

林木组织培养中的体细胞无性系变异

李周岐, 寇世强, 徐养福

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要: 从变异类型、变异起源、影响因素、遗传机理及变异检测等方面综述了植物体细胞无性系变异研究的新进展, 对 1977 年以来有关林木体细胞无性系变异的研究资料进行了全面介绍, 并就林木体细胞无性系变异研究中存在的问题进行了讨论, 认为深入系统的开展林木体细胞无性系变异研究, 对于利用组织培养技术进行林木遗传改良和良种快速繁殖具有十分重要的意义。

关键词: 林木; 体细胞无性系变异; 组织培养

中图分类号: S718.46 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-7461(2004)04-0077-05

Somaclonal Variation in Tissue Culture Research of Forest Tree

LI Zhou-qi, KOU Shi-qiang, XU Yang-fu

(College of Forestry, NW Sci-Tech Univ of Agr and For., Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: New progress in such aspects as variation types, origination, influencing factors, genetic mechanism and detecting methods of plant somaclonal variation is summarized. The information on somaclonal variation in forest tree since 1977 is fully introduced. Some problems existed in forest tree somaclonal variation study are discussed. It is thought that doing further research systematically on somaclonal variation is very important for genetic improvement and fast propagation of forest tree by means of tissue culture technique.

Key words: forest tree; somaclonal variation; tissue culture

按照 Haberlandt 的细胞全能性学说, 植物的每一个体细胞具有相同的遗传信息, 因此人们起先认为本质上是无性繁殖的组织培养所得到的再生植株应当与原植株的基因型是完全相同的。在许多情况下的确如此, 因而可以借助组织培养技术进行种苗的快速繁殖。但是, 20 世纪 60 年代以来, 日渐增多的资料表明, 植物离体培养物和再生植株会发生各种各样的变异^[1-3]。Larkin 和 Scowcroft^[4]首次对有关再生植株变异的资料进行了评述, 并把这种现象称为体细胞无性系变异 (somaclonal variation)。近年来, 植物体细胞无性系变异研究进展很快, 但就林木体细胞无性系变异研究还未见专门综述。本文在总结植物体细胞无性系变异研究新成就的基础上, 对有关林木体细胞无性系变异的资料作了全面介绍, 以期发现问题、找出差距, 促进林木体细胞无性

系变异研究的进一步深入。

1 植物体细胞无性系变异研究进展

1.1 体细胞无性系变异的类型

Skirvin^[5] 等将体细胞无性系变异分为可遗传的变异 (heritable variation) 和外遗传变异 (epigenetic variation) 两类。前者指可以在有性世代和无性繁殖世代稳定保持的变异, 后者指不仅在有性世代、有时甚至在无性世代也不能稳定保持的变异。外遗传变异也称发育变异 (developmental variation), 即由于外部影响导致基因表达的改变, 从而引起表型上的变异。

1.2 体细胞无性系变异的起源与影响变异频率的因素

一般认为, 植物体细胞无性系变异的起源有二,

收稿日期: 2004-03-18

基金项目: 西北农林科技大学校长基金项目“杨树体细胞无性系变异影响因素及调控技术研究”

作者简介: 李周岐 (1962-), 男, 陕西凤翔人, 博士, 教授, 主要从事林木遗传育种的教学和科研工作, 研究方向为林木生物技术育种。

一是外植体中业已存在的、于再生植株中表现出来的变异 (pre-existing variation), 另一则主要是组织培养过程本身诱导产生的变异 (induced variation)。大量研究表明, 影响植物体细胞无性系变异频率的因素很多, 包括源植株的基因型、外植体来源、生长调节物质及附加物、离体培养时间及再生方式等^[6,7]。但在不同植物上其研究结果不尽相同, 有时甚至相互矛盾。

1.3 体细胞无性系变异的遗传机理

植物体细胞无性系变异形成的机理, 一直是无性系变异研究所关注的课题。从 1981 年起, 科学家们已利用细胞学和分子生物学方法对植物体细胞无性系变异做了不少研究, 所获得的结果对认识无性系变异的机理奠定了基础^[8,9]。在细胞水平上, 体细胞无性系变异包括染色体数目和染色体结构变异两个方面, 染色体数目变异又包括整倍性变异和非整倍性变异, 染色体结构变异主要是由于染色体断裂后经过修复和重新连结所形成的易位、倒位、缺失和重复。在 DNA 分子水平上, 体细胞无性系变异包括点突变、基因的扩增和丢失、基因重排、DNA 甲基化变化、转座子活化、细胞器 DNA 的变化等。到目前为止, 关于体细胞无性系变异机理虽然提出了不少观点, 但都只能对其中的某些现象进行解释, 同时对不同材料的研究还经常出现对立的结果, 说明体细胞无性系变异是极其复杂的。

