



珍稀濒危植物组织培养研究进展

吴安湘, 金晓玲, 熊芳

(中南林学院, 长沙 410004)

摘要: 本文总结了我国一、二级保护植物的组织培养研究现状, 分析了已有组织培养报道的珍稀植物在外植体选择和分化途径上的特点, 并从基本培养基、激素及附加营养成分等方面分析了珍稀植物组织培养的影响因素; 提出了在珍稀濒危植物组织培养研究和实际应用中存在的问题。

关键词: 濒危植物; 组织培养; 分化; 基本培养基; 植物激素

中图分类号: Q813.1 **文献标识码:** A

Research Advances about Tissue Culture of Endangered Plants in China

WU An-xiang, JIN Xiao-ling, XIONG Fang

(Central South Forestry University, Changsha 410004, China)

Abstract: The paper summarizes the situation about tissue culture of Grades 1 and 2 protected plants in China, analyzes the characteristics about explant choices and differentiations of precious and endangered plants and discusses affecting factors of tissue culture of precious and endangered plants from the angles of basal medium, hormone and additional nutrient. It points out the problems that currently exist in research and practical application of tissue culture of precious and endangered plant.

Key words: endangered plant; tissue culture; differentiation; basal medium; phytohormone

珍稀濒危植物在自然环境下都有结实率低、年际波动大、大小年明显等特征。加上动物取食未成熟和地表种子, 以及埋藏于地下的种子易于腐烂等特点, 致使珍稀树种种子的自然繁殖能力极弱, 种群数量日趋减少。且实生苗的遗传性状不稳定, 苗木良莠不齐, 生产力低等诸多缺点, 利用实生苗育苗远远不能满足市场需求。

利用组织培养方法对珍稀植物进行快繁研究, 不仅可以克服种子繁殖中存在的诸多问题, 而且可以克服常规无性繁殖速度慢、繁殖率低的缺点。加上组织培养不受季节、气候等因素的制约, 节省土地, 速度快, 质量高, 技术密集, 便于集约化管理和工厂化生产的优点。因此, 将植物组织培养技术应用于珍

稀植物的快速繁殖, 对保护珍稀树种的种质资源, 丰富园林植物多样性, 缓解国内优质木材和园林绿化植物供应紧张的状况, 都具有重要的理论意义和实际应用价值。本文拟从珍稀植物组织培养外植体的选择和分化途径上、基本培养基、激素及附加营养成分的使用等方面来探讨组织培养技术在珍稀植物中的研究现状和实际应用中存在的问题。

1 珍稀植物组织培养的研究概况

由于生态环境的恶化, 许多动植物的生存受到严重的威胁, 许多物种已濒临灭绝的危险。我国国家环境保护局和中国科学院植物研究所于 1987 年编写了《中国珍稀濒危保护植物名录植物(第一

收稿日期: 2005-09-07; 修改稿收到日期: 2005-12-21

基金项目: 国家林业局高技术项目(99-14); 湖南省农业综合开发办项目(200408)

作者简介: 吴安湘(1980—), 女(汉族), 湖南株洲人, 硕士研究生。E-mail: anan22@netease.com

册)》^[1],公布了8种国家一级保护植物,159种二级保护植物。

珍稀植物大多生境范围狭窄,大多生长在深山老林,与世隔绝,因此其应用和研究价值很容易被忽视,目前多数还停留在资源调查和就地保护的初级阶段。由于缺乏技术支持,加上资源稀少,其应用受到极大限制,也导致人们对它们的研究热情不高。在8种国家一级保护植物和159种二级保护植物中,目前仅有4种一级保护植物和19种二级保护植物

