

研究简报

影响喜树组织培养苗离体生根的因素^①

王慧梅 王文杰 董凤丽 祖元刚^②

(东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室 哈尔滨 150040)

摘要 为了建立有效的喜树(*Camptotheca acuminata*)组培苗生根系统,提高其移栽成活率及适应性,用不同生长素种类及浓度、不同蔗糖浓度及不同培养基对喜树组培苗不定根形成影响以及移栽初期根系发育状况进行了研究。结果发现:1)生长素种类和浓度明显影响喜树组培苗不定根形成,在含有IBA 0.5 mg·L⁻¹培养基中取得了最佳生根效果,生根率达到了98%,外植体平均生根数为5.9条/株;2)不同浓度蔗糖对喜树组培苗生根也有一定影响,在10~30 g·L⁻¹范围内,随着蔗糖浓度增加,生根百分率和生根数量都有增加,蔗糖浓度达到30 g·L⁻¹时,生根百分率为95%,外植体平均生根数为5.4条/株;蔗糖浓度在40 g·L⁻¹时,表现出对生根抑制作用;3)在基本培养基对喜树组培苗生根影响研究中发现,MS培养基对根形成表现出一定抑制作用;1/2MS和WPM培养基均适合喜树组培苗生根;4)根系发育正常的喜树组培苗移栽后成活率可达96%,但组培苗根系根毛系统发育较差。组培苗单位叶面积根尖数量显著低于对照实生苗,而且此参数与叶片气孔导度呈显著正相关。这种较差根系发育导致叶片气孔导度过低可能是组培苗叶片光合能力较低的重要原因。

关键词 喜树, 生长素, 蔗糖, 离体培养, 根系发育, 气孔导度

Factors Affecting *in vitro* Rooting of *Camptotheca acuminata*

WANG Hui-Mei WANG Wen-Jie DONG Feng-Li ZU Yuan-Gang^②

(Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract For establishing an efficient *in vitro* rooting protocol of *Camptotheca acuminata* and improving the survival and acclimatization of the regenerated plantlets, the effects of auxins, sucrose concentration and different basal media on *in vitro* rooting and root development at earlier stage after transferred to soil were investigated in this study. We found that, firstly, the addition of auxins to the media can evidently promote rooting. The best rooting was found on the medium containing IBA 0.5 mg·L⁻¹. In this medium, rooting frequencies reached 98%, which associated with a high number of roots, 5.9 roots per shoot. Secondly, root percentage and root number increased with the sucrose concentration from 10 g·L⁻¹ to 30 g·L⁻¹. On the medium containing 30 g·L⁻¹ sucrose, root percentage was 95% with higher root number, 5.4 roots per shoot. Higher sucrose concentration (40 g·L⁻¹) negatively affected rooting. Thirdly, of different medium for rooting, MS medium inhibited root formation. WPM or 1/2MS medium was the optimal medium for *in vitro* rooting of *C. acuminata*. Ninety-six percent of the *in vitro* rooted plantlets with well developed shoots and roots survived after transfer

①教育部科学技术研究重点项目(03061)和财政部农业科技成果转化资金项目(03EFN216700297)。

②通讯作者。Author for correspondence. E-mail: zygorl@public.hr.hl.cn

收稿日期:2004-04-22 接受日期:2004-07-22 责任编辑:白羽红

to soil. But root system was much worse than that of seedlings developed from seeds, and the ratio of root tip number to leaf area in regenerated plantlets were significantly lower. Moreover, this ratio was positively correlated with stomatal conductance. The worse root status and low stomatal conductance may be the important reason for the low photosynthetic capacity of regenerated plantlets.

