

Study on Callus Induction and Tissue Culture Regeneration *In Vitro* of *Dracocephalum rupestre*

Guozhen Zhang^{1,2*}, Xiaodong Shi^{2*}, Pan Han^{3*}, Tingwei Dai³, Jie Xie⁴, Xiaobo Qin^{1,2,3#}, Bei Niu^{2#}, Lijuan Fan^{1,3}, Fei Wang³

¹Sichuan Natural Resource Institute, Chengdu Sichuan

²Key Laboratory of Coarse Cereal Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu University, Chengdu Sichuan

³Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu Sichuan

⁴College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu Sichuan

Email: [#]qxb_2003@163.com, [#]365421402@qq.com

Received: Oct. 28th, 2019; accepted: Nov. 22nd, 2019; published: Nov. 29th, 2019

Abstract

Through the study of callus culture, adventitious bud induction and tissue culture seedling regeneration from the leaves of Tibetan medicine *Dracocephalum rupestre*, the regeneration system with short culture cycle and high regeneration efficiency was developed. The design and analysis of multivariate experiments showed the optimum medium for callus induction was MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L IAA. By comparing the effects of cytokinin 6-BA, KT and TDZ on induction of adventitious bud differentiation, it was found that the optimum medium for adventitious bud regeneration was MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L TDZ + 0.1 mg/L IBA. Finally, adding 0.1 mg/L NAA to MS medium could effectively make regenerated seedlings produce roots, and the efficiency was more than 70%.

Keywords

Dracocephalum rupestre, Callus, Regeneration, Plant Growth Hormone

毛建草愈伤组织诱导与离体组织再生繁育研究

张国珍^{1,2*}, 时小东^{2*}, 韩攀^{3*}, 代庭伟³, 谢洁⁴, 秦小波^{1,2,3#}, 牛蓓^{2#}, 樊莉娟^{1,3}, 王菲³

¹四川省自然资源科学研究院, 四川 成都

*共同第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 张国珍, 时小东, 韩攀, 代庭伟, 谢洁, 秦小波, 牛蓓, 樊莉娟, 王菲. 毛建草愈伤组织诱导与离体组织再生繁育研究[J]. 植物学研究, 2019, 8(6): 525-532. DOI: 10.12677/br.2019.86066

²成都大学农业农村部杂粮加工重点实验室, 四川 成都

³四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都

⁴四川师范大学生命科学学院, 四川 成都

Email: "qxb_2003@163.com, "365421402@qq.com

收稿日期: 2019年10月28日; 录用日期: 2019年11月22日; 发布日期: 2019年11月29日

摘要

通过对毛建草叶片产生愈伤组织的培养、不定芽的诱导及组培苗再生的研究, 建立了培养周期短、再生效率高的毛建草再生体系。利用多因子正交实验设计及分析, 筛选出最佳愈伤组织诱导培养基是MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L IAA。通过比较细胞分裂素6-BA、KT和TDZ对诱导愈伤组织分化不定芽的效果, 发现最适的不定芽再生培养基为MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L TDZ + 0.1 mg/L IBA。最后, MS培养基添加0.1 mg/L NAA能有效地使再生苗产生根系, 效率达70%以上。

关键词

毛建草, 愈伤组织, 再生, 植物生长激素

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

毛建草(*Dracocephalum rupestre* Hance), 作为唇形科(Labiatae)青兰属植物, 多年生草本, 具有典型的青兰属植物特征。其茎带紫色, 叶三角状卵形, 基部心形, 具圆齿。轮伞花序密集成头状, 稀穗状。花萼、花冠紫蓝色。主要分布于辽宁及华北、西北等地海拔 650~2 400 m (川西北、青海省达 3 100 m) 的高山草原、草坡或疏林下岩石裂隙中, 在内蒙古自治区主要分布于包头市九峰山阴山山脉, 是良好的野生种质资源[1]。毛建草, 全草具香气, 可入药, 也可代茶饮。据《内蒙古植物药志》记载, 其具有清热、解表、止痛的功效, 可用于治疗感冒头疼、咽疼、咳嗽、胸肋胀痛、黄疸性肝炎、吐血和痢疾等, 为蒙古族习用药材[2]。此外, 毛建草叶片中含有总糖、粗多糖、总黄酮、蛋白质、维生素 C、粗纤维和氮、磷、钾、钙、铁、镁、锰、铜、锌等物质; 其茎、叶通过现代工艺与传统工艺相结合, 生产茶叶、饮料及保健品等系列产品[3] [4]。近年来, 毛建草茶叶已走进各大餐馆, 深受消费者喜爱。毛建草适应性强, 花期长而且色泽艳丽, 故还可作为宿根花卉美化环境。