1.4 体细胞无性系变异的检测

体细胞无性系变异除可采用形态学观测、染色体观察与核型分析及蛋白质 (包括同工酶) 电泳分析进行检测外, 还可以采用分子标记技术 (如 RFLP、AFLP、RAPD、SSR 等) 进行检测^[10-13]。从目前的研究结果看, 利用分子标记检测体细胞无性系变异还存在许多问题, 如在有些情况下, 表明明显变异的变异体无法用分子标记检测出来, 而在另外一些情况下, 表型正常的再生植株却表现出分子标记多态性。这可能与现行分子标记体系只允许检测植物体基因组的有限部分及高等植物基因组中存在大量非编码序列有关。但无论如何, 分子标记技术仍然是目前多数研究者用于分析体细胞无性系变异的最有效工具。

2 林木体细胞无性系变异研究现状

2.1 杨树

Lester 等^[14]对 5 个推定杂种杨树无性系和 1 个 Lombardy 杨树无性系 (*Populus nigra* cv. *italica*) 通

过组织培养得到再生植株, 并对再生植株进行扦插繁殖, 一个生长季节后发现在苗高、分枝数和叶部性状上存在广泛无性系变异, 根尖染色体数也有较大变异。Son 等^[15]对杂种杨树 (*P. alba* × *P. grandidentata*) 进行组织培养, 以愈伤组织丛生芽再生方式得到不定芽, 600 个芽苗转移到茎伸长和生根培养基上, 其中 400 芽苗在无激素的培养基上培养 6 周后, 8.25% 生长较慢、16.3% 生长较快、7.5% 白化, 200 个芽苗移栽于温室并生长 6 个月后, 4% 生长较慢, 6% 生长较快、10% 叶形异常, 对离体愈伤组织系进行的染色体研究表明存在从单倍体到四倍体的广泛变异, SDS-PAGE 蛋白质研究表明某些谱代的染色强度与愈伤组织系的生长密切相关, 白化表型至少与两种蛋白的缺少有关。Antonetti 等^[16]对代表大叶杨组、黑杨组、青杨组的 13 个杨树无性系的 1 092 个愈伤组织再生植株的研究发现, 至少有 44 株在生长习性及叶形性状上存在无性系变异, 并发现变异频率在杨属组间存在差异, 大叶杨组为 8%, 其它两组为 1%。Jehan 等^[17]以杂种杨树 (*P. trichocarpa* × *P. deltoides* cv. *hunnegem*) 的根、茎和叶为外植体进行组织培养, 对再生植株进行流式细胞仪分析, 发现不定芽直接再生植株为二倍体, 但间接再生的植株中有四倍体存在。Saied 等^[18]对杂种杨树无性系 TT32 (*P. trichocarpa* × *P. balsamifera*) 进行愈伤组织培养, 继代培养 16 个月, 于愈伤组织继代培养的最后 1 个月在培养基中加入 6 种不同浓度的 2,4-D, 并在附加 3 种不同浓度 BA 的培养基中进行植株再生, 对再生植株及其次级无性繁殖植株在一些形态、生理及叶气体交换性状上的变异谱进行了评价, 结果表明无性系变异主要是由于愈伤组织在附加 2,4-D 的培养基上长期培养造成的, 发现一个早期可见的变异是叶形 (叶长 / 叶宽) 变异, 并认为可能与培养最后阶段的 2,4-D/BA 相互作用有关, 2,4-D 或 BA 单因素对高生长及叶气体交换参数的图解分析表明变异频率与 BA 浓度呈负相关, 但与 2,4-D 浓度表现出复杂关系。Ostry 等^[19]研究了外植体来源和再生方式对杂种杨树无性系 NE299 (*P. nigra* var. *betulifolia* × *P. trichocarpa*) 抗病性无性系变异的影响, 由各种组织及腋芽诱导愈伤组织, 除硬枝插穗外植体外, 所有再生植株均表现出抗病性无性系变异, 其中一些再生植株表现出形态变异, 并认为外植体来源和再生方式影响变异频率。Vijay 等^[20]利用 11 个 RAPD 引物对 23 株微繁杨树 (*P. deltoides*) 进行了变异检测, 其中 5 个引

物在6个植株中共扩增到13个多态性谱带,认为RAPD标记可用于快速获得无性系变异信息。Ge-Jiao等^[21]研究发现转基因杨树(*P. nigra*)在叶形等性状上存在无性系变异,并利用分子标记技术(RFLP、RAPD、SSR)进行了分析,认为变异是由于组织培养过程引起的,而与外源基因的插入无关。