有组织培养成功的报道(表1)。在这些研究中,人参的体细胞胚培养和细胞培养技术都趋于成熟。但更多的尚处于起步阶段。

2 濒危植物组织培养的分化途径

表2列出了濒危植物组织培养的外植体种类和分化途径,由表2可以发现,濒危植物组织培养的分化途径也有器官发生途径和体细胞胚发生途径等两种。

表1 珍稀濒危植物组织培养研究进展

Table 1 Advances about tissue culture of precious and endangered plants of China

植物名称 Plant name	保护级别 Protection grade	参考文献 Reference
杪罗 <i>Alsophila spinulosa</i> (Wall. ex Hook.) Tryon	一级	程治英等 ^[3] , Goller K 等 ^[4]
珙桐 <i>Davidia involucrata</i> Baill.	一级	夏晗等 ^[5] , 罗世家等 ^[6]
人参 <i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.	一级	蔡苗等 ^[7] , Whei-Lan Teng 等 ^[8]
金花茶 <i>Camellia chrysantha</i> (Hu) Tuyama	一级	秦新明等 ^[9] , 李懋学等 ^[10]
鹿角蕨 <i>Platyserium wallichii</i> Hook.	二级	黄韶玲等 ^[11] , 王承义等 ^[12]
海南粗榧 <i>Cephalotaxus mannii</i> Hook. f.	二级	符文英等 ^[13]
银杏 <i>Ginkgo biloba</i> L.	二级	Laurain 等 ^[14] , 王莲辉等 ^[15]
白豆杉 <i>Pseudotaxus chienii</i> (Cheng) Cheng	二级	康强胜等 ^[16]
七子花 <i>Heptacodium miconioides</i> Rehd.	二级	刘鹏等 ^[17] , 蔡洁洁等 ^[18]
裸果木 <i>Gymnocarpus przewalskii</i> Maxim.	二级	汪之波等 ^[19]
金铁锁 <i>Psammosilene tunicoides</i> W. C. Wu et C. Y. Wu	二级	欧阳志勤等 ^[20]
半日花 <i>Helianthemum soongoricum</i> Schrenk	二级	何丽君等 ^[21] , 李晶等 ^[22]
翅果油树 <i>Elaeagnus mollis</i> Diels	二级	闫桂琴等 ^[23]
杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	二级	杨振堂等 ^[24] , 蒋祥娥等 ^[25]
疣粒野生稻 <i>Oryza granulata</i> Nees et Arn. ex Hook. f.	二级	秦发兰等 ^[26] , 朱永生等 ^[27]
普通野生稻 <i>Oryza rufipogon</i> Griff.	二级	王亦菲等 ^[28]
核桃 <i>Juglans regia</i> L.	二级	刘兰英等 ^[29] , 田爱梅等 ^[30]
巴东木莲 <i>Manglietia patungensis</i> Hu	二级	陈发菊等 ^[31]
伞花木 <i>Eurycorymbus cavaleriei</i> (Levl.) Rehd. et Hand. -Mazz.	二级	吴文娜等 ^[32]
野生荔枝 <i>Litchi chinensis</i> Sonn. var. <i>euspontanea</i> Hsue	二级	D. K. Das 等 ^[33]
云南山茶花 <i>Camellia reticulata</i> Lindl.	二级	庄承纪等 ^[34]
四合木 <i>Tetraena mongolica</i> Maxim.	二级	何丽君等 ^[35]
香果树 <i>Emmenopterys henryi</i> Oliv.	二级	谈锋等 ^[36]

2.1 器官发生途径

2.1.1 直接器官发生途径 以芽或带芽茎段为外植体直接诱导芽的萌发获得再生植株的珍稀植物有珙桐、金花茶、银杏、金铁锁、核桃、巴东木莲、伞花木、野生荔枝、云南山茶花和香果树。

蕨类植物杪罗和鹿角蕨采用孢子、幼孢子体为外植体,通过孢子繁殖途径形成再生植株。杪罗的孢子经过数月培养形成原叶体,精子器中的精子借助原叶体腹部的自由水,到达颈卵器,与卵结合发育成胚,而后萌发形成小苗。杪罗还可以通过无配子繁殖途径产生再生苗,将小原叶体切割下来培养,约60 d长出不定胚,又经过约30 d培养得到正常的无性孢子体苗或丛苗^[3]。

鹿角蕨幼孢子体培养4周后产生与兰花原球茎相似的绿色球状体(GGB),这种GGB原球茎可以继代获得大量的原球茎,又可再诱导GGB长出丛生苗^[11]。

2.1.2 间接器官发生途径 (1)以茎段或叶为外植体。以茎段或叶为外植体通过诱导愈伤组织,再诱导芽的再生途径的植物有人参、银杏、半日花、翅果油树和香果树等。

目前,海南粗榧、白豆杉的组织培养只是以提取次生代谢产物为目的,因此只要求诱导出愈伤组织,而未得到再生植株^[13,16],两者均以嫩茎嫩叶为外植体成功诱导出愈伤组织。杜仲组织培养的研究较为成熟,不仅以胚轴为外植体通过诱导愈伤组织途径

