

叶维雁,刘惠民,李贤忠,等. 葡萄柚的组织培养与植株再生技术[J]. 江苏农业科学,2017,45(9):34-37.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.09.009

葡萄柚的组织培养与植株再生技术

叶维雁^{1,2}, 刘惠民¹, 李贤忠¹, 王 倩¹, 何 静¹, 夏 赛¹

(1. 西南林业大学国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 云南昆明 650224;

2. 广西壮族自治区亚热带作物研究所, 广西南宁 530001)

摘要:以葡萄柚无菌实生苗的上胚轴、下胚轴和叶片为外植体,研究其组织培养和植株再生技术。结果表明,葡萄柚上胚轴分化不定芽的能力最强;诱导不定芽的最佳培养基为 WPM + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + AgNO₃ 2 mg/L + 蔗糖 40 g/L,培养 40 d 后不定芽分化率为 78.33%,不定芽数为 3.66 个;最适生根培养基为 1/2 WPM + NAA 1.5 mg/L + AC 0.1% + 蔗糖 40 g/L,生根率达 73.33%,生根数为 1.91 条/株;生根苗移栽 30 d 后成活率达 70% 以上。

关键词:葡萄柚;离体培养;不定芽;植株再生

中图分类号: S666.304+.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2017)09-0034-04

葡萄柚 (*Citrus paradise* Macf.) 属芸香科柑橘属常绿植物,香港称为“西柚”,在广东新会一带又称“番柑”,是甜橙和柚的天然杂交种,结果时果实悬挂成串,簇生如葡萄,因此被称为葡萄柚^[1],为世界四大柑橘类群(宽皮柑橘类、甜橙类、柠檬来檬类、葡萄柚和柚类)之一^[2]。葡萄柚果实风味独特、柔软多汁、酸甜可口,口感好,可用于制备新鲜果汁、罐头和沙拉^[3],含有丰富的维生素 C、柚苷和橙柑,具有消除疲劳、清热退火、消食、减肥和护肤等特殊功效^[4],具有较高的经济价值和药用价值。葡萄柚传统种子繁殖方式的遗传性状易产生较大变异,而嫁接方式成本较高,很难满足市场对良种苗木的大量需求。利用组织培养技术进行葡萄柚良种的快速繁殖可以克服常规方法费时的缺点,还可获得具有高度一致和优良表型的群体,而且创建高效、稳定的植株再生体系可以为葡萄柚的无病毒苗木繁育、诱变育种及遗传转化创造有利条件。迄今为止,许多柑橘品种已经在组织培养与再生体系的构建上取得了成功^[5-12],而关于葡萄柚再生体系建立报道仍很少,本试验以葡萄柚种子萌发的无菌苗为试材,构建稳定的植株再生体系,并探讨几个相关的影响因素,以期葡萄柚的快速繁殖、品种改良和遗传转化提供参考。

1 材料与方法

1.1 无菌实生苗的获取

2013 年 11 月从云南省林科院西双版纳州普文葡萄柚试验园挑选生长结果良好的帕里斯 (Perlist) 品种植株,取其成熟鲜果的饱满种子,装入大烧杯,烧杯口用纱布封住,流水冲洗干净表面黏液。在超净工作台内用 75% 乙醇表面灭菌 15 s,再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 20 min,无菌水冲洗 8 次,在无菌

滤纸上剥去内外种皮,接种于 1/5 WPM 固体培养基上。1 L 0.1% HgCl₂ 中滴加 1~2 滴吐温-20,以提高 HgCl₂ 的杀菌效果^[13]。21 d 后,取无菌实生苗作为外植体供体。

1.2 不定芽的诱导

1.2.1 不同浓度的 TDZ 与 NAA 对不定芽诱导的影响 以 WPM + 蔗糖 40 g/L 为基本培养基,添加不同浓度的植物生长调节剂苯基噻二唑基脲 (thidiazuron, TDZ) 0、0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L 和萘乙酸 (1-naphthaleneacetic acid, NAA) 0.1 mg/L,共 7 个处理。取 21 d 苗龄的无菌实生苗,在上胚轴中部切取长约 1.5 cm 的小段,水平接种在培养基上,每处理接种 20 个上胚轴小段,重复 3 次,40 d 后统计愈伤诱导率、不定芽分化率、不定芽数。

