

新型试管花卉姬松高效再生体系的研究

康冬茹, 郭先锋*, 李圆圆, 胡小蓉

(山东农业大学林学院, 山东泰安 271018)

摘要: 以新型试管花卉多肉植物姬松 (*Crassula clavata* N. E. Brown) 为材料进行高效再生体系的研究。结果表明: 以姬松茎尖为外植体的初代培养中, MS 培养基添加 IBA 并未诱导出根系生成, 而是直接诱导出丛生芽, 在 MS + IBA 0.3 mg · L⁻¹ 培养基上, 由叶片表面诱导出的丛生芽质量最佳; 在继代培养中, 最佳培养基为 MS + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹, 诱导产生大量胚性愈伤组织, 且表面有芽体分化; 在彩色培养中, 在 1/2MS 中添加 0.25 mg · L⁻¹ 的食用色素亮蓝, 观赏效果佳且对植株生长无毒害。

关键词: 姬松; 快繁; 试管花卉; 再生体系

中图分类号: S 68

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 11-2287-08

A Highly Efficient *in Vitro* Regeneration Protocol for *Crassula clavata* as Novel Tube-flower

KANG Dong-ru, GUO Xian-feng*, LI Yuan-yuan, and HU Xiao-rong

(College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: Tube-flower is a novel form of *in vitro* plant products. A highly efficient *in vitro* regeneration system was established for the production of succulent plant *Crassula clavata* N. E. Brown. In primary culture, adventitious buds instead of adventitious roots were differentiated from the shoot explants on MS medium supplemented with different concentrations of IBA; The highest multiplication rate and high-quality adventitious buds were obtained on the optimal medium of MS containing 0.3 mg · L⁻¹ IBA. In subculture, the medium of MS containing 0.1 mg · L⁻¹ NAA and 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA was screened out for large amounts of embryogenic callus could be significantly induced and sprouts could be further differentiated on the callus surface. In culture for colorful decorative products, 0.25 mg · L⁻¹ edible colourant to half strength MS medium was feasible to give pleasant visual effect without harmful or toxic effect on the *in vitro* plants.

Key words: *Crassula clavata* N. E. Brown; micro-propagation; tube-flower; regeneration system

试管花卉是观赏植物组织培养生产的一种高附加值的衍生品(黄浅等, 2007)。开发试管花卉, 首先需要研发其再生体系, 而后将无菌苗接种于装有无毒无害彩色基质的观赏瓶中, 使之可直接陈设观赏(叶炜等, 2007)。目前已有学者对玫瑰 *Rosa rugosa* (褚剑峰等, 2008)、孔雀草 *Tagetes patula*

收稿日期: 2013-05-15; 修回日期: 2013-09-02

基金项目: 山东省泰安市大学生科技创新项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: guoxf@sdau.edu.cn)

(齐迎春 等, 2012) 等开花植物进行了相关开发研究, 但由于开花时间较短, 在试管内的开花诱导难度较大, 开花不稳定(刘义存 等, 2006), 在一定程度上限制了其推广应用。

姬松 (*Crassula clavata* N. E. Brown) 系景天科 Crassulaceae 青锁龙属 *Crassula* 多年生肉质草本植物, 植株低矮, 叶肉质宽厚, 常年翠绿, 观赏期长。目前姬松主要以带土小盆栽为主, 扦插繁殖。本试验中以姬松为试材进行组织培养再生体系以及试管培养效果的研究, 以期获得可长期稳定观赏的试管花卉新类型。

关于景天科植物再生体系的研究一方面集中于观赏价值, 如燕子掌 *Crassula argentea* (Paterson & Rost, 1981; Paterson, 1983)、玉树 *C. arborescens* (刘永立 等, 2007)、长寿花 *Kalanchoe blossfeldiana* (陈超 等, 2004; 彭承霞, 2008; Castelblanque et al., 2010; 齐迎春 等, 2011)、圆扇八宝 *Hylotelephium sieboldii* (Nakano et al., 2005) 等, 以快繁、多倍体品种培育、种质资源保存等为目的; 另一方面集中于药用价值, 如大苞景天 *Sedum amplibracteatum* (赵莉, 2005) 和红景天 *Rhodiola* (南桂仙, 2004; 刘海军, 2006; 沈梦圆, 2008), 主要是细胞培养及其药用活性成分提取。开发试管花卉产品再生体系的研究尚未见报道。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验于 2010—2011 年进行。盆栽姬松 (*Crassula clavata* N. E. Brown) 购自山东省泰安花卉苗木交易市场, 植株生长健壮, 无病虫害。