Key words *Camptotheca acuminata*, Auxin, Sucrose, *In vitro* culture, Root development, Stomatal conductance

喜树(*Camptotheca acuminata*)是我国南方特有树种,因其体内不同部位均含有喜树碱而闻名。近年来在抗肿瘤的天然产物中喜树碱已经成为一种非常重要的化合物(Comins *et al.*, 1994)。目前两类喜树碱的衍生物已经被批准用于临床治疗癌症,其他种源喜树碱正在用于临床实验(Thomas *et al.*, 2004)。对喜树不同种源喜树碱含量研究中发现,不同种源喜树碱含量存在明显差异(Liu and Adams, 1998)。因此对喜树碱含量高的喜树种源进行大量繁殖和对喜树碱的提取将具有非常重要的应用前景。而组织培养技术作为药用植物和濒危物种低廉和快速高效繁殖方式(Rout *et al.*, 2000),将是大量繁殖喜树碱含量高的喜树种源的重要途径之一。

不定根的形成是组织培养过程中一个非常关键环节,它直接影响到组培苗移栽成活率的高低,关系到组织培养成败。不定根的发生能力在不同植物种类间有着明显差异,因此对某一物种不定根发生的最佳条件应该进行系统研究(Rout *et al.*, 2000)。虽然对喜树组织培养进行过一些研究(Jain and Nessler, 1996; Weidenfeld *et al.*, 1997; Liu and Li, 2001; Li and Liu, 2003),但在喜树的不定根形成,还未见系统的研究报道。影响不定根形成的因素很多,但主要是由培养基中的碳水化合物、生长素以及基本培养基类型决定的(Nathalie and Margareta, 1995)。因此,本文从以上3个方面对组培苗试管培养过程中不定根形成最佳条件进行了探讨。

组培苗移栽后根系发育状况对于水分及矿质元素吸收都是非常重要的,甚至可以影响到气体交换能力。然而关于根系发育情况对叶片功能影响的证据还比较少(Lambers *et al.*, 1998)。对于喜树,移栽后根系发育状况对叶片功能的影响了解得很少。例如,移栽后组培苗与实生苗的根尖数量是否有明显差异?如果有差异,这种差异对叶片功能,如气孔导度又有怎样影响。对这些问题研究有助于我们在组织培养过程中进行定向诱导,以及在组培苗移栽过程中采取一些措施来提高组培苗移栽成活率及适应性。因此,本文对比研究了实生苗和组培苗移栽后根系发育状况以及根系发育对气孔导度和光合作用的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

用于生根的喜树(*Camptotheca acuminata*)组培苗来源于东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室,是由腋芽诱导的在继代增殖培养基上培养的喜树再生苗。最初的腋芽诱导培养基为 WPM+BA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 +6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂, pH 5.8。再生苗继代增殖培养基为 WPM+BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 +6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂, pH 5.8。每5周继代一次,挑选生长比较健壮的再生苗用于生根培养。

1.2 培养基中生长素、蔗糖浓度以及不同培养基对喜树组培苗生根影响

采用 IBA(0.1、0.2、0.5 和 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和 NAA(0.1、0.2 和 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 来研究不同生长素

种类及浓度对喜树组培苗离体生根影响。以 WPM 培养基附加 30 g·L⁻¹ 的蔗糖为基本培养基。

生根培养基中分别添加了 0、10、20 和 30 g·L⁻¹ 的蔗糖来研究不同蔗糖浓度对喜树组培苗离体生根影响。采用 WPM 培养基附加 IBA0.5 mg·L⁻¹ 作为基本培养基。

采用了 MS、1/2MS 和 WPM 3 种基本培养基来研究不同培养基对喜树组培苗离体生根影响。培养基中分别添加 IBA 0.5 mg·L⁻¹ 和蔗糖 30 mg·L⁻¹。

以上各组实验所用的培养基中均添加 6 g·L⁻¹ 琼脂，培养基 pH 值为 5.8，121℃高压灭菌 15 min，培养室的培养温度为 25±2℃，光周期 16/8 h，光照强度为 1 500 Lx。每组实验重复 3 次，每种处理 20 个外植体。在生根培养基上培养 3 周后，统计生根百分率和生根数量。

1.3 生根喜树组培苗移栽及移栽后根系发育

在生根培养基上培养3周后,将根系发育正常的且生长健壮的生根喜树组培苗从培养基中取出,用自来水冲洗掉琼脂,移栽到温室含有沙子:土 =1:1 基质中。在移栽前 2 周，生根组培苗用塑料布进行遮荫处理，以防止水分散失，造成小苗枯萎。以后逐渐打开塑料布，移栽 4 周后，统计移栽成活率。