1.2.2 不同浓度的 AgNO₃ 对不定芽诱导的影响 以 WPM + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 蔗糖 40 g/L 为基本培养基,添加不同浓度 (0、0.5、1.0、2.0、5.0、10 mg/L) 的 AgNO₃,共 6 个处理。取 21 d 苗龄的无菌实生苗,在上胚轴中部切取长约 1.5 cm 的小段,水平接种在培养基上,每处理接种 20 个上胚轴小段,重复 3 次,40 d 后统计愈伤诱导率、不定芽分化率、不定芽数。

1.2.3 不同浓度的蔗糖对不定芽诱导的影响 以 WPM + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + AgNO₃ 2.0 mg/L 为基本培养基,添加不同浓度 (20、30、40、50、60 g/L) 的蔗糖,共 5 个处理。取 21 d 苗龄的无菌实生苗,在上胚轴中部切取长约 1.5 cm 的小段,水平接种在培养基上,每处理接种 20 个上胚轴小段,重复 3 次,40 d 后统计愈伤诱导率、不定芽分化率、不定芽数。

1.2.4 不同外植体对不定芽诱导的影响 从 21 d 苗龄的无菌实生苗中分别选取上胚轴、下胚轴、叶片作为外植体,水平接种于 WPM + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + AgNO₃ 2.0 mg/L + 蔗糖 40 g/L 培养基上,共 3 个处理,每处理接种 20 个外植体,重复 3 次,40 d 后统计愈伤诱导率、不定芽分化率、不定芽数。

1.3 生根培养

当不定芽长至约 2 cm 时,切下长势较好且大小相同的单

收稿日期:2016-07-01

基金项目:国家国际科技合作专项“国外鲜食杂交柚优良品种引进、联合研发及示范”(编号:2014DFA31060)。

作者简介:叶维雁(1988—),男,广西合浦人,硕士,主要从事果树生物技术等研究工作。E-mail:flyngwy@163.com。

通信作者:刘惠民,博士,教授,主要从事经济林栽培与利用等研究工作。E-mail:hmliu@swfu.edu.cn。

芽接种于生根培养基中。生根培养基以 1/2 WPM + 蔗糖 40 g/L + 活性炭(activated carbon, AC)0.1% 为基本培养基,附加不同浓度(0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)的 NAA,每处理接种 20 个单芽,重复 3 次。生根培养 40 d 后统计生根率、生根数,观察根的生长情况,筛选出适合不定芽生根的培养基。

1.4 炼苗移栽

挑选生长健壮的生根苗置于室内自然光下炼苗 7 d,其间逐渐松开瓶盖,使生根苗逐渐适应外界环境。挑选长势较好、株高约 3 cm、根长约 8 cm 的生根苗 64 株,洗净根部的培养基后,移栽到由草泥炭、珍珠岩、蛭石、红土(体积比为 2:1:1:1)组成的混合基质中,用多菌灵液浇透基质,注意水分、光照、温度的管理,30 d 后统计成活率。

1.5 培养条件

WPM 培养基均添加琼脂 5 g/L;1/2 WPM 培养基里大量元素减半,其他元素含量不变,含琼脂 5 g/L;1/5 WPM 培养基里各元素含量均减为 WPM 培养基的 1/5,含琼脂 3 g/L。pH 值调至 5.7±0.1,121℃ 高压灭菌 18 min 后冷却备用,培养温度为(26±1)℃,光照度 1 500 lx,光照时间 14 h/d。

1.6 数据处理

试验数据使用 SPSS 21.0 进行单因素方差多重比较分析。观测变量计算公式如下:

愈伤诱导率 = 产生愈伤组织的外植体数/接种的外植体数 × 100% ;

不定芽分化率 = 长出不定芽的外植体数/接种的外植体数 × 100% ;

不定芽数 = 长出的不定芽总数/长出不定芽的外植体数;

生根率 = 生根的不定芽数/接种的不定芽数 × 100% ;