毛建草具有独特药用功效, 同时也是一种制茶原料, 野生资源过度开采导致毛建草资源匮乏, 濒临灭绝[5]。但毛建草种子小, 不易采集, 自然环境下, 种子萌发率不高, 致使其种子繁殖存在困难。毛建草的应用仍依靠野生资源, 不利于这一特殊药植物的保护, 因此开展毛建草的组织繁育研究是非常必要的, 是快速获得种苗, 推动人工种植的关键和基础。目前国内未见有针对毛建草开展的组织培养研究。在植物植株再生上, 可采用多种外植体, 包括茎段、胚轴, 叶柄、子叶、叶片、腋芽, 经由愈伤组织或是直接再生的方式获得再生植株。但毛建草因其药用效果, 组织中含有丰富的次生代谢物, 对组织培养有多种未知影响, 同科植物的相关组织培养方法均不能有效实现其组织再生。本研究

利用组织培养设计, 探讨不同植物生长激素及其不同浓度组合对毛建草叶片愈伤组织诱导、生长及不定芽发生的影响, 对其培养条件进行筛选, 为建立毛建草组织快繁体系, 规模化培养毛建草种苗, 推进人工栽培奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 植物材料

试验所需植物材料来源于四川、青海等地, 经鉴定为唇形科(Labiatae)青兰属植物毛建草(*Dracocephalum rupestre* Hance)。

2.2. 外植体的处理

叶片用清水冲洗干净, 再用 70% (V/V)酒精浸泡 15 s, 用无菌水清洗 3 次, 然后放入 0.5%的氯化汞(HgCl₂)溶液浸泡 3 min, 最后用无菌水冲洗干净。

2.3. 愈伤组织的诱导和继代培养

将无菌的叶片切成 1 cm² 的小块, 块中可带有中脉或是叶缘, 接入愈伤组织诱导培养基。愈伤组织诱导培养基配方为如下: MS [6] + 0.5~2.0 mg/L 6-BA, 或是 MS + 0.5~2.0 mg/L 6-BA + 0.1~0.5 mg/L 2,4-D + 0.1~0.5 mg/L IAA。愈伤组织诱导培养基附加有 3%蔗糖、0.7%琼脂粉, pH = 5.8, 室温 26℃。叶块分为 2 组, 一组置于光周期 16 h/8 h, 光照强度为 2000 Lx 中培养, 另一组暗培养, 均培养 20 d, 对比光培养与暗培养对愈伤组织的影响。愈伤组织诱导设计为 20 个叶块一个处理, 3 次重复。20 d 后, 将诱导出的愈伤组织切成 1.0 cm³ 的小块, 分成 2 组, 一组接入再生培养基诱导不定芽, 另一组转接入新鲜的愈伤组织诱导培养基中进行继代培养, 每 20 d 重复一次, 比较多次继代培养对愈伤组织的影响。

2.4. 不定芽的再生

将诱导出的愈伤组织接种到含有生长素 IBA(0.1 mg/L)的再生培养基上, 再生培养基中的细胞分裂素(CTK)为 0.05~0.5 mg/L TDZ 或 0.1~1.0 mg/L KT 或 0.1~1.0 mg/L 6-BA, 或是 2 种 CTK 的组合(表 3)。再生培养基附加有 3%蔗糖、0.7%琼脂粉, pH = 5.8, 室温 26℃, 光周期 16 h/8 h, 光照强度为 2000 Lx。20 个愈伤一个处理, 3 次重复, 1 月后统计不定芽数量。

2.5. 生根培养

不定芽达 2~3 cm 后, 转移至生根培养基, 生根培养基配方为 MS + 0.05~0.4 mg/L NAA 或 MS + 0.05~0.4 mg/L IBA, 筛选出最佳生根培养基后, 向其中添加预实验确定的浓度 0.1%(w)活性炭, 比较活性炭对生根的影响。20 个不定芽一个处理, 2 次重复, 1 个月后统计生根情况。