表 2 珍稀濒危植物组织培养技术概况

Table 2 General situation in tissue culture of precious and endangered plants of China

植物名称 Plant name	外植体 Explants	分化途径 Differentiation pathway	主要培养基 Main medium	分化程度 Differentiation result
桫欏 ^[3] <i>Alsophila spinulosa</i>	孢子	孢子繁殖、愈伤组织	改良 1/10 MS+2.4-D 2.0	小植株
珙桐 ^[37] <i>Davidia involucreata</i>	冬芽	芽	出芽:1/2 MS+BA 1.5+IBA 1.0;增殖: N_6 +BA 1.0+GA 2.0;生根:1/8 MS+BA 0.1+NAA 1.0+活性炭 0.5 g/L	小植株
金花茶 ^[38] <i>Camellia chrysantha</i>	子叶 茎尖、单芽	不定芽、假珠芽 芽	1/2 MS+BA 0.2+NAA 0.2 MS+BA 2.0+KT 0.5	小植株
人参 ^[39] <i>Panax ginseng</i>	叶片、叶柄、花冠柄、根、花药	愈伤组织、体细胞胚、原生质体	诱导愈伤组织:MS+2,4-D+NAA+10%椰乳;诱导根、芽:67-V+2,4-D 1.5+VB ₁ 5.0+IAA 5.0;诱导枝叶:67-V+2,4-D 0.5+KT 0.2~0.5	小植株
鹿角蕨 ^[11,12] <i>Platycerium wallichii</i>	幼孢子体	GGB 原球茎	诱导 GGB:MS+BA 0.05+IBA 0.05;诱导丛生芽:MS+IAA 0.25;生根:无激素 1/2 MS	小植株
海南粗榧 ^[43] <i>Cephalotaxus mannii</i>	嫩茎、嫩叶	愈伤组织	愈伤组织的诱导:MS+BA 0.1+NAA 1.0+2,4-D 2.0;增殖:MS+KT 0.1+NAA 3.0	愈伤组织
银杏 <i>Ginkgo biloba</i>	茎段、茎尖 ^[15] 成熟胚 ^[10] 幼叶 ^[11]	芽、愈伤组织 胚的萌芽 愈伤组织	启动:MS+0.1 NAA;分化:MS+BA 1~5+NAA 0.1~0.5+10%椰乳+0.1%~0.2%活性炭;继代:MS+BA 1~3+NAA 0.2+0.1%~0.2%活性炭;生根:1/2 MS+IBA 1.0 67-V+活性炭 3.0 g/L+水解乳蛋白 1.0 g/L+Vc 100 mg/L MS+BA 2.0+NAA 3.0	小植株 愈伤组织
白豆杉 ^[16] <i>Pseudotsuga chienii</i>	嫩茎、嫩叶	愈伤组织	MS+NAA 0.1~10	愈伤组织
七子花 <i>Heptacodium miconioides</i>	冬芽、嫩叶 ^[17] 花 ^[18]	愈伤组织 愈伤组织	MS+2,4-D 2.0+ZT 2.0 MS+BA 1.0+2,4-D 0.6	愈伤组织 小植株
裸果木 ^[19] <i>Gymnocarpus przewalskii</i>	下胚轴	愈伤组织	愈伤组织的诱导:MS+BA 1.0+NAA 0.5;分化:MS+BA 1.0;生根:无激素 1/2 MS	小植株
金铁锁 ^[20] <i>Psammosilene tunicoides</i>	茎尖、带芽茎段	芽	芽的诱导:MS+BA 1.0+IAA 0.1;增殖:MS+BA 0.5+IAA 0.05;生根:MS+NAA 1.5	小植株
