L^{-1} + IBA 0.2 \text{ mg} \cdot L^{-1} + AC 0.2 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ,活性炭的添加有利于根的伸长和生长,这与 Bach(1998)的结论是一致的。

致谢 在此特别感谢导师苏智先教授的悉心指

导,感谢邹利娟、余阿梅、曾艳、杨敬天在研究过程中给予的帮助,同时还要感谢重庆江津果树研究所对本研究的大力支持。

### 参考文献:

- 王玉英,高新一. 2006. 植物组织培养技术手册[M]. 北京:金盾出版社:49-50,82-83
- 谭文澄,戴策刚. 1991. 观赏植物组织培养[M]. 北京:北京林业出版社:124-125
- Bach A. 1988. Effect of AC on *in vitro* propagation of *Iris* × *Houandica*[J]. *Bull Polsh Acad Sci Biol Sci*,36(46):107
- Dong GF(董高峰), Huang T(黄涛), Li GG(李耿光), et al. 2001. Studies on the tissue culture of different explants *in vitro* and plant regeneration from *Citrus grandis* cv. Shatian Yu(沙田柚不同外植体离体培养与植株再生的研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究),19(5):440-444
- Han ML(韩美丽), Lu RS(陆荣生), Du XL(杜晓莉). 2004. Studies on factors affecting shoots regeneration from epicotyls of *Citrus grandis* cv. Shatian-Yu(沙田柚上胚轴离体培养影响因素研究)[J]. *Southwest China J Agric Sci*(西南农业学报),17(5):639-641
- Li GP(李国平), Huang QC(黄群策), Qin GY(秦广庸). 2005. *In vitro* culture of *Hedyotis diffusa* leaves and establishment of regeneration system(白花蛇舌草叶片离体培养及试管无性系的建立)[J]. *Guihaia* (广西植物),25(5):455-458
- Li Q(李群), Liu GY(刘光勇), Wang L(王丽). 2004. Effect of hormone on plantlet regeneration and studies of root regeneration culture of *Eustoma* sp. (激素对洋桔梗植株再生的影响及生根培养的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),24(1):40-42
- Li SX(李盛先). 1998. Say good fruit golden grapefruit(金秋佳果话柚子)[J]. *Zhejiang Fore*(浙江林业),5:20
- Liang QH(梁倩华), Wang RX(王任翔), Chen TT(陈腾土), et al. 1994. Tissue culture of *Citrus grandis* (砧板柚的组织培养)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯),30(3):204-206
- Lin XH(林小桦), He H(贺红), Wu LR(吴立蓉), et al. 2007. *In vitro* culture of different explants from pogostemon cablin(广藿香不同外植体离体培养的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),27(4):658-661
- Wang RX(王任翔), Liang QH(梁倩华), Chen TT(陈腾土), et al. 1996. Tissue culture of *Citrus grandis* (酸柚的组织培养)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报),13(增刊):70-71
- Xia ST(夏石头), Xiao LT(萧浪涛). 2003. Regulation of polar transport of auxin and its mechanism(生长素极性运输的调控及其机制)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯),39(3):255-261
- Xu XF(徐晓峰), Huang XL(黄学林). 2002. Establishment of broccoli plant regeneration system with orthogonal design(应用正交设计建立青花菜植株的再生体系)[J]. *Guihaia*(广西植物),22(6):513-516
- Zou JM(邹金美), Yu JF(余金富), Ye GL(叶国利), et al. 2006. Studies on the technique of tissue culture *in vitro* and rapid propagation of *Citrus grandis* cv. Wendan and *Citrus grandis* cv. Miyou(文旦柚和下河蜜柚组织培养快速无性繁殖)[J]. *J Zhangzhou Teach Coll; Nat Sci Edi*(漳州师范学院学报·自然科学版),2:74-77
- Peck DE, Cumming BG. 1984. *In vitro*-propagation of *Begonia* × *tuberhybrida* from leaf sections[J]. *Hort Sci*,19:395-397
- Tang RH(唐荣华), Li YF(李云飞), Wang L(王丽). 2004. The rapid propagation *in vitro* of *Begonia laciniata* (裂叶秋海棠的离体快速繁殖)[J]. *J Sichuan Univ; Nat Sci Edi*(四川大学学报·自然科学版),41(3):637-640
- Tian DK(田代科), Guan KY(管开云), Guo RX(郭瑞贤), et al. 2001. Propagation and cultivation of *Begonia versicolor* (变色秋海棠的繁殖栽培)[J]. *Guihaia*(广西植物),21(4):375-380
- Wang YH(王瑛华), Chen G(陈刚), Chen XW(陈雄伟). 2007. Establishment of a high frequency efficient regeneration system from leaf in *Torenia fournieri* Linden(蓝猪耳叶片高频率再生体系的建立)[J]. *J Zhaoqing Univ*(肇庆学院学报),28(2):58-61
- Zhang LY(张兰英), Li GG(李耿光), Guo YJ(郭俊彦). 1988. Study on the somatic embryogenesis from leaf of *Begonia fimbriatipula* *in vitro* (紫背天葵叶片培养体细胞胚状体发生的研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报),30(2):134-139

(上接第410页 Continue from page 410)

*Tiss Organ Cult*,95:209-215

- Chen G(陈刚), Chen XW(陈雄伟), Wang YH(王瑛华). 2008. *In vitro* rapid propagation in *Begonia fimbriatipula* Hance[J]. *J modern Agric Tech* (现代农业科技),36(24):23-24
- Espino FJ, Linacero R, Rueda J, et al. 2004. Shoot regeneration in four *Begonia* genotypes[J]. *Biol Plant*,48:101-104
- Li GG(李耿光), Zhan LY(张兰英), Zhu BQ(朱宝卿), et al. 1983. Callus induction and organ differentiation in the tissue culture of *Begonia fimbriatipula* Hance(紫背天葵的愈伤组织诱导和器官分化)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报),25(3):238-244
- Li RZ(李任珠), Lu HQ(卢海强), Xing ZS(邢增盛). 1997. Study on the tissue culture of *Begonia argenteo-guttata* (银星秋海棠组织培养的研究)[J]. *J Hainan Univ; Nat Sci Edi*(海南大学学报·自然科学版),15(4):331-336
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiol Plant*,15(3):473-497