2.6. 再根苗的移栽

揭开三角瓶封口膜, 将生根的再生苗继续置于温室中培养 1 周。为避免培养基蒸腾失水, 需不定时向培养基加水。然后小心取出生根苗, 洗去依附于苗上的培养基, 将其移植于培养钵中, 基质为珍珠岩:沙:营养土 = 1:1:1 (V/V/V), 置于温室内, 用水浇透。待生根苗存活后, 再移出温室。

2.7. 计算方法

愈伤组织诱导率 = (愈伤组织块数/接种外植体数) × 100%

不定芽分化率 = (分化不定芽的愈伤组织块数/接种外植体数) × 100%

生根率 = (生根的不定芽数/接种的不定芽数) × 100%
对计算结果用 SPSS 软件进行差异显著性分析(邓肯氏最小显著差数测验)。

3. 结果与分析

3.1. 愈伤组织的诱导

3.1.1. 植物生长素对愈伤组织的诱导

将叶片接种到愈伤组织诱导培养基后, 7 d 内就会产生愈伤组织。表 1 显示, 6-BA 是诱导毛建草叶片产生愈伤组织的关键植物生长调节剂, 培养基中添加 6-BA, 可顺利诱导叶片出愈。随着 6-BA 浓度的升高, 叶片出愈率随之升高, 但愈伤组织的质地变得松散。浓度 1.0 mg/L 的 6-BA 能诱导 $80.77\% \pm 2.2\%$ 的叶片产生瘤状愈伤组织, 2.0 mg/L 的 6-BA 虽然也能诱导愈伤组织大量产生, 但愈伤组织质地疏松, 瘤状结构稀少, 再生能力差。添加 2,4-D 及 IAA 后发现, 浓度 0.2 mg/L 的 2,4-D 与浓度 0.2 mg/L 的 IAA 组合对毛建草叶片形成愈伤有促进作用。1.0 mg/L 6-BA 与 0.2 mg/L 2,4-D 及 0.2 mg/L IAA 的组合对诱导毛建草叶片产生瘤状愈伤组织的效果最佳, 诱导率高达 $92.75\% \pm 2.1\%$ (图 1(a))。

Table 1. Effect of plant growth regulators (PGRs) on callus induction from leaf of *Dracocephalum rupestre*
表 1. 植物生长调节剂对毛建草叶片愈伤组织诱导的影响

激素浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration of PGRs ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)			出愈率/% Callus induction rate(r/%)	愈伤组织形态 Morphology of callus
6-BA	2,4-D	IAA		
0.5	0	0	65.24 ± 4.0^b	紧实, 瘤状结构少
1.0	0	0	80.77 ± 2.2^a	紧实, 瘤状结构多
2.0	0	0	84.51 ± 4.2^a	疏松, 瘤状结构少
0.5	0.1	0.1	66.29 ± 1.3^b	紧实, 瘤状结构少
1.0	0.2	0.2	92.75 ± 2.1^a	紧实, 瘤状结构多
2.0	0.5	0.5	76.45 ± 1.9^a	疏松, 瘤状结构少
0.5	0.5	0.5	63.07 ± 1.5^b	紧实, 瘤状结构少
1.0	0.1	0.1	82.36 ± 2.2^a	紧实, 瘤状结构多
2.0	0.2	0.2	77.05 ± 2.0^a	疏松, 瘤状结构少
0.5	0.2	0.2	69.12 ± 1.3^b	紧实, 瘤状结构少
1.0	0.5	0.5	79.05 ± 2.0^a	紧实, 瘤状结构多
2.0	0.1	0.1	74.54 ± 1.8^a	疏松, 瘤状结构少
0.5	0.1	0.5	68.14 ± 1.6^b	紧实, 瘤状结构少
1.0	0.2	0.1	88.25 ± 2.2^a	紧实, 瘤状结构多
2.0	0.5	0.2	70.85 ± 2.0^a	疏松, 瘤状结构少

The different letters in the same column mean the significant difference ($P \leq 0.05$) by Duncan's LSD Test. The same below.
表中不同字母表示邓肯氏最小显著差数测验差异显著($P \leq 0.05$)。下同。

