

欧美杨渤丰1号高效组培再生体系建立

崔旭东¹, 苏晓华^{1*}, 张冰玉¹, 褚延广¹, 黄秦军¹, 张伟溪¹, 刘勃洋²

(1. 林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091;

2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083)

摘要:与白杨派树种相比, 黑杨派树种一直因组培再生困难而限制了其在林木基因工程研究中的应用。本文以欧美杨优良新品种——渤丰1号为试验材料, 以其再生培养基中的植物生长调节剂配比、铜离子浓度、光照强度、卡那霉素选择压等方面为切入点开展研究, 建立了渤丰1号杨高效组培再生体系。使用该再生体系时, 外植体的分化率和生根率均达100%, 叶片的平均分化芽数多达20个以上, 组培苗移植成活率可达98%, 40 mg·L⁻¹卡那霉素可以抑制渤丰1号杨叶片的诱导与分化, 20 mg·L⁻¹卡那霉素可以抑制渤丰1号杨不定芽的生根; 同时发现铜(Cu)元素是渤丰1号杨外植体分化再生的一个关键因素, 增加Cu²⁺浓度能显著促进不定芽的诱导和分化。

关键词:欧美杨渤丰1号; 高效再生体系; 铜元素

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

Establishment of an Efficient Regeneration System of *Populus × euramericana* cl. ‘Bofeng 1’

CUI Xu-dong¹, SU Xiao-hua¹, ZHANG Bing-yu¹, CHU Yan-guang¹, HUANG Qin-jun¹, ZHANG Wei-xi¹, LIU Bo-yang²

(1. State Key Laboratory of Forest Genetics and Tree Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;

2. Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forestry Trees Ornamental Plants, Ministry of Education, College of Biological Sciences

and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: Compared with the species of Leuce section, the difficulty in plant regeneration during tissue culture for the species of Aigeiros section is a key limiting factor for their application in genetic engineering of forest trees. In this study, the plant growth regulators combination, copper concentration, light intensity, and the selection pressures of kanamycin were investigated using leaves of *Populus × euramericana* cl. ‘Bofeng 1’ as explants, and a stable and high efficient regeneration system was established. Using this system, both the shoot regeneration rate and rooting rate were up to 100%, and the average number of differentiated shoots in each leaf explant was up to 20, and the survival rate of seedlings reached 98%. The optimal selection pressure of kanamycin in shoot inducement for leaf-explant was 40 mg·L⁻¹, and the optimal selection pressure of kanamycin in root inducement of adventitious bud was 20 mg·L⁻¹. The authors also found that differentiation rate of adventitious buds of *Populus × euramericana* cl. ‘Bofeng 1’ could be significantly promoted by increased copper concentration, and this is the first report about the key role of copper (Cu) in explant regeneration of Poplars. This regeneration system with high frequency which was established by the authors was as good as that of species of Leuce section, and it provides a good technological platform for genetic engineering of forest tree which uses the species of Aigeiros section as model materials.

Key words: *Populus × euramericana* cl. ‘Bofeng 1’; high frequency regeneration system; copper

收稿日期: 2011-12-28

基金项目: 林业公益性行业科研专项(201004004)和“863”国家高技术研究发展计划项目(2011AA100201)