1.2 方 法

以具有 2~6 个叶片的 1.0~2.0 cm 茎尖为外植体, 于含洗洁精的水溶液中浸泡 30 min, 流水冲洗; 在无菌条件下先用 70%酒精表面消毒 10 s, 再用 2%次氯酸钠溶液处理 10 min, 无菌水冲洗 3~5 次后接种。

首先接种于仅含有不同浓度 IBA 的 MS 培养基上进行初代培养(表 1), 每瓶接种 3 个外植体, 每个处理重复 3 次。之后, 取无菌茎尖, 接种到含有不同浓度 NAA 和 6-BA 的继代培养基上, 采取 2 因素 3 水平设计, 根据其它相近种经验值删减部分培养基配方, 着重筛选 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 对 NAA 适宜浓度(表 2), 每瓶接种 3 个外植体, 每个处理重复 3 次。

彩色培养中, 以食用色素亮蓝 ($\text{C}_{37}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_9\text{S}_3$) 为筛选颜色, 将所获得的丛生芽接种到含有不同浓度亮蓝的生长培养基上(表 3), 每瓶接种 3 个外植体, 每个处理重复 5 次。

仅彩色培养基本培养基为 1/2MS, 其余均以 MS 为基本培养基; 培养基中均添加 3%蔗糖和 0.6%琼脂, pH 5.8。

各阶段培养条件为温度 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 、光照 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、光照强度 2000 lx 。

1.3 试管花卉产品的跟踪观察

将试管苗接种到 $13 \text{ cm} \times 3.5 \text{ cm}$ 和 $4.0 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$ 两种规格的盛有添加不同色素培养基的玻璃瓶中, 在光照培养箱中培养 5 d 后放置于室内散射光下, 观察记录植物材料在玻璃瓶内的生长情况。

1.4 数据统计和分析

观测统计外植体污染率(接种后 7 d)、芽的发生时间、芽的发生位置、芽的增殖系数、芽长势、愈伤组织出现时间、愈伤组织类型以及生根率。所得数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 采用

最小差异显著 (Least Significant Difference, *LSD*) 进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒体系效果

对姬松茎尖外植体增加清洗时间, 并采用低浓度次氯酸钠进行消毒, 效果较好, 污染率仅为 1.3%; 而且外植体未见畸形。

2.2 IBA 对初代培养的影响

试验结果显示, 姬松对 IBA 反应与一般植物有很大差异, 而与白花小松相似: 不论添加何种浓度 IBA, 外植体均直接发育为丛生芽, 不形成不定根, 仅在无 IBA 的培养基上偶见外植体有少量须根生成; 丛生芽的发生位置、时间、数量和生长状况则因 IBA 浓度不同而有差异 (表 1)。

当培养基中不添加 IBA 时, 芽体发生于叶腋处 (图 1, A), 为腋芽, 腋芽发生较早, 约接种后 25 d 出现, 与自然状态腋芽萌发方式一致, 增殖系数低, 芽长势强健。

表 1 诱导芽在不同浓度 IBA 的培养基中的生长状况

Table 1 Growth performance of buds induced on different medium with different concentration of IBA

IBA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	诱导芽位置 Position of buds induced	时间/d Time	增殖倍数 Multiple	长势 Growth performance
0	叶腋处 Leaf axis	25	8.67 ± 3.28 d	强健 Strong
0.1	芽体基部 Shoot base	35	7.67 ± 0.88 d	一般 Medium
0.2	叶表面 Leaf surface	45	136.00 ± 19.2 b	强健 Strong
0.3	叶表面 Leaf surface	45	199.67 ± 25.70 a	强健 Strong
0.5	叶表面 Leaf surface	45	62.67 ± 8.65 c	较差 Poor
1.0	叶表面 Leaf surface	45	25.00 ± 5.20 cd	较差 Poor

注: 增殖倍数用平均值 \pm 标准误表示, 其后字母表示其差异显著性 ($P \leq 0.05$)。

Note: Proliferation multiple is indicated by Mean \pm SD and the different letters in the column indicate significant level ($P \leq 0.05$).