3.1.2. 光周期对愈伤组织诱导的影响

外植体分别进行光培养与暗培养 20 d, 观察发现光培养与暗培养均能诱导愈伤组织形成。暗培养产生的愈伤组织出现早, 平均 7 d 就能观察到愈伤产生, 且体积大、质地松散、无法分化, 须在光下培养 2

周，并转绿后才能恢复分化能力。光培养条件下，至少 5 d 后才有愈伤组织生成，但愈伤组织颜色墨绿，质地紧密，瘤状结构明显；15 d 后即可转入分化培养基，15 d 内就能产生不定芽。

3.1.3. 继代次数对愈伤组织的影响

多次继代培养会使愈伤组织的结构和颜色发生明显变化(图 1)。表 2 显示，随着继代次数的增加，愈伤组织逐渐失绿褐化，增殖能力下降，质地变得松散，瘤状结构消失，不定芽再生率也随之下降。特别是第 4 次继代后，愈伤组织严重褐化，产生不定芽的能力下降明显。



Figure 1. Leaf callus of *Dracocephalum rupestre*. (a) Nodular callus induced from young leaf culture on the optimal callus induction medium; b) Calli turned brown and gradually loss nodular structures after four subcultures; c) Callus after one subculture)

图 1. 毛建草叶片愈伤组织。(a) 叶片接种于最佳愈伤组织诱导培养基的瘤状愈伤组织；b) 经历了 4 次继代培养的愈伤组织出现褐化现象，瘤状结构消失；c) 经历了 1 次继代培养的愈伤组织)

Table 2. Effect of subculture times on callus and shoot regeneration of *Dracocephalum rupestre*

表 2. 继代次数对愈伤组织形成和分化的影响

继代次数 Subculture times	愈伤组织形态 Morphology of callus	不定芽再生率/% Frequency of adventitious shoot formation (r/%)
1	绿白色，瘤状结构丰富	75.58 ± 8.8 ^a
2	绿白色，瘤状结构丰富	69.82 ± 4.9 ^a
3	绿白色，较少瘤状结构	61.79 ± 2.5 ^{ab}
4	黄绿色，较少瘤状结构	49.15 ± 2.8 ^b
5	黄绿色，松散	27.65 ± 5.4 ^c
6	褐色，松散	19.94 ± 3.6 ^c

3.2. 细胞分裂素对愈伤组织分化不定芽的影响

诱导不定芽再生的实验发现，3 种细胞分裂素(CTK)单一添加时，随着 CTK 浓度增加，不定芽再生率均呈现先增后降的趋势(表 3)。其中，6-BA 效果最好，TDZ 其次，KT 最差。6-BA 的最佳浓度为 0.5 mg/L，不定芽再生率高达 64.17% ± 3.8%，每个愈伤组织平均产生 4.06 个芽。TDZ 的最佳浓度为 0.5 mg/L，不定芽再生率为 60.85% ± 3.7%，但诱导的芽玻璃化现象严重，生长缓慢且基部产生较多愈伤组织；继续培养 15 d 后，愈伤组织生长过盛，抑制了不定芽的伸长生长，最后导致不定芽生长不良而死亡。3 种 CTK 最佳浓度的两两组合发现，6-BA 与 TDZ 组合的效果最好，诱导不定芽再生率最高，达 72.54% ± 2.8%，不定芽数量多且健壮。同时，KT+6-BA 和 KT+TDZ 的组合对不定芽诱导具有负作用，诱导效果不如单一添加 6-BA 或 TDZ。因此，不定芽再生的最佳培养基为：MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L TDZ + 0.1 mg/L IBA。将愈伤组织接种到最佳不定芽再生培养基上 7~15 d 可出现不定芽，继续培养 7~15 d 不定芽可伸长至 2~3 cm。

Table 3. Effect of CTK on induction of adventitious shoots from calli of *Dracocephalum rupestre*
表 3. 细胞分裂素对愈伤组织分化不定芽的影响