作者简介: 崔旭东(1983—), 男, 在读博士研究生, 主要从事林木基因工程育种研究。

* 通讯作者: E-mail: suxh@caf.ac.cn

转基因技术已经成为对林木进行遗传改良的重要手段,而稳定高效的组培再生体系是这一手段的基本前提。杨树作为林木中的模式物种,其组织培养的有关研究很早就有报道,1971年 Winton 等^[1]用欧洲山杨的芽培养获得了杨树的组培苗。目前,已经有几十种杨树通过组织培养成功获得了再生植株^[2-7],但其中多为白杨派树种。黑杨派树种的组培再生相对白杨派则较为困难,虽然国内外许多学者在黑杨组培再生体系建立方面做了许多努力,但由于种内变异较大,其再生体系仍不如白杨派树种^[8-12]。因此,目前林木基因工程(基因克隆、重组、功能解析、转化等)也多以白杨派树种——银腺杨(84K) (*Populus alba* × *P. glandulosa*)、山新杨(*Populus davidiana* × *P. bolleana*)、毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)等为操控模式材料^[13-14]。世界上栽培的杨树有 90% 都属于黑杨派,其中,美洲黑杨与欧洲黑杨的杂种欧美杨无性系在欧洲、美洲、大洋洲以及亚洲广为种植,众多的欧美杨优良新品种在世界各国的木材生产和环境改善中产生着极大的经济和生态效益。在我国,杨树人工林总面积已达 757.23 万 hm^2 ,居世界第 1 位,其中,黑杨派杨树人工林占 90%。与其他杨树树种相比,黑杨派树种具有早期速生、材质好、病虫害少的特点,约 10 年左右就可以产出大径材,这是其他杨树树种所不能实现的。生产实践已证明:美洲黑杨和各种生态适应型的欧美杨是我国各地杨树商业化品种的主体^[15-16]。随着全球气候变化加剧和我国社会、经济发展加快,对速生更强、材质更好、病虫害更少以及适合在干旱、盐碱等立地条件下生长的欧美杨新品种的需求也日益增加。通过转基因技术可快速、定向对欧美杨进行遗传改良,在短期内培育出适应气候变化、满足发展需求的欧美杨新品种。这对稳定并扩大杨树人工林面积,提高我国森林覆盖率,改善生态环境等至关重要;但欧美杨组培再生过程中存在较多的平均分化芽数少、组培苗继代困难等问题,严重制约了转基因技术在欧美杨遗传改良中的应用,其组培再生体系亟待突破。

本研究以典型的欧美杨渤丰 1 号 (*Populus* × *euramericana* cl. 'Bofeng 1')为材料,通过对植物生长调节剂配比、离子浓度、光照条件等的研究,建立与白杨派树种相当的高效再生体系,创立以高生产力黑杨派树种为材料的林木基因工程操控新模式;同时,为创制更优良的适应气候变化的新型欧美杨

转基因新品种奠定基础,使我国杨树人工林可持续发展具有强有力的技术保障。

1 材料与方法

1.1 试验材料

渤丰 1 号杨属聚合型杂种欧美杨,母本为美洲黑杨种内聚合杂种 65 号杨 (*Populus deltoides* cl. '55/65' × *P. deltoides* cl. '2KEN8'),父本为欧洲黑杨种内聚合杂种 (*P. nigra* 'Brummen' × *P. nigra* 'Piccarolo')。它由中国林业科学研究院林业研究所培育,并已获得国家林业局新品种授权及良种审定。2009 年 2 月在中国林业科学研究院科研温室进行渤丰 1 号杨扦插繁殖。

1.2 试验方法

1.2.1 最适分化培养基的选择 取生长健壮的扦插苗自上而下第 3、4 个叶片(含叶柄),用 10% 的次氯酸钠溶液灭菌,将灭菌后的叶片切成长宽各约 1 cm 的正方形小片,正面朝下平铺于培养基上,叶柄切成长约 1 cm 左右的小段,每小段横切 4~6 个伤口置于培养基上。培养基为附加不同浓度的 6-BA (0.8、0.4、0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 NAA (0.08、0.04、0.02 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 MS 培养基(灭菌前 pH 值为 5.8),每个组合重复处理 3 次,每一重复接种 10 个外植体。每 7 d 观察 1 次,培养 28 d 后统计外植体的分化情况。

1.2.2 最适生根培养基的选择 选取生长健壮且长度大于 0.5 cm 的不定芽,在不同浓度 IBA (0.1、0.05、0.02 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 NAA (0.04、0.02、0.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组合的 1/2 MS 培养基上(灭菌前 pH 值为 5.8)进行生根培养。每处理 10 个不定芽,3 次重复。每 7 d 观察 1 次,培养 28 d 后统计不定芽的生根情况。