当 IBA 浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 丛生芽发生于芽体基部 (图 1, B), 于接种后 35 d 出现, 增殖系数低, 长势一般。

当 IBA 浓度为 $0.2 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 丛生芽发生于叶片表面 (图 1, C), 于接种后 45 d 出现。其中, IBA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时丛生芽长势最好且数量最多, 其增殖倍数高达 199.67, 显著高于其它培养基, 而且芽体嫩绿, 生长迅速, 发育初期具 2 片嫩叶 (图 1, C), 约 60 d 后长成小苗 (图 1, D)。IBA 为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 丛生芽生长良好, 但增殖系数略低于 IBA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理; 当 IBA 浓度为 $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 丛生芽长势明显欠佳, 初期黄化弱小, 后期黄化加剧或是褐化死亡, 且其增殖倍数明显下降。

可见, IBA 抑制姬松生根却促进芽增殖, $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IBA 可显著诱导大量健壮丛生芽的发生, 因此 MS + IBA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是姬松丛生芽诱导的最佳培养基; 高浓度 IBA 不适宜芽的正常发育。

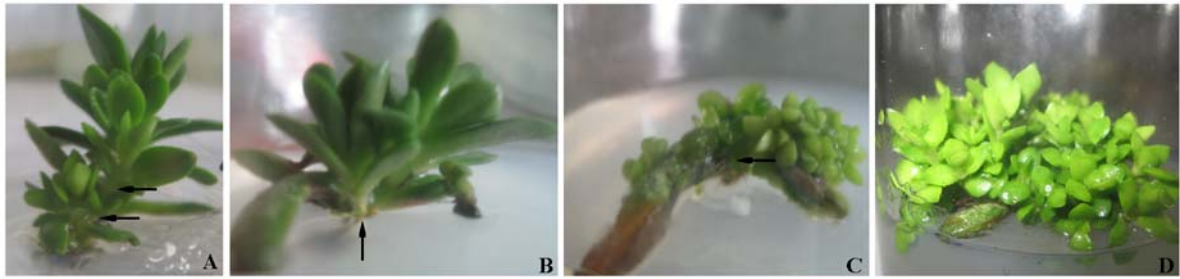


图1 不同浓度 IBA 处理下丛生芽的诱导部位

A: 叶腋; B: 芽体基部; C、D: 叶片表面。

Fig. 1 Position of buds induced by different concentration of IBA

A: Leaf axil; B: Shoot base; C, D: Leaf surface.

2.3 两种植物生长调节剂对姬松继代培养的影响

继代培养时 (图 2), 6 种培养基均可以形成愈伤组织, 而后愈伤组织脱分化形成 (或不形成) 芽体 (表 2)。

在 MS + 6-BA 0.1 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 下同) + NAA 1.0 和 MS + 6-BA 0.5 + NAA 1.0 培养基上, 始终未见有芽体发生, 这可能与其诱导的愈伤组织数量较少、活性较低且易褐化死亡相关。而在 MS + 6-BA 0.1 + NAA 0.5、MS + 6-BA 0.5 + NAA 0.5 和 MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.5 这 3 种培养基上, 培养初期茎尖有数量不等但相对较少的腋芽出现, 系芽体本身腋芽的自然发育; 之后在芽体基部均产生大量愈伤组织, 这些愈伤组织紧密, 外形圆润, 颜色翠绿有光泽, 表面没有点状突起, 属于普通愈伤组织, 活性强, 增殖迅速但未见分化。

MS + 6-BA 0.5 + NAA 0.1 培养基的愈伤类型和诱导模式相对独特, 增殖效果最佳。叶片与培养基接触部分首先形成胚性愈伤组织 (图 2, A), 其表面分布成簇点状突起 (图 2, B), 而后蔓延至整个叶片, 并逐渐分化出大量不定芽, 不定芽初期呈两片叶状 (图 2, C)。若将胚性愈伤组织切割后继续在此培养基上进行继代培养, 则胚性愈伤组织生长旺盛, 体量增大, 而且愈伤表面的芽体也会继续分化并发育, 增殖系数非常可观 (图 2, D)。因此为最佳继代培养基。