半日花 <i>Helianthemum soongoricum</i>	子叶 ^[22] 茎、叶 ^[12]	愈伤组织 愈伤组织、体细胞胚	愈伤组织的诱导:MS+BA 0.2+NAA 10;分化:MS+BA 2.0+NAA 0.2;生根:1/2 MS+NAA 0.5 愈伤组织的诱导:MS+BA 1.0+IAA 10;胚状体、芽的诱导:MS+BA 1.0+IAA 5.0	小植株 小植株、胚状体
翅果油树 ^[23] <i>Elaeagnus mollis</i>	茎、子叶	愈伤组织	愈伤组织的诱导:MS+0.5 BA+0.04 NAA;分化:MS+BA 0.5+NAA 0.02;生根:1/2 MS+LH 300+IBA 5.0+NAA 0.02+GA 0.2	小植株
杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i>	子叶、胚轴 ^[13] 胚轴 ^[25]	愈伤组织 愈伤组织	愈伤组织的诱导:MS+2,4-D 2.0 愈伤组织的诱导:MS+BAP 0.8+NAA 0.1;分化:MS(1/2 N)+BAP 1.5+谷氨酰胺 12;生根:MS(1/2 N)+IBA 1.5	愈伤组织 小植株
疣粒野生稻 ^[27] <i>Oryza granulata</i>	种子	愈伤组织、原生质体	愈伤组织的诱导: N_6 +2,4-D 2.0;继代:NB+2,4-D 2.0+PG 7 mL/L;胚性细胞悬浮培养:液体 AA+2,4-D 2.0;预分化: N_6 +BA 2.0+KT 1.0+蔗糖 60 g/L;分化: N_6 +BA 1.0+KT 1.0+蔗糖 30 g/L;生根:1/2 MS+NAA 0.5	小植株
普通野生稻 ^[28] <i>Oryza rufipogon</i>	种子	愈伤组织	愈伤组织的诱导:MS+2,4-D 2.0+BA 0.2;分化:MS+BA 2.0+IAA 1.0	小植株
核桃 ^[29] <i>Juglans regia</i>	带芽茎段	芽	芽的诱导:1/2 DKW+BA 1~2+IBA 0.01+2~5 Vc; 丛生芽的诱导:DKW+BA 2+NAA 0.5+GA 0.5;壮苗:DKW+BA 1~2+IBA 0.01;生根:1/2 DKW+IBA 2+NAA 2	小植株
巴东木莲 ^[31] <i>Manglietia patungensis</i>	冬芽	芽	芽的分化:MS+0.5 BA;丛生芽的诱导:MS+BA 2.0+IAA 0.5+GA 0.5+10%椰乳;生根:1/2 MS+IBA 0.5+BA 0.05+5%活性炭	小植株
伞花木 ^[32] <i>Eurycorymbus cavaleriei</i>	顶芽、下胚轴	芽、愈伤组织	芽、愈伤组织的诱导:MS+BA 2.0+IBA 0.5;生根:MS+IBA 2.0+BA 0.2	小植株
野生荔枝 ^[33] <i>Litchi chinensis</i> Sonn. var. <i>euspontanea</i>	种子	实生	浸没纸桥液体 MS+20 BA	小植株
云南山茶花 ^[31] <i>Camellia reticulata</i>	茎尖	芽	芽的诱导:MS+BA 3.0+NAA 1.0;生根:浸没-纸桥生根法,0.5 g/L IBA 处理 20~30 min,转入 MW 液体培养基	小植株
四合木 ^[35] <i>Tetraena mongolica</i>	子叶、胚轴、根	愈伤组织、体细胞胚	愈伤组织的诱导:MS+2,4-D 0.25+BA 0.1;体细胞胚的诱导:MS+2,4-D 0.1+BA 0.25	小植株
香果树 ^[36] <i>Emmenopterys henryi</i>	芽、叶	芽、愈伤组织	愈伤组织、丛生芽的诱导:MS+BA 0.5+IBA 0.5;生根:1/2 MS+IBA 0.5	小植株