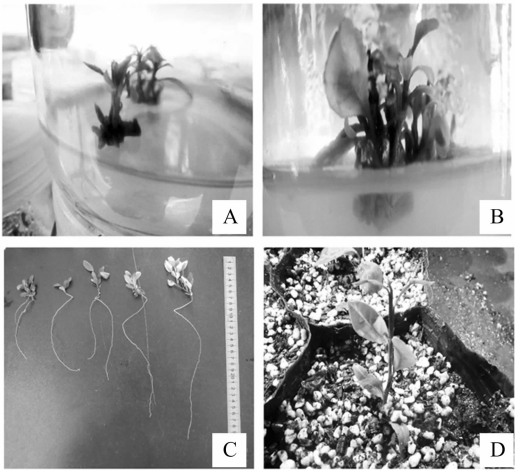
生根数 = 长出的总根数/生根的不定芽数;

移栽成活率 = 移栽成活苗数/移栽苗数 × 100% 。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的 TDZ 与 NAA 对不定芽诱导的影响

上胚轴培养 7 d 后两端切口处开始膨大,12 d 左右在两端切口处有少量淡绿色愈伤组织形成,但随后愈伤组织并无明显增加。18 d 左右在两端切口处开始出现绿色芽点,23 d 左右在绿色芽点处开始出芽,并于 30 d 左右达到高峰(图 1-A),40 d 后不定芽的长度达 1.0~1.5 cm(图 1-B),最长的约 2 cm。TDZ 与 NAA 不同的浓度组合对不定芽分化的影响是不同的,其结果见表 1。在 NAA 浓度为 0.1 mg/L 的条件下,不同浓度的 TDZ 均可诱导上胚轴产生愈伤组织和不定芽,但愈伤诱导率、不定芽分化率及不定芽数都有所差异;而不含 TDZ 的培养基里上胚轴无愈伤组织和不定芽形成。TDZ 浓度为 1.5 mg/L 时愈伤组织诱导率达到最高值,为 71.67%,显著高于其他处理;TDZ 浓度为 1.0 mg/L 时不定芽分化率最高,为 56.67%,极显著高于其他处理;TDZ 浓度为 1.0 mg/L 时不定芽数最多,达到 3.08 个,极显著高于其他处理。当 TDZ 浓度由 1.0 mg/L 增加至 2.0 mg/L,不定芽分化率降低,不定芽数减少。由此可见,虽然 TDZ 是一种强力的细胞分裂素,但对于葡萄柚上胚轴不定芽的分化,其浓度并不是越高越好,过高浓度的 TDZ 反而会抑制不定芽的分化。



A—接种 30 d 后产生的不定芽; B—接种 40 d 后产生的不定芽; C—生根苗; D—移栽成活苗

图1 不定芽的诱导

表 1 不同浓度的 TDZ 与 NAA 对不定芽诱导的影响

处理	激素浓度(mg/L)		愈伤诱导率 (%)	不定芽分化率 (%)	不定芽数 (个)
	TDZ	NAA			
CK	0	0.1	0.00±0.00Ef	0.00±0.00De	0.00±0.00Ef
1	0.1	0.1	18.33±2.89De	18.33±2.89Cd	1.08±0.14De
2	0.2	0.1	26.67±2.89Dd	26.67±2.89Cc	1.50±0.10Cd
3	0.5	0.1	51.67±2.89Cc	45.00±5.00Bb	2.55±0.05Bc
4	1.0	0.1	65.00±5.00ABb	56.67±5.77Aa	3.08±0.09Aa
5	1.5	0.1	71.67±5.77Aa	43.33±7.64Bb	2.73±0.04Bb
6	2.0	0.1	56.67±2.89BCc	30.00±5.00Cc	1.39±0.05Cd