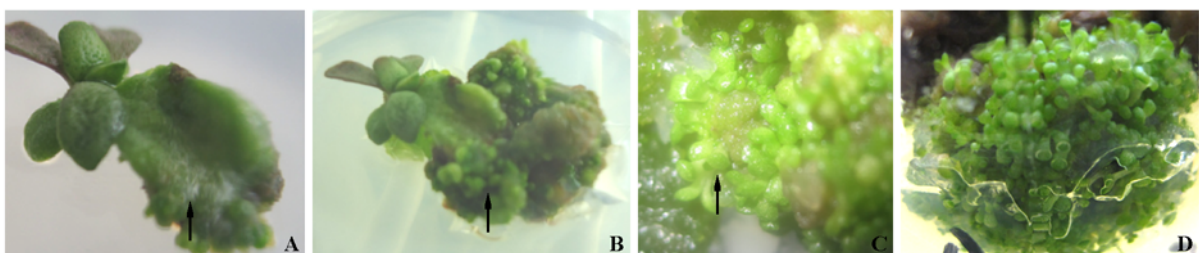


图2 继代培养基 MS + NAA 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对于胚性愈伤组织的诱导情况

A: 愈伤组织发生于叶片表面; B: 胚性愈伤组织; C: 愈伤组织表面于分化初期形成的不定芽;

D: 胚性愈伤组织继代培养中形成的大量不定芽。

Fig. 2 Occurrence of embryogenic callus induced by the optimum medium MS + NAA 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

A: The callus was induced on the leaf surface; B: Embryogenic callus; C: Adventitious buds initially

differentiated from the callus; D: Adventitious buds abundant in the

subculture of the embryogenic callus.

表 2 不同 NAA 和 6-BA 浓度对愈伤和不定芽诱导的影响

Table 2 Effects of different concentration of NAA and 6-BA on the induction of callus and buds

6-BA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	愈伤类型 Callus type	愈伤位置 Callus position	芽体类型 Bud type	芽质量 Bud quality
0.1	0.5	普通 Ordinary	茎 Shoot	腋芽 Axillary bud	一般 Poor
0.1	1.0	普通 Ordinary	叶 Leaf	无 None	
0.5	0.1	胚性 Embryogenic	叶 Leaf	不定芽 Adventitious bud	强 Strong
0.5	0.5	普通 Ordinary	茎 Shoot	腋芽 Axillary bud	较好 Medium
0.5	1.0	普通 Ordinary	茎 Shoot	无 None	
1.0	0.5	普通 Ordinary	茎 Shoot	腋芽 Axillary bud	一般 Poor

2.4 食用色素亮蓝对姬松彩色培养的影响

彩色培养是试管花卉生产体系和一般再生体系相区别的环节。由表 3 可知, 食用色素亮蓝 ($\text{C}_{37}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_9\text{S}_3$) 抑制植株增殖系数和长势, 抑制效应与亮蓝浓度呈正相关, 当浓度 $\geq 0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 繁殖倍数下降, 叶片减少, 植株矮小, 生长缓慢。相比之下, 当浓度为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 增殖倍数虽略有降低, 但与对照差异不显著, 而且此浓度下植株生长仍旧很正常; 此外, 此浓度下培养基颜色亮度适宜。因此, 综合考虑试管花卉的色彩观赏性和植物生长发育状态, 得出最佳的彩色培养基为 $1/2\text{MS} + \text{色素 } 0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

从表 3 还可知, 随着色素浓度增加, 其生根率逐渐降低, 当培养基中色素浓度为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 生根率与对照无显著差异。

表 3 不同色素浓度对芽体生长的影响

Table 3 Effects of different concentrations of colourant on growth status of shoots

色素浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Concentration	增殖倍数 Proliferation multiple	长势 Growth performance	生根率/% Rooting percentage
0	$7.77 \pm 1.34 \text{ a}$	强 Strong	$48.00 \pm 0.05 \text{ a}$
0.25	$5.57 \pm 1.27 \text{ ab}$	强 Strong	$40.00 \pm 0.06 \text{ ab}$
0.50	$5.50 \pm 0.50 \text{ ab}$	较好 Medium	$32.00 \pm 0.05 \text{ b}$
0.75	$3.75 \pm 0.75 \text{ b}$	较好 Medium	$12.00 \pm 0.05 \text{ c}$
1.00	$2.50 \pm 0.53 \text{ b}$	一般 Poor	$8.00 \pm 0.05 \text{ c}$

注: 增殖倍数用平均值 \pm 标准误表示, 不同小写字母表示 0.05 水平的显著性差异。

Note: Proliferation multiple is indicated by mean \pm SD and the different letters in the column indicate significance level of 0.05.