注:激素浓度单位均为 mg/L。Note: The unit of hormone is mg/L.

获得了完整的再生植株,而且以子叶、胚轴、茎、叶为外植体,诱导出适于悬浮培养的愈伤组织,为提取有效药用成分和杜仲胶奠定了基础^[24,43]。

(2) 以种子胚、子叶为外植体。金花茶以胚为外植体,先长根再抽出新芽;以子叶为外植体,同时诱导出不定芽和假珠芽,假珠芽具有很强的分生能力,利用假珠芽,又可诱导产生胚状体、不定芽和假珠芽。银杏、裸果木、半日花、翅果油树、杜仲、疣粒野生稻、普通野生稻、伞花木、四合木等都可以种子胚轴或子叶为外植体,通过诱导愈伤组织途径形成再生植株。

(3) 以孢子为外植体。蕨类植物桫欏的孢子经过数月培养形成原叶体,原叶体在细胞分裂素与生长素为 10:1 的培养基上培养,形成长丝状体构成空心的半圆形愈伤组织团,约经 3 个月在绿色丝团上长出幼孢子体或仅长根;在高盐浓度的培养基上补加高剂量的生长素,培养的原叶体形成坚实致密的实心愈伤组织团块,由褐色愈伤组织相间少量再生绿色原叶体,在愈伤组织的凹陷处产生单个或丛状黄绿色球形不定胚,进而发育为不定苗。

2.2 体细胞胚发生途径

植物体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis)是指单倍体或双倍体的体细胞在特定条件下,未经性细胞融合而通过与合子胚胎发生类似的途径发育出新个体的形态发生过程。

以人参胚为外植体,通过间接、直接发生途径均产生了体细胞胚^[7]。以半日花的叶为外植体,通过间接发生途径产生了体细胞胚^[42]。何丽君等以四合木子叶、胚轴和根为外植体,通过间接发生途径均诱导出了体细胞胚并形成了再生植株^[35]。

3 珍稀植物组织培养的影响因素分析

3.1 基本培养基

珍稀植物组织培养的基本培养基种类较多(表 2),但仍以最常用的 MS 培养基居多,或者是 NH_4NO_3 减半的改良 MS 培养基,或采用的是 1/2 MS 或 1/10 MS。多数植物的生根培养为 1/2 MS。在所有这些植物的培养过程中,MS 培养基的使用率达到了 74.6%。

N_6 和 67-V^[39,40] 也是比较常用的培养基,它们的使用率分别为 6% 和 4.5%。 N_6 主要应用于珙桐、疣粒野生稻的组织培养,67-V^[39,40] 在人参及银杏胚外植体的萌发中取得成功。另外,DKW^[29]、NB^[27] 等培养基也用到了珍稀植物的组织培养中。

3.2 激素及附加营养物质

在植物组织培养过程中,加入细胞分裂素可以促进细胞分裂和由愈伤组织或器官上分化不定芽^[44],在珍稀植物愈伤组织或芽的诱导阶段,有 85% 的植物使用了 6-苄基腺嘌呤(BA),浓度多为 0.05~3.0 mg/mL,只有野生荔枝的种子萌发的培养 BA 的浓度达到了 20 mg·mL⁻¹。

一般情况下,BA 与较低浓度的生长素 NAA、IBA、2,4-D 等配合使用能有效地促进分化,但在半日花的愈伤组织的诱导过程中,IAA 或 NAA 的浓度高达 10 mg/L,而 BA 的浓度则相对较低,两者配合使用能使诱导率达到 91.3%^[22,42]。

50% 的珍稀植物的组培生根培养只需单独添加生长素 IBA 或 NAA 就能有效地诱导生根,二者单独使用率分别为 28.6% 和 21.4%,它们的浓度多为 0.5~2.0 mg/mL;二者共同作用诱导生根的占 14.3%,这些植物是翅果油树、核桃等;珙桐、巴东木莲等植物则需要添加 BA 与生长素协同作用诱导生根,这类植物占 21.4%;鹿角蕨、裸果木不需添加任何激素即可生根,这类植物占 14.3%。

椰乳、水解乳蛋白、谷氨酰氨等营养物质也被用于珍稀植物的组织培养中。陈发菊^[31]等在研究巴东木莲的丛生芽诱导过程中发现,在其它条件相同的情况下,在含有 10% 椰乳的培养基上单芽苗再产生许多小突起后,小突起逐渐长大形成丛生芽苗,而不含椰乳的培养基上的芽基部小突起生长缓慢,继续培养多数芽萎缩褐化,仅少数能形成丛生芽苗。