为了研究移栽后组培苗根系发育状况,本研究对组培苗和实生苗进行了对比实验研究。当组培苗移栽到基质中时，苗龄为 30 d 的实生苗也移栽到相同基质中，用于和组培苗进行对比实验。在温室相同的环境培养 4 周后，对移栽的组培苗和实生苗根系发育状况进行了研究。根系发育状况是用总的根尖数量和总的叶面积比值来表示的。叶面积的测量是采用叶面积测定仪(LI3000，USA)来进行测量的。叶片气孔导度是采用便携式光合测定系统(Li-6400，USA)进行测定。

2 结果与讨论

2.1 生长素的种类及浓度对喜树组培苗离体生根的影响

生长素对喜树不定根的形成有着明显促进作用(表 1)。在不含激素的培养基中，喜树组培苗生根率较低，只有 35%，而且生根的条数也比较少，每个外植体平均生根数为 1.9。在所有处理中，从生根的时间、生根率和数量综合来看，IBA 0.5 mg·L⁻¹ 的处理取得了最佳的效果，

表 1 生长素 IBA 和 NAA 对喜树组培苗不定根形成的影响

Table 1 Rooting response of excised *Camptotheca acuminata* shoots to IBA and NAA treatments

生长素(mg·L ⁻¹)	生根时间	外植体平均生根数 ^a	生根率(%)
Auxin	Rooting time (d)	Root number per shoot ^a	Rooting efficiency
0	>15	1.9±0.78	35
IBA(0.1)	>15	2.7±0.62	95
IBA(0.2)	>15	3.4±0.36	98
IBA(0.5)	>15	5.9±0.53	98
IBA(0.8)	>20	5.8±0.49	96
NAA(0.1)	<12	5.4±0.72	85
NAA(0.2)	<12	4.2±0.04	88
NAA(0.5)	<10	3.5±0.44	98

以上各种处理 WPM 附加 30 g·L⁻¹ 蔗糖作为基本培养基，外植体平均生根数^a 代表所作 3 次实验的平均数 ± 标准误。生根率是用总的外植体生根数与接种的总外植体数来表示

For rooting, the regenerated shoots were cultured on WPM medium supplemented with 30 g·L⁻¹sucrose in all the above treatment. ^aData represented as mean ± SE from three experiments. Rooting efficiency is calculated by the rooted regenerated shoots divided by the total regenerated shoots for rooting



图1 生根的喜树组培苗

Fig. 1 Rooted plantlets developed from regenerated shoots of *Camptotheca acuminata*

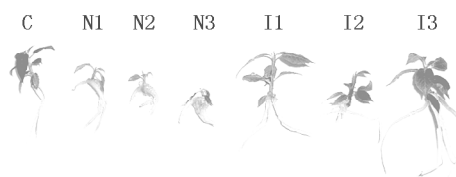


图2 在不同的 IBA 和 NAA 的处理中, 生根的喜树组培苗

Fig. 2 Root formation in *Camptotheca acuminata* shoots in response to IBA and NAA treatment

C. Control (auxin-free); N1. 0.1 mg·L⁻¹ NAA; N2. 0.2 mg·L⁻¹ NAA; N3. 0.5 mg·L⁻¹ NAA; I1. 0.1 mg·L⁻¹ IBA; I2. 0.2 mg·L⁻¹ IBA; I3. 0.5 mg·L⁻¹ IBA