注:同列数据后不同大写、小写字母分别表示处理间在 0.01、0.05 水平差异显著。下同。

2.2 不同浓度的 AgNO₃ 对不定芽诱导的影响

如表 2 所示,当 AgNO₃ 浓度为 0.5~5.0 mg/L 时,上胚轴的愈伤诱导率、不定芽分化率、不定芽数均高于对照(不添加 AgNO₃ 的处理),其中 AgNO₃ 浓度为 2.0 mg/L 时愈伤诱导率、不定芽分化率、不定芽数均达到最高值,分别为 85.00%、78.33%、3.66 个;当 AgNO₃ 浓度由 2.0 mg/L 增加到 5.0 mg/L 时,愈伤诱导率、不定芽分化率、不定芽数均明显降低,当 AgNO₃ 浓度增加至 10.0 mg/L 时,愈伤诱导率、不定芽

分化率、不定芽数都已低于对照,表明过高浓度的 AgNO₃ 对葡萄柚上胚轴愈伤组织、不定芽的诱导均具有抑制作用。

2.3 不同浓度的蔗糖对不定芽诱导的影响

蔗糖浓度对上胚轴不定芽的分化有明显影响(表 3)。当蔗糖浓度为 40 g/L 时,不定芽的诱导效果最好,不定芽分化率和不定芽数均达到最高值,分别为 76.67% 和 3.69 个,且不定芽生长粗壮;当蔗糖浓度为 20 g/L 时,不定芽分化率和不定芽数分别低至 45.00% 和 1.89 个,不定芽生长细弱,这

表 2 不同浓度的 AgNO₃ 对不定芽诱导的影响

AgNO ₃ 浓度 (mg/L)	愈伤诱导率 (%)	不定芽分化率 (%)	不定芽数 (个)
0	66.67 ± 5.77CDcd	55.00 ± 5.00Bc	3.09 ± 0.01Cd
0.5	75.00 ± 0.00ABCbc	58.33 ± 2.89Bbc	3.28 ± 0.04Bb
1.0	81.67 ± 2.89ABab	66.67 ± 5.77ABb	3.32 ± 0.04Bb
2.0	85.00 ± 5.00Aa	78.33 ± 2.89Aa	3.66 ± 0.03Aa
5.0	71.67 ± 7.64BCc	60.00 ± 5.00Bbc	3.17 ± 0.02Cc
10.0	58.33 ± 2.89Dd	36.67 ± 5.77Cd	2.52 ± 0.03De

表 3 不同浓度的蔗糖对不定芽诱导的影响

蔗糖浓度 (g/L)	愈伤诱导率 (%)	不定芽分化率 (%)	不定芽数 (个)	芽生长情况
20	53.33 ± 2.89Dd	45.00 ± 5.00Cc	1.89 ± 0.01De	+
30	75.00 ± 5.00ABab	65.00 ± 5.00Ab	3.13 ± 0.05Bc	++
40	83.33 ± 7.64Aa	76.67 ± 5.77Aa	3.69 ± 0.06Aa	+++
50	68.33 ± 5.77BCbc	63.33 ± 5.77ABb	3.24 ± 0.06Bb	++
60	60.00 ± 5.00CDcd	48.33 ± 7.64Bc	2.11 ± 0.02Cd	+

注: +、++、+++ 分别表示不定芽细弱、正常、粗壮。

可能是其后期生长中碳源和能源不足导致的;另一方面,高浓度(60 g/L)蔗糖抑制了不定芽的再生,不定芽分化率和不定芽数分别只有 48.33% 和 2.11 个,这可能是蔗糖浓度过高导致瓶内空气湿度变小或培养基渗透压升高,形成的一些不利因素造成的。

2.4 不同外植体对不定芽诱导的影响

不同外植体对葡萄柚不定芽的诱导影响很大,结果如表 4 所示,上胚轴和下胚轴均能分化出不定芽,而叶片始终未能分化出不定芽,其中上胚轴分化不定芽的能力最强,不定芽分化率达 76.67%,不定芽数达到 3.65 个,均极显著高于下胚轴和叶片。此外,上胚轴一般于接种 23 d 后开始分化形成不定芽,在 28 d 左右集中出芽,而下胚轴一般于接种 25 d 后才开始分化形成不定芽,在 30 d 左右集中出芽;由此可见,上胚轴的出芽时间要比下胚轴提前 2 d 左右,这在一定程度上也反映了上胚轴分化不定芽的能力要强于下胚轴,更适合作为葡萄柚不定芽诱导的外植体。