3.3 C 源

植物组织培养的蔗糖浓度多在 2%~3%,而金花茶胚培养需要 6%~8% 的蔗糖。相反,桫欏孢子萌发培养时,糖浓度越高萌发率越低,无糖时萌发最早,萌发率最高^[3]。原生质体培养中,糖类不仅提供 C 源,还起着稳定渗透压的作用^[44]。疣粒野生稻的原生质体培养过程中,蔗糖、葡萄糖浓度随培养阶段要有所调整,预分化时采用 60 g/L 的蔗糖浓度可促进愈伤组织长成致密小块,诱导胚胎形成,分化时蔗糖浓度降低至 30 g/L。

4 小结与展望

已有组培报道的 23 种植物的组培研究,除了人参、银杏等少数植物相对较成熟以外,其它的还处于初步探索阶段,大多数植物的诱导率、增殖率、生根率等都不高,离实际应用还有一定的距离;体细胞胚胎发生、细胞培养、原生质体培养的研究更是有待于

加强。因此,无论从广度还是深度来看,珍稀植物的组织培养还有相当多的环节需要研究。

珍稀植物组织培养研究的前景十分广阔,很多珍稀植物都是具有很高的经济价值和造园价值。例如一级保护植物珙桐,是世界著名的观赏植物,有“中国鸽子树”的美称,但由于珙桐生境狭窄,很难在低海拔和高温地区存活,加上要 10~15 a 才开花结

实,这就大大限制了珙桐在园林绿化中的应用。如将珙桐成功引种,再利用组织培养技术进行大规模的繁殖,将有可能使世界著名的“中国鸽子树”广泛应用于园林绿化中。因此,通过组培快繁技术实现珍稀植物的大规模的生产,不但可以提高它们的应用价值,而且对物种资源的保护和种群的扩大有着重大的意义。

参考文献:

- [1] 国家环境保护局,中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危保护植物名录植物(第一册)[M]. 北京:科学出版社,1987:2.
- [2] LUO SH W(罗士韦). Callus culture of *Panax ginseng*[J]. *Plant Physio. Commun.* (植物生理学通讯),1964,2:26(in Chinese).
- [3] CHENG ZH Y(程治英),ZHANG F L(张凤雷),LAN Q Y(兰芹英). Study on the propagation and conservation of germplasm in *alsophila spinulosa*[J]. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究),1991,2(13):181-188(in Chinese).
- [4] GOLLE K,RYBCZYNSKI J J. *In vitro* culture used for woody fern *Cyathea australis* (R. Br.) Domin vegetative propagation[J]. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*,1995,64(1):13-17.
- [5] XIA H(夏 晗),ZHANG J(张 健),SHANG X L(尚旭岚),LI X W(李贤伟). Initial culture of *Davidia involucreta*[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*(四川农业大学学报),2003,21(4):356-358(in Chinese).
- [6] LUO SH J(罗世家),ZHOU G L(周光来),WANG J M(王建明). Study on tissue culture of the bud of *Davidia involucreta*[J]. *Journal of Hubei Institute for Nationalities*(Nat. Sci. Ed.) (湖北民族学院学报·自然科学版),2003,21(4):11-13(in Chinese).
- [7] CAI ZH(蔡 茁),HAN D(韩 东). Consumption of N,P and K in Ginseng tissue culture[J]. *J. J.L. Mil. Med. Coll. FMMU*(第四军医大学吉林军医学院学报),2003,25(2):82-84(in Chinese).
- [8] WHEI-LAN TENG, TIFFANY S, MIN-CHIANG T. Explant preparation affects culture initiation and regeneration of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,2002,68(3):233-239.
- [9] QIN X M(秦新民),LIANG Q H(梁倩华). A comparative study on karyotypes in three species of the genus *camellia* and their regenerated plants in tissue culture[J]. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究),1991,13(1):51-57(in Chinese).