生根率为 98%, 平均生根数为 5.9(图 1)。同时也发现, IBA 和 NAA 这两种生长素对喜树的生根作用是不同的(图 2)。在含有 NAA 的培养基中生根时间相对较短(小于 12 d), 而在含有 IBA 的培养基中生根时间相对较长(大于 15 d)。含有较高浓度 NAA 培养基中诱导的不定根通常比较短粗, 生长缓慢, 而且不定苗的生长也受到一定程度抑制, 这种抑制作用随着 NAA 浓度的增加表现得更加明显(图 2)。随着 NAA 浓度的升高, 外植体的平均生根数也表现出下降趋势, 从 5.4 条降到 3.5 条。在含有 IBA 的培养基中, IBA 0.1~0.5 mg·L⁻¹ 的范围内, 外植体平均生根的数量随着 IBA 的浓度提高而增加, 从 2.7 条增加到 5.9 条。继续增加 IBA 的浓度, 提高到 0.8 mg·L⁻¹ 时, 生根的百分率和外植体平均生根数与 IBA 0.5 mg·L⁻¹ 的处理相比没有明显的差异, 但在生根的时间上, IBA 0.8 mg·L⁻¹ 的处理要长一些, 表现出高浓度的 IBA 对生根的抑制作用。因此对于喜树, IBA 0.5 mg·L⁻¹ 的处理最适合喜树组培苗不定根的诱导。

生长素通常用于不定根的诱导, 但这些生长素的效应因植物种类而异(Nathalie and Margareta, 1995; Abdulaziz and Bahrany, 2002)。生长素 IBA 和 NAA 经常用于不定根的诱导, 因为它们对不定根的诱导比较有效而且它们比生长素 IAA 要稳定得多(AI-Juboory *et al.*, 1998)。因此我们采用了 IBA 和 NAA 来研究不同的生长素种类及浓度对喜树不定根形成的影响。已经证明在大多数植物中 IBA 对不定根的诱导作用效果较好(Prakash *et al.*, 1999; Rani and Grover, 1999; Fracro and Echeverrigaray, 2001)。但在某些植物中, NAA 对不定根的诱导效果比 IBA 好。如在薰衣草(*Lavandula angustifolia* Mill.)的组织培养中发现, 含有 NAA 的处理中取得了较好的生根效果, 在 NAA 0.2~1.0 mg·L⁻¹ 范围内, 随着 NAA 浓度升高, 外植体平均生根数和生根率都在增加(Andrade *et al.*, 1999)。对于喜树, IBA 和 NAA 相比, IBA 对不定根的诱导和发育比 NAA 的效果要好得多, 在鼠尾草(*Salvia japonica* Thunb.)的两个种的组织培养中也得到了相似结果(Joshi and Dhar, 2003)。从以上可以看出, 在组织培养生根培养阶段, 所采用的生长素种类和浓度不容忽视, 首先应该对其进行详细研究。

2.2 不同的蔗糖浓度对喜树组培苗离体生根的影响

研究发现培养基中的蔗糖浓度与喜树组培苗生根能力有着紧密的相关关系(表 2)。当培养基中不添加蔗糖时, 所接种的组培苗在整个培养周期内保持绿色, 但没有不定根发生。当培养基中添加蔗糖时, 在 10~30 g·L⁻¹ 的范围内, 生根率和生根的数量随着培养基中蔗糖浓度增加而增加。当培养基的蔗糖浓度为 10 g·L⁻¹ 时, 生根率为 78%, 每个外植体的平均生根数为

2.8。当培养基中添加 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖时, 外植体的平均生根率能达到 91% 以上, 在蔗糖浓度为 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理中, 外植体的平均生根数能达到 5.4。当继续增加蔗糖的浓度达到 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 表现出高浓度的蔗糖对外植体生根的抑制作用, 生根率为 81%, 而且外植体生根的条数也比较少, 平均为 4.2 条。因此可以认为, $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖浓度是喜树组培苗不定根形成所需的最佳蔗糖浓度。

外植体不定根诱导是一个能量消耗过程, 需要提供一定碳源作为能量供应(Haissig, 1982; Zimmerman, 1983)。喜树组培苗不定根形成过程中蔗糖的供给是必需的(表2)。然而外植体不定根形成过程中所需最佳蔗糖浓度因植物种类而异(Hyndman *et al.*, 1986; Cheng *et al.*, 1992; Conner and Fallon, 1993)。对于喜树, $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖浓度取得了最佳生根效果, 而继续提高蔗糖的浓度达到 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 表现出高浓度蔗糖对生根抑制作用, 在 *Persea americana* 的组织培养中也发现相似现象(Plego-Alfaro, 1988)。今后应该对不同的碳源对喜树离体生根影响进行详细研究, 以便找出喜树组培苗离体生根的最佳条件, 增加根系数目诱导, 提高地下部分和地上部分生物量的比值, 增加组培苗移栽适应性尤其对季节变化干旱的适应能力(Swamy *et al.*, 2004)。