1.2.3 最适光照强度的确定 选取生长健壮、高度基本一致的不定芽置于不加卡那霉素的最适生根培养基中,于 1 500、2 300、3 100 lx 的不同光照条件下培养,光周期 16 h/8 h,培养 28 d 后统计生根和生长情况。

1.2.4 铜元素对外植体分化的影响 将外植体接种在含不同浓度 (0.000 0、0.003 2、0.006 4、0.012 8、0.025 6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 铜元素的最适分化培养基中,2 300 lx,光周期 16 h/8 h,培养 28 d 后统计不定芽的分化情况。

1.2.5 最适卡那霉素选择压确定 将叶片接种在含不同浓度 (0、10、20、30、40、50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 卡那霉

素(Kan)的最适分化培养基中,每7 d换1次培养基(防止卡那霉素失效),28 d后统计不定芽的分化情况,确定抑制叶片不定芽分化的Kan选择压。

将长度、粗细等基本一致的不定芽接种在附加不同浓度(0、10、20、30、40 mg·L⁻¹)卡那霉素的最适生根培养基中,每7 d换1次培养基,28 d后统计不定芽的生根情况,确定抑制不定芽生根的Kan选择压。

1.2.6 再生苗的移植 当组培苗根系达1~3 cm时,在自然条件下封口炼苗1~3 d,之后将苗小心取出,然后用清水洗去根部培养基,再将其移植到经过高压灭菌的草炭土:珍珠岩为3:1的基质中,浇透水,架好塑料棚保湿。7 d后,揭去塑料薄膜进行培养。

1.3 数据统计

外植体接种28 d后,调查分化或生根情况,各项评价指标如下:

分化率 = 外植体个数/接种外植体的总数 × 100%

平均分化芽数 = 产生的不定芽总数/产生不定芽的外植体个数

生根率 = 生根的外植体个数/接种外植体的总数 × 100%

数据用Excel整理,分化率和生根率进行数据转化后,用SPSS13.0进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 最适分化培养基的选择

将经过表面灭菌的渤丰1号杨叶片和叶柄接种于表1所示的各处理中。7 d后,大部分叶片的伤口处卷曲、突起或陷入培养基中,伤口上布满绿色愈伤组织,部分叶片直接出现芽点,而叶柄则出现伤口处膨大,产生淡绿色愈伤组织的现象;14 d后,部分叶片的愈伤组织分化产生芽点,直接出现的芽点则伸长到0.2~0.5 cm,叶柄部分处理的愈伤组织同样也分化出芽点;接种21 d,芽点伸长至0.2~1.1 cm,叶柄的伸长到0.1~0.5 cm;接种28 d,不定芽长度可达0.5~1.7 cm,叶柄的长约0.5~1.5 cm,而未分化产生芽点的部分愈伤组织由致密、绿色变成蓬松、淡黄色,还有一部分则变为淡红色。统计各处理分化率和平均分化芽数,结果见表1。

表1 渤丰1号杨外植体在不同分化培养基上不定芽的诱导及分化情况

处理编号	植物生长调节剂浓度和比例			外植体/个	分化率/%		平均分化芽/个	
	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	6-BA:NAA		叶片	叶柄	叶片	叶柄
1	0.8	0.08	10:1	30	85b	89c	12c	14b
2	0.8	0.04	20:1	30	70c	77d	10cd	11ce
3	0.8	0.02	40:1	30	30e	40f	8de	10cd
4	0.4	0.08	5:1	30	75c	80d	11cde	12bde
5	0.4	0.04	10:1	30	100a	100a	21a	18a
6	0.4	0.02	20:1	30	71c	79d	10cd	10ce
7	0.2	0.08	2.5:1	30	40d	50e	8de	12bc
8	0.2	0.04	5:1	30	83b	83d	9cd	10ce
9	0.2	0.02	10:1	30	89b	92b	16b	13bc