2.5 试管苗终端包装和观赏效应

采用筛选出的最佳彩色培养基配方, 取继代培养环节生产出来的丛生芽经壮苗后, 即可进行试管花卉的终端生产。根据芽体类型和大小, 本研究中采用了两种规格的容器, 大苗较适合 $13 \text{ cm} \times 3.5 \text{ cm}$ 瓶体 (图 3, A), 小苗较适合 $4.0 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$ 瓶体 (图 3, B), 且两种规格产品可以组合 (图 3, C)。

观察结果显示: 姬松在以上两种规格玻璃容器的彩色培养基中生长健壮, 观赏效果好。具体表现为: 植株矮小, 叶色翠绿, 叶形圆润有光泽, 配以彩色培养基, 色彩生动, 趣味性强; 易于管理, 培养洁净; 生长缓慢, 观赏期长达 4~6 个月, 具体观赏期会随培养基量和植物体量而有差异。

在观赏期中, 植株会部分生根, 但生根与否及根系多少基本不影响其观赏特性和存活时间。



图3 姬松试管花卉成品

A: 产品 (13 cm × 3.5 cm); B: 产品 (4.0 cm × 1.5 cm); C: 两种规格的产品组合。

Fig. 3 Products of tube flower of *Crassula clavata* plants

A: Products (13 cm × 3.5 cm); B: Products (4.0 cm × 1.5 cm); C: Combination of two sizes of products.

3 讨论

3.1 姬松外植体在单一 IBA 处理下的特别反应及其继代表现

以茎尖为外植体建立植物初代培养体系时,常采用含有 BA 的组合,例如草莓茎尖接种在 MS + 6-BA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上最有利于不定芽的发生 (Madani et al., 2013)、景天科圆扇八宝在 $1/2\text{MS} + \text{NAA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 6\text{-BA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上可高效获得不定芽 (Nakano et al., 2005)。本实验室在建立景天科植物白花小松 (*Villadia batesii*) 再生体系时发现,仅有 IBA 时,不能促进其生根,适宜浓度的 IBA 可促进其丛生芽的大量增殖,因此本研究中在建立初代培养体系时,尝试采用单一植物生长调节剂 IBA 进行丛生芽诱导,结果表明姬松对 IBA 反应与白花小松相似, $0.1 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IBA 处理时,外植体直接发育为丛生芽, $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IBA 可促进大量健壮丛生芽的发生。姬松和白花小松外植体对单一 IBA 的这种特殊反应,应在景天科其它植物中进一步研究。

作者也尝试将初代培养中形成的无菌茎尖接种到最佳丛生芽诱导培养基 MS + IBA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中,以期进一步诱导丛生芽发生,但无菌茎尖只有少部分腋芽萌发,并非如初代培养那样在其叶片表面直接分化大量丛生芽。试管苗叶片与大田苗叶片在相同培养基上分化方式和分化能力不同,这在对褐斑伽蓝 (*Kalanchoe tomentosa*) 研究中 (赵娟 等, 2009) 也曾出现,推测原因可能是初代培养中所提供的无菌异养环境与自然环境差别较大,大田叶片外植体的再生能力被激发,而试管苗继代培养时则并未发生生长环境的转变,因此未能激发其再生能力。

3.2 影响姬松胚性愈伤组织发生发育的因素

继代培养中, 许多景天科植物例如圆扇八宝 (Nakano et al., 2005)、长寿花 (林玉玲 等, 2007) 和 白花小松 (本实验室, 数据未发表) 均是仅利用 NAA 和 BA 就获得了不定芽的高效再生, 因此在本试验的继代培养中, 采用 6-BA 和 NAA 的不同浓度组合以诱导愈伤组织发生和脱分化, 以期达到连续培养大量增殖的目的。

根据研究结果, 6-BA 和 NAA 的浓度组合中, 当 NAA 为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不定芽发生完全被抑制; 当 NAA 为 $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 则仅形成普通愈伤并且活性很低; 而当 NAA 为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 形成胚性愈伤——该类型愈伤组织表面密布点状突起并伴随芽体大量分化, 增殖系数大, 并且芽体质量佳。据此推出 NAA 浓度对姬松愈伤组织的诱导方向、生长和分化具有决定性作用, 高浓度时抑制愈伤组织的发生及其后发育, 低浓度时 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 则有利于胚性愈伤的形成。迄今, 景天科青锁龙属 (*Crassula*) 植物中尚未有胚性愈伤组织发生的报道, 姬松胚性愈伤组织的被诱导形成必将为相关植物研究提供有益借鉴。需要指出的是, 由胚性愈伤组织表面脱分化获得的两片幼叶, 类似于胚状体, 但是否有体细胞胚的形成, 尚无直接证据, 需组织解剖学研究的考证。