2.3 培养基类型对喜树组培苗不定根形成的影响

研究发现, MS 培养基抑制了喜树组培苗不定根的形成。外植体生根率只有 65%, 每个外植体的平均生根数为 2.8 条。当将 MS 培养基的离子浓度降低至 $1/2\text{MS}$ 时, 外植体生根率和每个外植体的平均生根数都大幅度提高(表 3)。同样, WPM 培养基也取得了较好效果, 外植体的生根百分率为 93%, 平均生根数为 4.8 条。因此对于喜树, $1/2\text{MS}$ 和 WPM 培养基均适合喜树组培苗不定根诱导。

基本培养基对不定根诱导及不定根质量都有重要影响(Garland and Stoltz, 1981; Zimmerman and Broome, 1981)。在几种木本植物组织培养研究中发现, 培养基中较高离子强度会对不定根形成和不定芽生长表现出抑制作用(McCown and Sellmer, 1987)。陶静等(1999)研究结果表明, 培养基中低氮水平有利于白桦(*Betula platyphylla* Suk.)组培苗不定根诱导。降低 MS 培养基离子浓度有利于不定根发生, 这在许多植物中已有报道(Manzanera and Parados, 1990; Purohit *et al.*, 1994), 本研究也证明了这一点。MS 培养基与 WPM 培养基和 $1/2\text{MS}$ 培养基相比, 前者比后两者的离子浓度高, 尤其是氮的水平。因此可以推断, WPM 培养基和 $1/2\text{MS}$ 培养基有利于喜树组培苗不定根形成很大程度上是由于培养基中离子浓度降低, 尤其是培养基中氮的水平降

表 2 不同的蔗糖浓度对喜树组培苗离体生根的影响

Table 2 The effect of sucrose concentration on rooting of regenerated shoots of <i>Camptotheca acuminata</i>		
蔗糖浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	外植体平均生根数 ^a	生根率(%)
Sucrose	Root number ^a	Rooting efficiency
0	0	0
10	2.8 ± 0.54	78
20	4.9 ± 0.34	91
30	5.4 ± 0.65	95
40	4.1 ± 0.83	81

以上各种处理采用 WPM 附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 作为基本培养基, 外植体平均生根数^a 代表所作 3 次重复的平均数 $\pm$ 标准误。生根的百分率是用总的外植体生根数与接种的总外植体数来表示

For rooting, the regenerated shoots were cultured on WPM medium supplemented with $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA. ^aData represented as mean $\pm$ SE from three experiments. Rooting efficiency is calculated by the rooted regenerated shoots divided by the total regenerated shoots for rooting

表3 不同的基本培养基对喜树组培苗离体生根的影响

培养基	外植体平均生根数 ^a	生根率 (%)
Medium	Root number ^a	Rooting efficiency
MS	2.9±0.69	65
1/2MS	4.3±0.2	95
WPM	4.8±0.83	93

以上各种处理不同的培养基中分别添加 20 g·L⁻¹ 蔗糖和 0.5 mg·L⁻¹ IBA。外植体平均生根数^a 代表所作 3 次实验的平均数 ± 标准误。生根的百分率由总的外植体生根数与接种的总外植体数来表示
For rooting, 20 g·L⁻¹ sucrose and 0.5 mg·L⁻¹ IBA were supplemented in different media. ^aData represented as mean ± SE from three experiments. Rooting efficiency is calculated by the rooted regenerated shoots divided by the total regenerated shoots for rooting