注:表中叶片和叶柄分别单独进行比较,数字后不同字母表示0.05水平差异显著($P < 0.05$)。

接种28 d后,渤丰1号杨叶片在6-BA 0.4 mg·L⁻¹ + NAA 0.04 mg·L⁻¹组合的不定芽分化率和平均分化芽数均表现为最高,分别为100%和21个(图1、2),显著高于其他组合,叶柄的情况与叶片相同。因此,渤丰1号杨叶片外植体最佳不定芽诱导培养基为:MS + 6-BA 0.4 mg·L⁻¹ + NAA 0.04 mg·L⁻¹。试验结果表明:外植体类型不同不定芽分化的情况也不同,渤丰1号杨叶柄的诱导及分化比叶片容易,但平均分化芽数比叶片的低。

2.2 最适生根培养基的选择

将生长健壮的渤丰1号杨不定芽接种到表2所

设计的各种1/2MS培养基中,结果表明:在处理5中,不定芽的生根率最高,达到100%,根短且粗壮、分支较多、基本没有愈伤组织产生(图3),由表2还可看出:单独使用IBA基本可以避免愈伤组织的产生,但生成的根既细又长,且数量较少,基本没有次级根产生。为了保证移植的成活率,需加入适量的NAA,以促进根的增粗和次级根的发生,试验结果表明:IBA与NAA的比例在2.5:1.0,且其含量分别为IBA 0.05 mg·L⁻¹、NAA 0.02 mg·L⁻¹时,渤丰1号杨不定芽的生根效果最好。

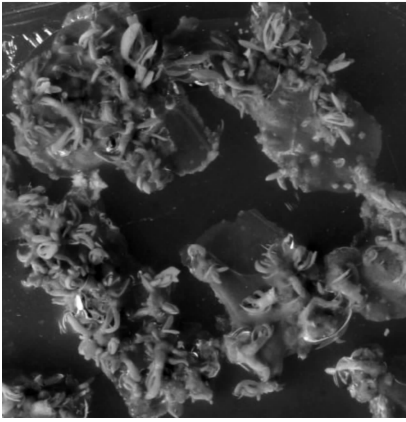


图1 叶片不定芽分化(将培养皿倒过来所拍的照片)

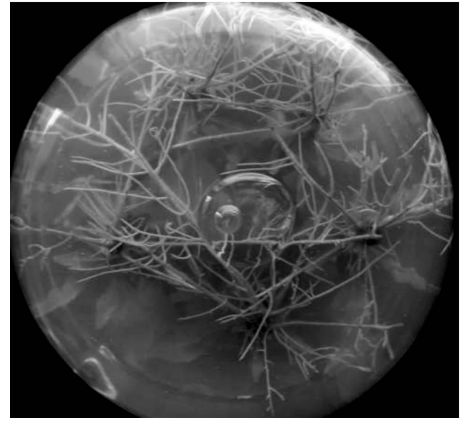


图3 不定芽生根情况



图2 叶片不定芽的伸长

2.3 光照强度对渤丰1号杨组培苗生长的影响

将30个渤丰1号杨的不定芽接种在添加0.05

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 和 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 $1/2 \text{ MS}$ 培养基中,分别置于不同光强的培养箱中,光周期 $16 \text{ h}/8 \text{ h}$,培养 30 d ,结果见表3。较弱的光强有利于渤丰1号杨幼苗的长高,但植株较为纤细,且叶片较小(图4-a);在光强为 3 100 lx 时,幼苗最矮,叶片较大,但底部叶片易衰老发黄(图4-b);只有在光强为 2 300 lx 时,幼苗最健壮,茎秆较粗,叶片较为伸展,且底部基本无发黄叶片(图4-c)。在不同光强下渤丰1号杨的不定芽均能生根,但在 1 500 lx 光强下,幼苗根纤细且长,次级根少;在 3 100 lx 光强下,根粗短且少;而在 2 300 lx 光强下,根粗壮,且次级根多。因此,可见光强为 2 300 lx 较为适合渤丰1号杨组培苗的生长发育。