表 4 不同外植体对不定芽诱导的影响

外植体	愈伤诱导率 (%)	不定芽分化率 (%)	不定芽数 (个)
上胚轴	86.67 ± 5.77Aa	76.67 ± 2.89Aa	3.65 ± 0.05Aa
下胚轴	71.67 ± 7.64Ab	65.00 ± 5.00Bb	3.33 ± 0.05Bb
叶片	43.33 ± 7.64Bc	0.00 ± 0.00Cc	0.00 ± 0.00Cc

2.5 生根培养

不同浓度的 NAA 对不定芽生根的诱导效果如表 5 所示,接种 40 d 后,除对照外均能诱导出一定数量的不定根(图 1-C),且都较粗壮,部分生根苗除有主根外,还有 1~3 条侧根,长 3~6 cm。说明添加一定量的生长素对葡萄柚不定芽的生根是必须的,其中培养基 1/2 WPM + NAA 1.5 mg/L + AC 0.1% + 蔗糖 40 g/L 的生根效果最好,生根率达 73.33%,生根数为 1.91 条/株,均显著高于其他培养基。当 NAA 浓度由 1.5 mg/L 增加至 2.0 mg/L 时,生根率和生根数分别降低至 58.33% 和 1.31 条/株,说明高浓度的 NAA 对葡萄柚不定芽的生根产生抑制作用。

表 5 不同 NAA 浓度对不定芽生根的影响

NAA 浓度 (mg/L)	生根率 (%)	生根数 (条/株)
0.0	0.00 ± 0.00Dd	0.00 ± 0.00Ee
0.5	45.00 ± 5.00Cc	1.18 ± 0.05Dd
1.0	61.67 ± 7.64ABb	1.43 ± 0.02Bb
1.5	73.33 ± 2.89Aa	1.91 ± 0.04Aa
2.0	58.33 ± 5.77Bb	1.31 ± 0.05Cc

2.6 炼苗移栽

生根苗经炼苗后移栽至基质(草泥炭:珍珠岩:蛭石:红土=2:1:1:1,体积比)中,21 d 后幼苗开始长出新叶(图 1-D),30 d 后成活率达 70% 以上。

3 讨论与结论

在植物的离体培养中,在培养基中添加一定量的植物生长调节剂可以调节外植体的激素水平,从而促进不定芽的分化和再生。TDZ 是一种苯基脲衍生物,细胞分裂素活性高于 6-BA 和 KT,作为一种有效的形态发生调节剂被广泛用于植物组织培养^[14],范围遍及草本植物^[15-19]和木本植物^[20-23]。在含有 TDZ(浓度 0.1~2.0 mg/L)的培养基中均能诱导葡萄柚上胚轴不定芽的分化和形成,其中以 1.0 mg/L TDZ 诱导效果最好。高浓度的 TDZ 抑制葡萄柚上胚轴不定芽的分化,当 TDZ 浓度大于 1.0 mg/L 时,不定芽分化率开始呈现下降的趋势,不定芽数也开始减少。细胞分裂素和生长素按适当的比例组合在一起有很强的协同作用,一般情况下能更有效地促进不定芽的分化与生长,TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 的组合对葡萄柚上胚轴不定芽的诱导效果最好,不定芽分化率达 56.67%,不定芽数达 3.08 个,这可能是由于 TDZ 1.0 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L 的浓度配比刚好达到了上胚轴直接分化不定芽的生理要求,更好地促进了 DNA、RNA、蛋白质的合成,细胞的生长、分裂更加旺盛,促使不定芽的再生。

AgNO₃ 是一种较好的乙烯抑制剂,其提高不定芽再生能力已在多种植物上得到证实^[24-26]。试验中 AgNO₃ 可明显提高葡萄柚上胚轴的不定芽分化率,且不同浓度的 AgNO₃ 对不定芽的分化有不同的影响,培养基 WPM + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 蔗糖 40 g/L 中添加 2.0 mg/L AgNO₃ 最适合葡萄柚上胚轴不定芽的分化,不定芽分化率达 78.33%,不定芽数达 3.66 个;在相同的激素配比下,不定芽分化率随着 AgNO₃ 浓度(大于 2.0 mg/L 时)的升高而下降,此时 AgNO₃ 表现出一定的副作用;AgNO₃ 浓度由 2.0 mg/L 增加至 5.0 mg/L 时不定芽分化率开始降低,不定芽数开始减少,当 AgNO₃ 浓度达到 10 mg/L 时已表现出抑制作用,不定芽分化率、不定芽数均低于不添加 AgNO₃ 的处理。这可能是由于过多的 Ag⁺ 破坏了离子平衡,以及对植物体的毒害作用所致。