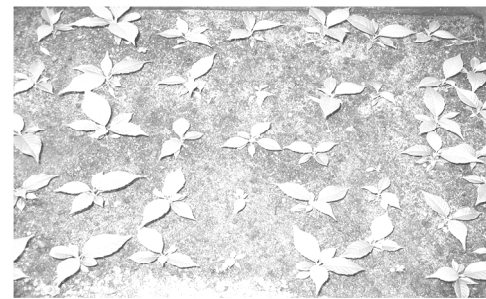


图3 移栽成活的喜树组培苗
Fig. 3 Rooted *Camptotheca acuminata* survived in the soil

低所致。
2.4 生根的喜树组培苗移栽及移栽后根系发育

挑选生长比较健壮, 根系发育正常的生根喜树组培苗进行了移栽, 发现只要在移栽的前2周组培苗周围保持相对较高湿度(RH>80%), 喜树组培苗很容易移栽成活并保持旺盛生长(图3)。移栽成活率达 96%。

移栽 30 d 后, 对根系发育情况进行了研究。结果表明, 组培苗的根尖数量比较少, 而且通常情况下, 组培苗没有须根(图4)。当根

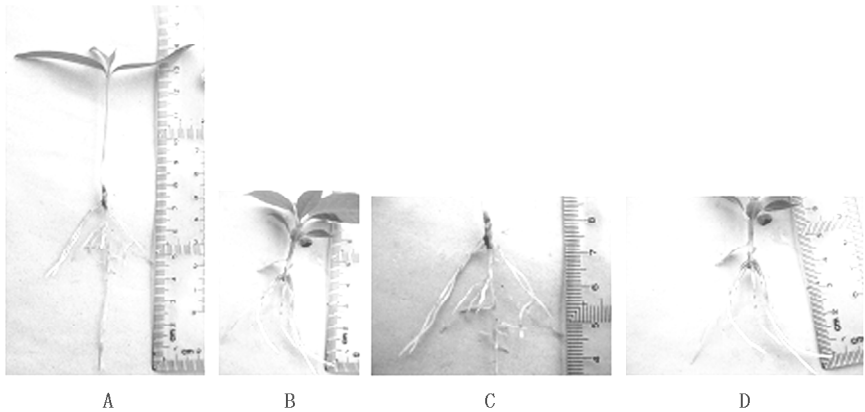


图4 组培苗与实生苗根系发育的差异
A. 实生苗有主根, 根长 7 cm; B. 组培苗没有主根, 根长 4 cm; C. 实生苗有较多的根尖, 有须根; D. 组培苗有较少的根尖, 没有须根

Fig. 4 Differences in root system between seedlings and regenerated individuals
A. Seedling individuals with taproot, about 7 cm in length; B. Regenerated individuals without taproot, about 4 cm in length; C. More root tips in seedling individuals, with hair root; D. Less root tips in regenerated individuals, without hair root