表2 渤丰1号杨不定芽在不同生根培养基上的生根情况

处理编号	植物生长调节剂浓度和比例			不定芽/个	生根率/%	根系生长状况
	IBA/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	IBA:NAA			
1	0.10	0.04	2.5:1	30	90b	根粗且多,愈伤组织多
2	0.10	0.02	5:1	30	85bc	根粗,愈伤组织少
3	0.10	0.00	—	30	54e	根较细,无愈伤组织
4	0.05	0.04	1.25:1	30	78dc	根粗,较多,愈伤组织多
5	0.05	0.02	2.5:1	30	100a	根粗,次级根多,基本无愈伤组织
6	0.05	0.00	—	30	75d	根细长,较少,无愈伤组织
7	0.02	0.04	0.5:1	30	55e	根细长,愈伤组织多
8	0.02	0.02	1:1	30	70d	根细长,愈伤组织少
9	0.02	0.00	—	30	50e	根细而少,无愈伤组织

注:表中数字后不同的字母表示 0.05 水平差异显著($P < 0.05$)。

表3 不同光照强度对渤丰1号杨组培苗生长的影响

处理编号	光照强度/ lx	不定芽/个	10 d 后平均株高/ cm	20 d 后平均株高/ cm	30 d 后平均株高/ cm	生根率/%
1	1 500	30	2.5a	4.8a	7.4a	100a
2	2 300	30	2.5a	4.4a	6.5a	100a
3	3 100	30	1.7b	3.4b	5.1b	100a

注:数字后不同的字母表示 0.05 水平差异显著($P < 0.05$)。

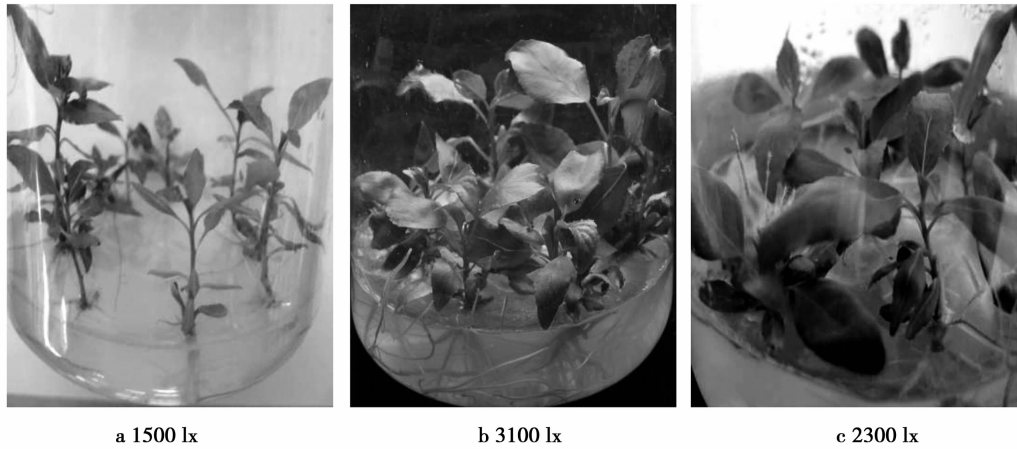


图4 不同光强对组培苗生长的影响

2.4 不同浓度铜元素对渤丰1号杨外植体分化的影响

将经表面灭菌的渤丰1号杨叶片接种于含不同浓度铜元素且添加了 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的MS培养基上,培养28 d后的结果见表4。表4表明:增加铜元素的浓度能有效地提高叶片的分化率,在铜元素浓度为 $0.0128 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,渤丰1号杨叶片的不定芽分化率达100%,平均分化芽数18个,是提高浓度前的2.6倍;但当铜元素浓度增加到一定水平,就会对不定芽的分化起抑制作用。可见,铜元素浓度在 $0.0128 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右能明显促进渤丰1号杨不定芽的分化。

表4 不同浓度铜元素对渤丰1号杨外植体分化的影响

处理编号	铜元素浓度 $/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	叶片数 /个	分化率 /%	平均分化芽 /个
1	0.000 0	30	10d	1d
2	0.002 3	30	30c	4c
3	0.006 4	30	76b	7b
4	0.012 8	30	100a	18a
5	0.025 6	30	95a	16a