细胞分裂素/mg·L ⁻¹ Concentration of CTK			不定芽再生率/% Frequency of shoot formation (r/%)	每愈伤组织产生的平均芽数/个 Number of shoots
6-BA	KIN	TDZ		
0.1	0	0	16.24 ± 3.1 ^d	1.25 ^d
0.5	0	0	64.17 ± 3.8 ^a	4.06 ^a
1.0	0	0	51.06 ± 4.2 ^b	3.56a ^b
0	0.1	0	10.55 ± 2.8 ^d	0.88 ^d
0	0.5	0	36.92 ± 3.4 ^c	2.72 ^{bc}
0	1.0	0	31.75 ± 1.9 ^c	2.45 ^{bc}
0	0	0.05	37.21 ± 1.7 ^{bc}	1.36 ^d
0	0	0.1	40.95 ± 2.4 ^{bc}	2.71 ^{bc}
0	0	0.5	60.85 ± 3.5 ^a	3.65 ^a
0.5	0.5	0	43.51 ± 5.5 ^{bc}	2.44 ^{bc}
0.5	0	0.1	72.54 ± 2.8 ^a	4.20 ^a
0	0.5	0.1	33.06 ± 2.5 ^c	1.68 ^{cd}

3.3. 再生植株诱导生根分析

诱导植株生根的常用生长素有 NAA 和 IBA 等, 通过比较不同浓度的 NAA 和 IBA 对毛建草再生苗生根的影响(表 4), 发现 MS 培养基中添加 0.1 mg/L 或 0.2 mg/L 的 IBA 和添加 0.1 mg/L NAA 均能使 69% 以上的再生苗在 7 d 内产生根系, 15 d 内可移栽。其中, 0.1 mg/L NAA 能最早的诱导根系萌动, 平均 5 d 就有根系出现, 为最佳生根培养基。而浓度达 0.4 mg/L 的 IBA 和 NAA 仍能诱导根系产生, 但在根系与茎干的结合处会产生大量的愈伤, 且其旺盛生长反而抑制根系生长。移栽试验显示, 根系与茎干结合处有大量愈伤组织的生根苗存活率极低。添加 0.1% 的活性炭于生根培养基, 虽不能影响生根率和平均根数, 但能有效促进根系生长粗壮。

Table 4. Effect of NAA or IBA on rooting of the regenerated shoots of *Dracocephalum rupestre*
表 4. NAA 和 IBA 对再生苗生根的影响

激素浓度/ mg·L ⁻¹ Concentration of PGRs (mg·L ⁻¹)		生根率/% Rooting percentage (r/%)
NAA	IBA	
0.05	0	33.74 ± 2.0 ^d
0.1	0	77.82 ± 2.5 ^a
0.2	0	51.65 ± 2.3 ^b
0.4	0	47.25 ± 2.1 ^c
0	0.05	45.06 ± 2.1 ^{bc}
0	0.1	73.14 ± 2.9 ^a
0	0.2	69.51 ± 2.1 ^a
0	0.4	41.95 ± 2.6 ^{bc}

4. 讨论

本研究建立了毛建草叶片离体组织再生体系, 50 天内可完成从叶片培养到再生苗移栽整个过程。叶片再生率高达 $67.28\% \pm 2.6\%$, 每个愈伤组织平均产生约 4 个芽。毛建草叶片产生瘤状愈伤组织的最佳培养基是 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L IAA。不定芽再生的最佳培养基是 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L TDZ + 0.1 mg/L IBA。最佳生根培养基为 MS + 0.1 mg/L NAA。

虽然多数植物采用茎尖和茎段作为组培快繁的外植体, 从而能够较容易地诱导再生芽[7] [8], 但其材料获取相对困难, 而叶片更易采集获取。植物的叶片再生通常要经由愈伤组织途径, 相关研究表明, 植物不定芽通常发生在愈伤组织的绿色瘤状结构处[9], 瘤状愈伤组织具有分化出丛生芽的能力, 因此愈伤组织的质量决定丛生芽产生频率[10]。植物组织培养中, 植物生长调节剂在其各个阶段起着非常重要的作用。其中 6-BA 为一种常用的、首选的细胞分裂素, 具有促进外植体细胞分裂进而诱导不定芽产生的作用; 被认为是诱导外植体产生愈伤组织的最有效的外源激素[10] [11], 2,4-D 也常用于诱导多种植物的外植体产生愈伤[12]。试验表明毛建草叶片愈伤组织的诱导必须依赖于植物生长调节剂的添加, 6-BA 是诱导叶片产生瘤状愈伤组织的关键外源激素, 1.0 mg/L 6-BA 产生的愈伤组织质量最好, 低浓度的 2,4-D 能辅助 6-BA 发挥更好的作用, 并且不会影响愈伤组织的质量与结构。