植物组织培养中,糖类为培养物生长发育提供碳源和能源,并有调节培养基渗透压的作用,其中最常用的糖类是蔗糖^[27];蔗糖浓度过低,碳源和能量供应不足,导致不定芽生长不良;蔗糖浓度过高,导致不定芽失水而生长不良。葡萄柚不定芽诱导的最适蔗糖浓度为 40 g/L,此时不定芽分化率和不定芽数分别为 76.67% 和 3.69 个。

植物组织培养中为获得较高的不定芽分化率,除了筛选

合适的激素组合及浓度配比外,还要选择合适的外植体类型。以葡萄柚的上胚轴、下胚轴、叶片作为外植体进行不定芽的诱导,难易程度不同,由易到难表现为上胚轴>下胚轴>叶片,其中上胚轴的不定芽分化率最高,达76.67%,与蕉柑^[28]、沙田柚^[29]不定芽诱导的表现一致,而叶片始终未能形成不定芽,这可能是由于上胚轴、下胚轴、叶片所含内源激素水平不同进而对外源激素种类、浓度的要求有差别而导致的^[30]。植物离体培养中不定芽的分化通常有直接发生型和间接发生型2种途径,本研究中不定芽的分化属于直接发生型,各试验组合均能诱导不定芽直接形成,虽然在切口表面有1圈白色松软的愈伤组织形成,但不定芽基本都是从材料切口表面直接形成,未经过愈伤组织阶段。此外,不定芽的分化位点有2种,一种是在机械损伤处如切口,有观点认为机械损伤能刺激细胞分裂从而促进组织分化,最后引起不定芽的分化和形成;另一种是在没有机械损伤处也能产生不定芽,即不定芽的出现不以出现机械损伤为前提。对于葡萄柚,无论是上胚轴还是下胚轴,不定芽均在有机机械损伤的两端切面产生,没有机械损伤的部位没有不定芽的产生,证明葡萄柚无菌实生苗上、下胚轴不定芽的发生是以发生机械损伤为前提条件的。

离体培养条件下不定芽的生根通常须有生长素的诱导,NAA、IBA是诱导生根效果较好且十分常用的2种生长素。葡萄柚不定芽生根试验采用NAA进行不定根的诱导,以培养基1/2 WPM+NAA 1.5 mg/L+AC 0.1%+蔗糖40 g/L的生根率最高,生根率达73.33%,生根数为1.91条/株,根系粗壮;生根试验中生根苗主根上普遍只有少量侧根(0~3条)长出,不利于移栽后生根苗的存活,这可能与葡萄柚的基因型有关。关于如何诱导葡萄柚的离体芽苗长出有大量侧根的根系,还须要作进一步研究。

参考文献:

- [1] 杨连珍. 葡萄柚概述[J]. 热带作物研究,1996(1):67-71.
- [2] 姜超强,刘惠民. 云南引进葡萄柚品种叶片营养分析[J]. 山东林业科技,2007(1):4-6.
- [3] 吴海波,刘惠民. 葡萄柚的栽培及研究概况[J]. 经济林研究,2005,23(1):69-73.
- [4] 史海芝,刘惠民,李贤忠. 引进美国葡萄柚果实营养分析[J]. 山东林业科技,2009(2):28-31.
- [5] 敖小平,熊兴耀,胡新喜,等. 高效的“大红”甜橙实生苗上胚轴离体培养与植株再生体系的建立[J]. 植物生理学通讯,2007,43(4):689-692.
- [6] 胡新喜,敖小平,邓子牛,等. 成年态柑橘再生体系研究初报[J]. 湖南农业科学,2008(2):11-13.
- [7] 张俊娥,邓秀新. 柑橘愈伤组织植株再生及其倍性鉴定[J]. 华中农业大学学报,2007,26(2):237-238.
- [8] 张家银,郭琛,谢玉明,等. 桢柑成年节间茎段再生体系的建立[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2008,34(2):182-185.
- [9] 曾艳,邹利娟,苏智先,等. 坪山柚上胚轴离体再生体系的建立[J]. 热带亚热带植物学报,2010,18(3):298-303.
- [10] 曾艳,苏智先,邹利娟,等. 强德勒红心柚离体培养与植株再生体系的建立[J]. 武汉植物学研究,2010,28(2):218-223.
- [11] 徐海峰,栾爱业,曾黎辉,等. 雪柑试管苗不定根高频率诱导和高效再生体系的建立[J]. 江西农业大学学报,2007,29(1):148-151.
- [12] 金建涛,赖钟雄,刘生财,等. 尤溪金柑离体再生体系优化及试管苗保存[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2014,43(3):256-262.
- [13] 李俊明,朱登云. 植物组织培养教程[M]. 3版. 北京:中国农业大学出版社,2005,20.
- [14] 徐晓峰,黄学林. TDZ:一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学通报,2003,20(2):227-237.
- [15] Lata H, Chandra S, Wang Y H, et al. TDZ-induced high frequency plant regeneration through direct shoot organogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni; an important medicinal plant and a natural sweetener [J]. American Journal of Plant Science, 2013, 4:117-128.
- [16] Basalma D, Uranbey S, Gurlek D, et al. TDZ-induced plant regeneration in *Astragalus cicer* L. [J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(8):955-959.
- [17] Shi X L, Han H P, Shi W L, et al. NaCl and TDZ are two key factors for the improvement of *in vitro* regeneration rate of *Salicornia europaea* L. [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2006, 48(10):1185-1189.
- [18] Basalma D, Uranbey S, Mirici S, et al. TDZ × IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and *in vitro* multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(8):960-966.
- [19] Schulze J. Improvements in cereal tissue culture by thidiazuron; a review [J]. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology, 2007, 1(2):64-79.
- [20] Ahmed M R, Anis M. Role of TDZ in the quick regeneration of multiple shoots from nodal explant of *Vitex trifolia* L.—an important medicinal plant [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 168(5):957-966.
- [21] 曾静,杨晓红,刘奕清,等. TDZ/NAA对尾赤桉茎段愈伤分化及植株再生的影响[J]. 西南大学学报(自然科学版),2010,32(10):87-90.
- [22] 段艳欣,郭文武. TDZ对柑橘胚性组织生长于遗传转化的影响[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版),2014,31(3):187-190.
- [23] 朱昌叁,庞正轰,冯立新,等. TDZ对西南桦组织培养的影响[J]. 广东农业科学,2013(22):70-74,2.
- [24] 袁玉辉,杨柳,刘显军,等. 6-BA和AgNO₃对芥菜型油菜下胚轴芽再生的影响[J]. 作物研究,2013,27(2):121-124.
- [25] 胥宇建,孟箭,张鲁刚,等. 不同激素配比和AgNO₃对两种基因型大白菜子叶离体再生的影响[J]. 植物生理学通讯,2010,46(6):564-570.
- [26] 何雍琴,迟淑娟,杨正安,等. 不同浓度6-BA和AgNO₃对甘蓝叶片不定芽分化的影响[J]. 云南农业大学学报,2011,26(3):345-347,363.
- [27] 陈世昌. 植物组织培养[M]. 北京:高等教育出版社,2011,33.
- [28] 贺红,潘瑞炽,何亚文,等. 蕉柑组织培养与植株再生的研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版),1997(4):63-66.
- [29] 董高峰,黄涛,李耿光,等. 沙田柚不同外植体离体培养与植株再生的研究[J]. 武汉植物学研究,2001,19(5):440-444.
- [30] 陈敏艳,梁宗锁,王喆之,等. 地黄组织培养及植株再生的研究[J]. 西北植物学报,2004,24(6):1083-1087.