注:数字后不同字母表示0.05水平差异显著($P < 0.05$)。

2.5 最适卡那霉素选择压筛选

配制含有不同浓度卡那霉素(Kan)的最适分化培养基和生根培养基,分别接种30个渤丰1号杨的叶片外植体和生长健壮的不定芽,培养28 d后对结果进行统计。表5表明: $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素抑制渤丰1号杨叶片的诱导与分化, $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素抑制渤丰1号杨不定芽的生根。

2.6 渤丰1号杨组培苗的温室移植

选取根系发达,生长健壮的无菌苗,用镊子将培养基捣碎,小心将苗取出,用自来水冲掉根上残留的

培养基,再移植到装有营养基质的小盆中,最后,将其放入事先搭好的塑料棚内,保持温度 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、湿度90%左右,定期浇水。7~10 d后,揭去塑料薄膜,正常管理,成活率可达98%左右。

表5 不同浓度卡那霉素(Kan)对渤丰1号杨叶片分化率及不定芽生根率的影响

处理编号	Kan浓度 $/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	外植体 /个	分化率 /%	生根率 /%
1	0	30	100	100
2	10	30	76	23
3	20	30	52	9
4	30	30	36	0
5	40	30	7	0
6	50	30	0	0

3 结论与讨论

3.1 以黑杨派树种为材料的高效再生体系建立

能否成为林木基因工程研究的模式材料关键在于所选材料是否拥有高效的组培再生体系。渤丰1号杨再生体系的建立,实现了欧美杨外植体的高效再生,渤丰1号杨叶片的平均分化芽数可达21个,组培苗可顺利继代培养,是目前黑杨派树种中最佳体系之一;而Coleman等^[3]、陈正华^[17]、王斌等^[18]、王红蕾^[19]报道的白杨派叶片的平均分化芽数仅5~12个。这为研究者以生产实践中占主体地位的黑杨派树种为材料进行基因克隆、转化以及基因在林木中的功能解析和应用等提供了前提,越来越多的林木基因工程研究将会选择以黑杨派树种为模式材料,这将为通过转基因技术培育出适应性和商品化更强的杨树新品种奠定坚实的基础。

3.2 铜元素可促进杨树不定芽的诱导与分化

铜元素是植物正常生长发育必需的微量元素,作为许多酶的主要成分或辅助因子,其在植物的生长过程中是必不可少的。许多研究表明:MS 基本培养基中微量元素的含量对植物组织培养有明显影响,不同植物或品种对微量元素配比的要求有较大差异。Purnhauser^[20]通过对小麦再生体系的研究发现,培养基中铜元素含量为 $0.64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,比原始 MS 培养基(铜元素含量 $0.0064 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的植株再生率提高了 8 倍。杨跃生等^[21]通过在分化培养基上添加各种微量元素的试验发现,只有铜元素具有明显的促进水稻愈伤组织植株再生的作用。还有研究表明:铜元素对大麦的胚性愈伤再生率以及巴西橡胶树组培切苗的生根等都有促进作用^[22-25]。本研究证明:比原始 MS 培养基铜元素含量高 1 倍的浓度($0.0128 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)能有效促进杨树不定芽的诱导和分化,平均分化芽数提高了 2.6 倍,这在国内外还未见有类似报道。推测铜元素可能作为保持各种酶活性的有效物质与培养基中植物生长调节剂、营养元素相互作用,并与外植体内源植物生长调节剂相互影响,进而激发杨树外植体细胞或愈伤组织中与再生能力有关基因的表达,最终促进不定芽的诱导与分化;但是,还需进一步的试验以确定铜元素对杨树外植体分化的影响程度和具体机制,以便更好地利用铜元素来促进杨树组织培养获得更多的突破,为后续的杨树基因工程研究提供基本条件。

参考文献:

- [1] Winton L. Tissue Culture Propagation of European Aspen[J]. Forest Science, 1971, 17(3): 348-350
- [2] Ahuja M R. Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen [J]. Silvae Genet, 1983, 32(3-4): 131-135
- [3] Coleman G D, Ernst S G. *In vitro* shoot regeneration of *Populus deltoides*: effect of cytokinin and genotype[J]. Plant Cell Rep, 1989, 8(8): 459-462
- [4] Vinocur B, Carmi T, Altman A, et al. Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula* L.) roots cultured in liquid media[J]. Plant Cell Rep, 2000, 19(12): 1146-1154
- [5] Wang H M, Liu H M, Wang W J, et al. Effects of Thidiazuron, basal medium and light quality on adventitious shoot regeneration in vitro cultured stem of *Populus alba* × *P. berolinensis*[J]. Journal of Forestry Research, 2008, 19(3): 257-259
- [6] Bosela M J. Effects of β -lactam antibiotics, auxins, and cytokinins on shoot regeneration from callus cultures of two hybrid aspens, *Populus tremuloides* × *P. tremula* and *P. xcanescens* × *P. gradidentata*[J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2009, 98(3): 249-261
- [7] Yevtushenko D P, Misra S. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of commercial hybrid poplar *Populus nigra* L. × *P. maximowiczii* A. Henry[J]. Plant Cell Rep, 2010, 29(3): 211-221
- [8] 陈彩霞,沈 昕,王祚宁,等. 派间杂种 110 杨再生系统的建立[J]. 林业科学研究,2007,20(2):287-291
- [9] 张 蕾,苏晓华,张冰玉,等. 京 2 杨组培条件的优化及再生体系建立[J]. 林业科学研究,2007,20(6):787-793
- [10] Gary D C, Stephen G E. *In vitro* shoot regeneration of *Populus deltoides*: effect of cytokinin and genotype[J]. Plant Cell Rep, 1989, 8(8): 459-462
- [11] Chaturvedi H C, Sharma A K, Agha B Q, et al. Production of cloned trees of *Populus deltoides* through *in vitro* regeneration of shoots from leaf, stem and root explants and their field cultivation [J]. Indian Journal of Biotechnology, 2004, 3(2): 203-208
- [12] Mingozi M, Montello P, Merkle S. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of eastern cottonwood (*Populus deltoides*) cultured under photoautotrophic conditions [J]. Tree Physiology, 2009, 29(3): 333-343
- [13] 苏晓华,张冰玉,黄秦军,等. 我国林木基因工程研究进展及关键领域[J]. 林业科学,2003,39(5):111-118
- [14] 苏晓华,张冰玉,黄秦军,等. 杨树基因工程育种[M]. 北京:科学出版社,2009
- [15] 马常耕. 我国杨树育种中的若干问题商榷[J]. 青海农林科技, 2004(B03):1-8
- [16] 苏晓华,丁昌俊,马常耕. 我国杨树育种的研究进展及对策[J]. 林业科学研究,2010, 23(1): 31-37
- [17] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京:高等教育出版社,1986
- [18] 王 斌,李百炼,张金凤,等. 杂种白杨离体再生体系的建立[J]. 西北植物学报,2009,29(4):704-710
- [19] 王红蕾. 山新杨高效组培再生体系的建立[J]. 北方园艺,2010(13):174-175
- [20] Purnhauser L. Stimulation of shoot and root regeneration in wheat, *Triticum aestivum* callus cultures by copper[J]. Cereal Res. Commun, 1991, 19: 419-423
- [21] 杨跃生,简玉瑜,郑 迎. 铜在水稻愈伤组织培养再生植株中的促进作用[J]. 中国水稻科学,1999,13(2):95-98
- [22] 李会勇,尹 钧,刘 雷. Cu^{2+} 浓度对啤酒大麦幼胚组织培养与植株再生的影响[J]. 麦类作物学报,2003,23(2):27-29
- [23] 王树昌,于晓玲,赵平娟. Cu 离子对巴西橡胶树组织培养的影响[J]. 热带农业工程,2010,34(6):28-30
- [24] Purnhauser L, Gyulai. Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 35: 131-139
- [25] Jain P, Kachhwaha S, Kothari S L. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni by using high copper levels in the culture medium[J]. Scientia Horticulturae, 2009, 119(3): 315-319