- [10] LI M X(李懋学),YOU R L(尤瑞麟),BAI W L(白文力),CHENG J SH(程金水). Somatic meiosis of anther callus culture in *Camellia petelotii*[J]. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究),1994,16(3):263-267(in Chinese).
- [11] HUANG SH L(黄韶玲),ZHANG J L(张洁莲). Tissue culture of *Platycerium bifurcatum*[J]. *Plant Physio. Comm.* (植物生理学通讯),1993,29(1):46-47(in Chinese).
- [12] WANG CH Y(王承义),WANG Y(王 颖). Tissue culture of *Platycerium bifurcatum*[J]. *Quarterly of Forest By-product and Speciality in China*(中国林副特产),2000,3:23-24(in Chinese).
- [13] FU W Y(符文英),DU D L(杜道林),FU M J(符木均). Callus induction and culture of *Cephalotaxus mannii*[J]. *Plant Physio. Commun.* (植物生理学通讯),2004,40(1):34-36(in Chinese).
- [14] LAURAIN D, CHENIEUX J C, TREMOUILLAUX G, UILLER J. Somatic emtryogenesis from immature embryos of *Ginkgo biloba*[J]. *Plant Cell Tissue Cult.*,1996,12:19-24.
- [15] WANG L H(王莲辉),DENG L L(邓龙玲). Study on rapid production and virus-free technology of *Ginkgo biloba*[J]. *Chinese Wild Plant Resources*(中国野生植物资源),2003,22(2):53-55(in Chinese).
- [16] KANG Q SH(康强胜),LU D Y(卢大炎),LI J(李 俊),LI H L(李洪林),WU Y L(吴玉兰). Cell culture of *Pseudotsax chinensis* (Cheng) Cheng. [J]. *Journal of Plant Resources and Enviroment*(植物资源与环境),1999,8(4):59-60(in Chinese).
- [17] LIU P(刘 鹏),XU G D(徐根娣),ZHANG J(张 杰). Preliminary studies on callus inducement of *Heptacodium miconioides* Rehd. [J]. *Journal of Beijing Forestry University*(北京林业大学学报),2001,23(6):63-65(in Chinese).
- [18] CAI J J(蔡洁洁),XU D Q(徐冬青),ZHANG Y Q(章月琴). The effects of different flower organs of *Heptacodium miconioides* on the callus inducement[J]. *Subtropical Plant Science*(亚热带植物科学),2004,33(3):34-36(in Chinese).
- [19] WANG ZH B(汪之波),GAO Q X(高清祥),SUN J ZH(孙继周). Tissue culture and plant regeneration of rare plant *Gymnocarpus preze-walskii*[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报),2004,24(7):1 319-1 321(in Chinese).
- [20] OUYANG ZH Q(欧阳志勤),HUANG J L(黄家林),HU H(胡 虹). *In vitro* culture and rapid propagation of *Psammosilene tunicoides* [J]. *Plant Physio. Commun.* (植物生理学通讯),2002,38(4):361(in Chinese).
- [21] HE L J(何丽君). Tissue culture and process regulation and control of an endangered plant *Helianthemum songaricum*[J]. *Inner Mongol-ia Prataculture*(内蒙古草业),2000,4:52-57(in Chinese).