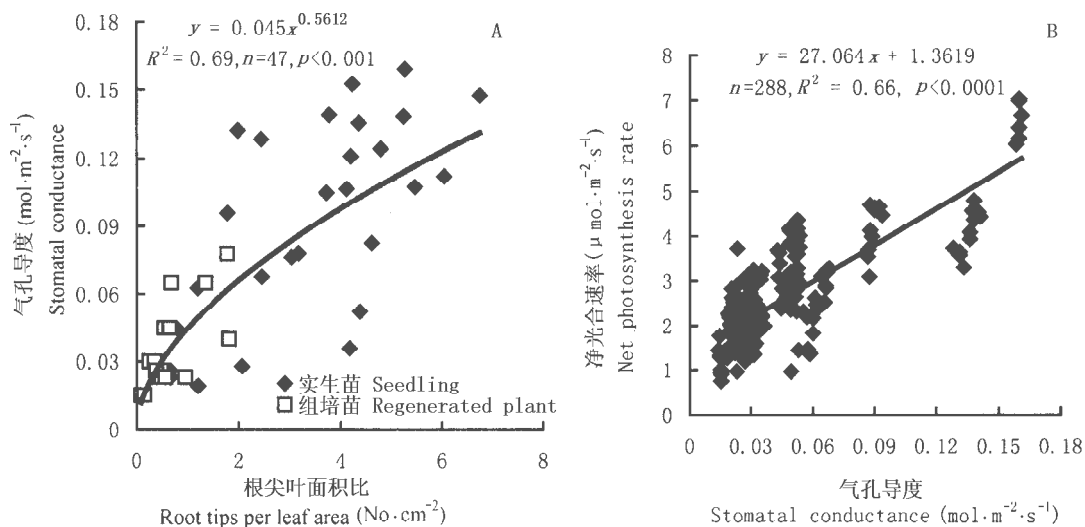


图5 组培苗与实生苗的根系发育差异及对气孔导度的影响(A)和气孔导度对净光合速率的调节作用(B)。B图的数据为所有组培苗与实生苗的数据,光照为饱和光强($\text{PAR} > 500 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

Fig. 5 Influences of root status of seedling and regenerated plantlets on stomatal conductance (A) and regulation of stomatal conductance on leaf photosynthesis under saturation light ($\text{PAR} > 500 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (B). All data of seedling and regenerated plantlets were pooled together in the figure B

系发育情况用根尖数量和叶片总面积比值来表示时,结果发现组培苗的比值明显低于实生苗(图5, A)。根尖是水分吸收最活跃的部分(Lambers *et al.*, 1998), 因此, 这种较低的比值可能影响水分的吸收进而影响植株的发育。为了验证这个假设, 本研究对气孔导度和光合速率进行了测量。研究表明, 无论对于组培苗还是实生苗, 气孔导度都与根尖数量和叶片总面积的比值呈显著正相关(图5, A)。因此, 组培苗较差的根系发育情况导致植株水分供应能力较实生苗差, 进而降低了叶片气孔导度, 减少蒸腾水分消耗。气孔导度除了影响植株水分的供应外, 还能影响叶片 CO_2 的供应, 进而影响叶片的光合作用和植株的生长(王文杰等, 2003)。喜树组培苗与实生苗的气孔导度都与光合作用显著相关(图5, B)。因此, 与组培苗根系发育较差紧密相关的低气孔导度是导致组培苗移栽初期光合能力较低的原因。所以, 在组培苗的离体生根过程中, 应尽量促进组培苗的根系发育, 尤其是增加不定根的数目, 进而加速组培苗的移栽适应过程, 提高其成活率。

3 结论

本研究结果表明, $1/2\text{MS}$ 和 WPM 培养基附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂是最佳喜树组培苗生根培养基。这个可重复的具有较高生根率和生根数量的培养基对喜树这个濒危物种和药用植物快速繁殖是非常有益的。

组培苗移栽后, 根系发育情况通过气孔的调节进而影响叶片的光合作用。本研究还发现, 无论对于组培苗还是对于实生苗, 气孔导度都与单位面积的根尖数量呈显著正相关。但组培苗的单位面积的根尖数量较低。组培苗较少的单位面积根尖数量和相应较低的气孔导度是组培苗光合能力较低的原因。因此在喜树组培苗不定根的诱导过程中, 应尽量增加根系数目诱导,