3.3 姬松试管花卉产品的工艺流程

观赏试管花卉高效生产体系研发的核心是初代培养、继代培养和彩色培养 3 个阶段中最优培养基配方的筛选。此外, 继代培养后可适当进行壮苗培养, 即在将长势较弱的组培苗接种在无激素 MS 培养基上培养, 以促进其健壮生长。本研究筛选出姬松初代培养、继代培养和彩色培养的最佳配方, 并且跟踪观察了其试管花卉产品, 发现其观赏效果佳, 观赏周期可长达 4 ~ 6 个月; 此外, 较之于玫瑰、长寿花、孔雀草等开花植物, 省略了诱导开花的繁琐步骤, 简化了生产程序。该技术体系可完全用于姬松观赏试管苗产品的生产。

References

- Castelblanque L, García-Sogo B, Pineda B, Moreno V. 2010. Efficient plant regeneration from protoplasts of *Kalanchoe blossfeldiana* via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100 (1): 107 - 112.
- Chen Chao, Wang Gui-lan, Tian Li-min, Cui Rui-sheng. 2004. Embryoid induction and regeneration in callus of *Kalanchoe blossfeldiana*. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (2): 249 - 252. (in Chinese)
- 陈超, 王桂兰, 田立民, 崔瑞生. 2004. 长寿花胚性愈伤组织的诱导及胚状体再生. *园艺学报*, 31 (2): 249 - 252.
- Chu Jian-feng, Zheng Qi, Sun Ye-fang, Zhao Hu, Xing Hai, Lu Guo-quan. 2008. Study on test-tube flowering plantlets of *Rosa rugosa* and commercial production. *Acta Agriculturae Shanghai*, 24: 130 - 132. (in Chinese)
- 褚剑峰, 郑琪, 孙叶芳, 赵虎, 邢海, 陆国权. 2008. 玫瑰试管花技术研究及商品化生产. *上海农业学报*, 24: 130 - 132.
- Huang Qian, Lai Zhong-xiong, Luan Ai-ye, Huang Shuang-long. 2007. Production and applications of tube-flowers. *Subtropical Agriculture Research*, (3): 300 - 304. (in Chinese)
- 黄浅, 赖钟雄, 栾爱业, 黄双龙. 2007. 试管花卉的生产与应用. *亚热带农业研究*, (3): 300 - 304.
- Lin Yu-ling, Lai Zhong-xiong, Lin Jing, Lin Xiu-lian, Huang Shuang-long, Chen Yi-ting, Ke Cun-xiang. 2007. Bud proliferation and rooting of four genotypes of *Kalanchoe blossfeldiana*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 28 (2): 80 - 86. (in Chinese)
- 林玉玲, 赖钟雄, 林菁, 林秀莲, 黄双龙, 陈义挺, 柯存祥. 2007. 4 个品种长寿花试管苗的增殖与生根培养. *热带作物学报*, 28 (2): 80 - 86.
- Liu Hai-jun. 2006. Studies on tissue and cell cultures and extraction of phytochemical constituents of *Rhodiola* plants [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 刘海军. 2006. 红景天组织和细胞培养及药用有效成分提取研究 [博士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Liu Yi-cun, Zhou Jun-hui, Bai Zhi-chuan. 2006. Research on plant *in vitro* flowering. *Southwest Horticulture*, 34 (5): 20 - 22. (in Chinese)