试验发现, 毛建草叶片产生的愈伤组织继代培养多次后, 会逐渐丧失分化能力。也有报导显示, 愈伤组织继代培养需要针对性的培养基[13], 否则经过多次继代培养后会失去增殖能力[14]。光周期也是影响愈伤组织诱导和生长发育的重要因素, 例如枣树的叶片需暗培养才能产生具有分化能力的愈伤组织[15], 而有些植物愈伤组织的诱导和生长必需在光下, 而有些则在光、暗条件下均可进行。本研究证明毛建草叶片在光下和黑暗中均能产生愈伤组织, 光下产生的愈伤组织质地紧密, 瘤状结构丰富, 再分化时间短, 更有利于组织快速繁育。细胞分裂素 CTK 能刺激细胞分裂, 促进不定芽形成[16], 本研究发现 6-BA 能较好的诱导毛建草的不定芽健壮, 且生长速度较快。

基金项目

四川省科技计划项目(2018NZ0091、2019YFS0107)、四川省级公益性科研院所基本科研业务费项目、农业农村部杂粮加工重点实验室开放基金资助(No.2018CC12)、四川省中医药管理局科研项目(2018KF007)共同资助。

参考文献

- [1] 中科院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 65 卷第 2 分册. 北京: 科学出版社, 1977: 375-380.
- [2] 内蒙古植物志编委会. 内蒙古植物志·5 卷[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1998: 191-195.
- [3] 梁永锋, 陈作涛, 刘立红. 毛建草化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(19): 2201-2203.
- [4] 汪涛, 邓雁如, 丁兰, 鲁润华. 岷山毛建草挥发油化学成分分析[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(6): 20-21+30.
- [5] 李慧卿, 王萍. 毛建草茶叶的组分研究[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2014, 37(3): 410-414.
- [6] Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-479. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- [7] 孙瑞芬, 李天然, 李莹, 石慧芹, 张颖力, 贾利敏. 草莓组培快繁及叶片诱导植株再生的研究[J]. 华北农学报, 2002, 17(4): 49-53.
- [8] 韩晓勇, 闫瑞霞, 殷剑美, 张培通, 郭文琦, 李春宏. 铁棍山药组织培养快繁及试管芽离体再生体系研究[J]. 西北植物学报, 2013, 33(10): 2120-2125.
- [9] Sharma, V.K. and Kothari, S.L. (1993) High Frequency Plant Regeneration in Tissue Cultures of *Glycine clandestine*-A Wild Relative of Soybean. *Phytomorphology*, **43**, 29-33.
- [10] 暨淑仪, 严学成, 王毅军. 茶叶片愈伤组织形成的细胞组织学观察[J]. 茶叶, 1995, 21(2): 11-13.

-
- [11] 刘步仓, 张爱霞, 黎玉顺, 祝建波. 马齿苋高频再生体系的建立及对草丁膦敏感性测定[J]. 北方园艺, 2015(7): 98-103.
- [12] Morini, S., Onofrio, C.D., Bellocchi, G. and Fisichella, M. (2000) Effect of 2, 4-D and Light Quality on Callus Production and Differentiation from *in Vitro* Cultured Quince Leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **63**, 47-55. <https://doi.org/10.1023/A:1006456919590>
- [13] 刘俊, 孙瑞芬, 耿牡丹, 王冬霓, 张艳芳, 孙钟. 毛建草离体培养快繁体系的建立[J]. 北方农业学报, 2017, 45(6): 102-106.
- [14] Rodriguez, R., Rey, M., Cuozzo, L. and Ancora, G. (1990) *In Vitro* Propagation of Caper (*Capparis spinosa* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, **26**, 531-536. <https://doi.org/10.1007/BF02624097>
- [15] Gu, X.F. and Zhang, J.R. (2005) An Efficient Adventitious Shoot Regeneration System for Zhanhua Winter Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) Using Leaf Explants. *Plant Cell Reports*, **23**, 775-779. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0920-5>
- [16] Mithila, J., Hall, J.C., Victor, J.M.R. and Saxena, P.K. (2003) Thidiazuron Induces Shoot Organogenesis at Low Concentrations and Somatic Embryogenesis at High Concentrations on Leaf and Petiole Explants of African Violet (*Saint-paulia ionantha* Wendl.). *Plant Cell Reports*, **21**, 408-414. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0544-y>