这样在移栽过程中能提高喜树组培苗移栽适应性, 提高组培苗的移栽成活率和存活率。

参 考 文 献

- 王文杰, 祖元刚, 杨逢建, 王慧梅, 王非, 2003. 边缘效应带促进红松生长的光合生理生态学研究. *生态学报*, 23: 2318~2326
- 陶静, 秦彩云, 姚录贤, 姜文书, 詹亚光, 李沿宁, 1999. 不同因子对白桦组培苗生根影响的研究. *吉林林业科技*, 2: 1~8
- Al-Juboory K H, Skirvin R M, Williams D J, 1998. Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) leaf explants. *Hort Sci*, 72: 171~178
- Andrade L B, Echeverrigaray S, Fracaro F, Pauletti G F, Rota L, 1999. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* D C). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 56: 79~83
- Abdulaziz M, Bahrany A I, 2002. Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Hort Sci*, 95: 285~295
- Cheng B, Peterson C M, Mitchell R J, 1992. The role of sucrose, auxin and explant source on *in vitro* rooting of seedling explants of *Eucalyptus sideroxylon*. *Plant Sci*, 87: 207~214
- Conner A J, Fallon P J, 1993. Osmotic versus nutritional effects when rooting *in vitro* asparagus minicrowns on high sucrose media. *Plant Sci*, 89: 101~106
- Comins D L, Hong H, Saha J K, Gao J H, 1994. A six-step synthesis of ($\pm$)-camptothecin. *J Org Chem*, 59: 5120~5121
- Fracaro F, Echeverrigaray S, 2001. Micropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of South Brazil. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 64: 1~4
- Garland P, Stoltz L P, 1981. Micropagation of *Pissardi plum*. *Ann Bot*, 48: 387~389
- Haissig B E, 1982. Carbohydrate and amino acid concentrations during adventitious root primordium development in *Pinus banksiana* Lamb. cuttings. *Forest Sci*, 28: 813~821
- Hyndman S E, Hasegawa P H, Bressan R A, 1982. The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on cultured rose shoots. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1: 229~238
- Jain J K, Nessler C, 1996. Clonal propagation of *Camptotheca acuminata* through shoot bud culture. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 44: 229~233
- Joshi M, Dhar U, 2003. *In vitro* propagation of *Saussurea abrollata* (DC.) Edgew. — an endangered ethnoreligious medicinal herb of Himalaya. *Plant Cell Rep*, 21: 933~939
- Lambers H, Chapin F S, Pons T L, 1998. *Plant Physiological Ecology*. New York: Springer-Verlag, 154~292
- Liu L, Adams J C, 1998. Seed source variation in camptothecin concentrations of nursery-grown *Camptotheca acuminata* seedlings. *New Forest*, 16: 167~175
- Liu Z J, Li Z H, 2001. Micropagation of *Camptotheca acuminata* Decaisne from axillary buds, shoot tips, and seed embryos in a tissue culture system. *In Vitro Cell Dev Biol*, 37: 84~88
- Li Z H, Liu Z J, 2003. Effects of benzyladenin and naphthalene acetic acid on growth and camptothecin accumulation in *Camptotheca acuminata* seedlings. *Plant Growth Regul*, 22: 205~216
- McCown B H, Sellmer J C, 1987. General media and vessels suitable for woody plant culture. In: Bonga J M, Durzan D J eds. *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol.1. The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 4~16
- Manzanera J A, Pardos J A, 1990. Micropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 21: 1~8
- Nathalie P, Margareta W, 1995. Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on

- adventitious rooting of the apple rootstock Jork 9. *Plant Sci*, **106**: 167~176
- Pliego-Alfaro F, 1988. Development of an *in vitro* rooting bioassay using juvenile phase stem cuttings of *Persea americana* Mill. *Hort Sci*, **63**: 295~301
- Purohit S D, Kukda G, Sharma P, Tak K, 1994. *In vitro* propagation of an adult tree *Wrightia tomentosa* through enhanced axillary branching. *Plant Sci*, **103**: 67~72
- Prakash E, Sha V K, Sairam R P, Rao K R, 1999. Regeneration of plants from seed-derived callus of *Hybanthus enneaspermus* L. Muell. A rare ethnobotanical herb. *Plant Cell Rep*, **18**: 873~878
- Rani G, Grover I S, 1999. *In vitro* callus induction and regeneration studies in *Withania somnifera*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, **57**: 23~27
- Rout G R, Samantaray S, Das P, 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotech Adv*, **18**: 91~120
- Swamy S L, Ganguli J L, Puri S, 2004. Regeneration and multiplication of *Albizia procera* Benth . through organogenesis. *Agroforest Syst*, **60**: 113~121
- Thomas C J, Rahier N T, Hecht S M, 2004. Camptothecin: current perspectives. *Bioorg Med Chem*, **12**: 1585~1604
- Wiedenfeld H, Furmanowa M, Roeder E, Guzewska J, Gustowski W, 1997. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca accuminata*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, **49**: 213~218
- Zimmerman R H, Broome O C, 1981. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. *J Am Soc Hortic Sci*, **106**: 648~652