- [22] LI J (李 晶), JIA J F (贾敬芬). Tissue culture and plant regeneration of *Helianthemum soongoricum* [J]. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica* (实验生物学报), 2003, **36**(4): 318—322 (in Chinese).
- [23] YAN G Q (闫桂琴), ZHANG W (张 伟), ZHANG Y SH (张育盛). Study of tissue culture techniques on depoison test-tube-plantlet of *Elaeagnus mollis* [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2003, **23**(7): 1 297—1 303 (in Chinese).
- [24] YANG ZH T (杨振堂), ZANG P (臧 埔), HU G ZH (胡桂珍), MA SH Q (马淑琴). A study on relation between medium and gutta content in tissue culture of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research* (特产研究), 1999, 1: 1—5 (in Chinese).
- [25] 蒋祥娥, 汪建亚. 杜仲组织培养技术的研究 [J]. 湖北林业科技, 2000, 增刊: 96—98.
- [26] QIN F L (秦发兰), CHEN B T (陈葆棠), ZHU Y SH (朱永生), LIN X H (林兴华), ZHANG D P (张端品). Study on inducement of embryogenic callus from *Oryza meyeriana* and plantlets regeneration [J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2001, **34**(5): 560—563 (in Chinese).
- [27] ZHU Y SH (朱永生), CHEN B T (陈葆棠), QIN F L (秦发兰), ZHANG D P (张端品). Plantlets regeneration from protoplasts of wild rice *Oryza meyeriana* [J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2002, **35**(12): 1 556—1 559 (in Chinese).
- [28] WANG Y F (王亦菲), HUANG J H (黄健华), YE M M (叶鸣明), QU ZH C (曲志才), CHEN Y Q (陈永青). Establishment of *in vitro* asexual propagation lines of wild rice (*Oryza rufipogon* and *O. meyeriana*) [J]. *Acta Agriculturae Shanghai* (上海农业学报), 1999, **15**(4): 10—12 (in Chinese).
- [29] LIU L Y (刘兰英). Tissue culture and rapid propagation of *Juglans regia* [J]. *Plant Physio. Commun.* (植物生理学通讯), 2000, **36**(5): 434—435 (in Chinese).
- [30] TIAN A M (田爱梅), WANG G Q (王国强). Study on factors affecting tissue culture of axillary shoots of seedling walnut [J]. *J. of China Three Gorges Univ.* (Natural Sciences Edition) (三峡大学学报·自然科学版), 2002, **24**(4): 375—378 (in Chinese).
- [31] 陈发菊, 张丽萍. 长江三峡珍稀植物——巴东木莲冬芽的组织培养 [J]. *Chinese Bulletin of Biol.* (生物学通报), 2000, **35**(6): 36—37 (in Chinese).
- [32] WU W SH (吴文娜), ZHANG Q Q (张清其). The study on tissue culture of *Eurycorymbus cavaleriei* [J]. *Fujian Science & Technology of Tropical Crops* (福建热作科技), 1998, **23**(1): 1—3 (in Chinese).
- [33] DAS D K, N SHIVA P, BHALLA-SARIN N. Multiple shoot induction and plant regeneration in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) [J]. *Plant Cell Reports*, 1999, **18**(7—8): 691—695.
- [34] ZHUANG CH J (庄承纪), ZHOU J K (周建葵). Study on formation of the multiple-buds and rooting from shoot tips of *Camellia reticulata* L. *in vitro* [J]. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica* (实验生物学报), 1997, **30**(1): 1—11 (in Chinese).
- [35] HE L J (何丽君). Study on tissue culture in rare endangered plant *Tetraena mongolica* Maxim. [J]. *Inner Mongolia Prataculture* (内蒙古草业), 2001, 2: 7—10 (in Chinese).
- [36] TAN F (谈 锋), LIU Y CH (刘玉成), WANG X L (王晓龙). Rapid propagation of *Emmenopterys henryi* [J]. *Journal of Southwest China Teachers University* (Natural Science Edition) (西南师范大学学报·自然科学版), 1992, **17**(2): 260—263 (in Chinese).
- [37] 夏 晗. 珙桐组织培养技术体系研究 [D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2003: 5.
- [38] 彭彩霞, 谭辉同. 金花茶的繁殖 [J]. 广西农业科学, 2002, 5: 272—279 (in Chinese).
- [39] SARITA ARYA, LIU J R, TAGE ERIKSSON. Plant regeneration from protoplasts of *Panax ginseng* (C. A. Meyer) through somatic embryogenesis [J]. *Plant Cell Reports* (Historical Archive), 1991, **10**(6—7): 277—281.
- [40] LUO Y Y (罗言云), JIA Y J (贾勇炯), CAO Y L (曹有龙), LIU J M (刘 娟). *In vitro* culture of mature embryos of *Ginkgo biloba* L. [J]. *Journal of Sichuan University* (Natural Science Edition) (四川大学学报·自然科学版), 1999, **36**(3): 573—577 (in Chinese).
- [41] JIANG L (姜 玲), ZHANG W C (章文才). Reaserch on some kinds of hormones induce callus of *Ginkgo biloba* [J]. *China Fruits* (中国果树), 1998, 2: 30—31 (in Chinese).
- [42] CI ZH L (慈忠玲), ZHANG H (张 衡), LIU L Y (刘玲玉). Culture of *Helianthemum soongolicum*——A kind of surviving plant of the ancient mediterranean [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Neimongol* (Natural Science Edition) (内蒙古大学学报·自然科学版), 1995, **26**(5): 616—620 (in Chinese).
- [43] WANG J L (王俊丽), DU J F (杜建芳), GENG Y (耿 钰). Study on callus culture of *Eucommia ulmoides* [J]. *Economic Forest Reserches* (经济林研究), 1996, **14**(4): 34—35 (in Chinese).
- [44] 李俊明. 植物组织培养教程 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1992.