- 刘义存, 周俊辉, 白志川. 2006. 试管开花的研究评述. 西南园艺, 34 (5): 20 - 22.
- Liu Yong-li, Long Zi-li, Gao Yue, Takashi Harada. 2007. Organ formation and plant regeneration *in vitro* tissue culture of *Crassula arborescens*. Journal of Zhejiang University: Agriculture and Life Sciences, 33 (6): 591 - 596. (in Chinese)
- 刘永立, 龙自立, 高 月, 原田隆. 2007. 玉树组织培养中的器官形成与植株再生. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 33 (6): 591 - 596.
- Madani G, Ghobadi S, Sayed-Tabatabaei B E, Talebi M, Yamchi A. 2013. Effect of plant growth regulators and explant types on regeneration and micropropagation of a commercial strawberry cultivar (*Fragaria × ananassa* cv. Selva) . Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture-Isfahan University of Technology, 4 (15): 111 - 123.
- Nakano M, Nagai M, Tanaka S, Nakata M, Godo T. 2005. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of the Japanese endangered *Hylotelephium sieboldii* (Sweet ex Hook.) H. Ohba and *H. sieboldii* var. *ettyuense* (Tomida) H. Ohba. Plant Biotechnology, 22 (3): 221 - 224.
- Nan Gui-xian. 2004. Study on *Rhodiola Sachalinensis* A. Bor by callus culture [M. D. Dissertation]. Jilin: Yanbian University. (in Chinese)
- 南桂仙. 2004. 高山红景天组织培养的研究 [硕士论文]. 吉林: 延边大学.
- Paterson K E, Rost T L. 1981. Callus formation and organogenesis from cultured leaf segments of *Crassula argentea*: Cytokinin-induced developmental pattern changes. American Journal of Botany, (7): 965 - 972.
- Paterson K E. 1983. Polarity of regeneration in excised leaves of *Crassula argentea*. I. A role of auxin. Canadian Journal of Botany, 61 (4): 1058 - 1063.
- Peng Cheng-xia. 2008. Studies on rapid propagation and polyploid breeding of *Kalanchoe Blossfeldiana* T. [M. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 彭承霞. 2008. 长寿花 (*Kalanchoe blossfeldiana* T.) 组培快繁及多倍体新类型培育的研究 [硕士论文]. 重庆: 西南大学.
- Qi Ying-chun, Chen Xiang, Zhu Yi, Yuan Ji-hong, Liu Jun. 2012. Study on test-tube flower of *Tagetes patula*. Acta Agriculturae Jiangxi, 24 (1): 21 - 22, 25. (in Chinese)
- 齐迎春, 陈 翔, 朱 意, 袁继红, 柳 俊. 2012. 孔雀草试管花卉研究. 江西农业学报, 24 (1): 21 - 22, 25.
- Qi Ying-chun, Liu Jun, Zheng Xin-hui, Yuan Ji-hong, Duan De-jun. 2011. How to make the test-tube flower of pink *Kalanchoe blossfeldiana* plants. Patent Number of China: CN201110207917.5. 2011.12.28. (in Chinese)
- 齐迎春, 柳 俊, 郑新会, 袁继红, 段德君. 2011. 一种粉花长寿花试管花卉的制作方法. 中国专利: CN201110207917.5. 2011.12.28
- Shen Meng-yuan. 2008. Studies on micropropagation and resource preservation of *Rhodiola Fastigiata* [M. D. Dissertation]. Shihezi: Shihezi University. (in Chinese)
- 沈梦圆. 2008. 红景天的快繁及其资源保存的研究 [硕士论文]. 石河子: 石河子大学.
- Ye Wei, Zhou Hui-ming, Luo Qing-guo, Jiang Jin-lan, Ye Rong-mei. 2007. Preliminary study on the tissue culture technology of test-tube flower "Tian Shi Hua Fang" . Sanming Agricultural Science and Technology, (3): 16 - 17. (in Chinese)
- 叶 炜, 周辉明, 罗庆国, 江金兰, 叶榕妹. 2007. 试管花卉“天使花房”组织培养技术初探. 三明农业科技, (3): 16 - 17.
- Zhao Juan, Wang Yu-guo, Yin Mei-qiang, Wen Yin-yuan, Sun Zhao-xia, Wang Ji-ping. 2009. Effects of hormone on differentiation of leaves of *Kalanchoe tomentosa*. Acta Laser Biology, 8 (2): 200 - 205. (in Chinese)
- 赵 娟, 王玉国, 尹美强, 温银元, 孙朝霞, 王计平. 2009. 植物激素对褐斑伽蓝叶片分化的影响. 激光生物学报, 8 (2): 200 - 205.
- Zhao Li. 2005. Study of different nutrition condition on callus inducing and plant propagation in *Seudm amplibracetatum* [M. D. Dissertation]. Chengdu: Sichuan Agricultural University. (in Chinese)
- 赵 莉. 2005. 不同营养条件对大苞景天愈伤组织诱导及植株再生的影响研究 [硕士论文]. 成都: 四川农业大学.