2.2 针叶树

Fourre等^[22]根据产生健康成熟体胚能力的大小,从几百个挪威云杉(*Picea abies*)体胚系中选出了4个体胚系进行继代培养,并就产生成熟体胚数量和质量的能力进行了连续几年观察,结果发现存在广泛的无性系内变异。体胚在成熟阶段及成熟以后也出现一些形态异常,如,未成熟体胚组织弥散、成熟体胚部分或完全白化及体胚再生苗的矮化突变等,认为这些形态变异可能是基因自身修饰或基因组表达改变的结果。利用细胞学方法发现存在三体、双三体、四倍体和混倍体体胚,但RAPD分析未检测到无性系变异。Isabel等^[23]在通过体细胞胚胎发生得到的2 270株白云杉(*P. glauca*)中发现4株表现变异体,其缺绿针叶的数量和分布各不相同,光学显微镜发现变异株叶片由绿色和白色两种细胞镶嵌构成,电子显微镜发现,完全白化针叶的细胞核大、常染色质多、缺少大液泡,大量观察表明,杂色表现型反映了叶绿体基因组或核基因组的遗传不稳定性。用RAPD标记对其中3株进行了DNA分子鉴定,在经过筛选的250多个标记中,只有1个标记与变异植株的针叶白化有关,序列分析发现该片段与所有已知基因无同源性,但很可能是核基因。杨金玲等^[24]以白杆(*P. meyeri*)成熟合子胚为外植体诱导体细胞胚胎发生,胚性愈伤组织继代培养3 a后发现,随着继代时间的增长,胚性细胞内有些细胞的染色体数目发生了无规律的变化(7到大于28),而再生植株根尖细胞染色体数目比较稳定($2n = 28$)。Isabel等^[25]用10个RAPD特征标记对黑云杉(*P. mariana*)3个体胚系(各30个体胚)进行了变异检测,未发现无性系内变异。

Roth等^[26]由冷杉(*Abies alba*)成熟合子胚诱导体胚细胞,每隔3周继代1次,3 a后部分细胞系转移到附加CH 500~1 000 mg/L和谷氨酸盐500 mg/L的培养基上,再过3 a后发现胚柄细胞畸形、失去成熟能力等变异,染色体计数发现所有培养在附加有机氮培养基上的细胞为三体,而培养在未附加有机氮培养基上的细胞染色体数稳定,认为这种非整倍体的出现是由于不同培养条件造成的高选择压力

引起的。Gajdosova等^[27]以冷杉杂种(*A. alba* and *A. concolor* × *A. grandis*)的完整胚、胚轴、胚根切段为外植体进行组织培养,细胞学分析发现愈伤组织细胞以二倍体为主,10.8%的细胞在染色体数目及行为上存在变异,单个细胞最高频率的变异是多倍体变异,但未得到多倍体细胞系。Libiakova等^[28]通过有丝分裂染色体计数和流式细胞仪分析,对杂种冷杉(*A. concolor* × *A. grandis*)成熟胚和幼苗子叶起源的再生植株的不定芽和叶芽及长期培养的愈伤组织进行检测,未发现无性系变异。

Richard等^[29]以杂种落叶松成年植株的短枝芽为材料进行组织培养,用8种同工酶系统对离体培养的顶芽、及移栽后的植株进行了分析,研究了生长调节物质、继代间隔期及离体培养时间对离体顶芽变异的影响,结果发现存在无性系变异,但这似乎是对培养条件的反映,因为一旦驯化移栽,多数组织培养植株酶谱与其对照(嫁接株或原株)相同,在驯化移栽株上发现的变异同样也可在其对照株上发现并与个体发育时期无关,从而认为杂种落叶松组培苗与其嫁接苗及原株无明显不同。

Berlyn等^[30]以3个加勒比松品种(*P. caribaea* var. *caribaea*, *P. caribaea* var. *hondurensis*, *P. caribaea* var. *bahamensis*)的休眠胚为外植体进行组织培养并获得再生植株,研究发现再生植株芽中DNA含量保持稳定,而根中DNA含量变化可达到单倍体的9倍,认为根中DNA含量的不稳定性与生根培养基中生长素的含量有关。

Michael等^[31]对火炬松(*P. taeda*)离体培养胚及其再生植株芽细胞中DNA含量进行了测定,胚培养在以细胞分裂素为唯一生长调节物质的培养基上,在近3个月的连续培养中未发现多倍性变异,即是培养基中的BA远远超过适于芽再生的含量,对DNA含量也无影响,再生植株芽中DNA含量同样保持稳定。

2.3 其它树种

Rival等^[32]用RAPD标记对油棕(*Elaeis guineensis*)体胚起源的再生植株进行了分析,73个引物,共扩增出8 900条谱带,虽然再生植株中存在一种“斗蓬”(mantled)型形态变异,但RAPD标记未检测到任何无性系内及其与母株间多态性,从而认为RAPD标记不适合于检测这种变异。用流式细胞仪对叶外植体起源的3种愈伤组织(结节状紧密型,快速生长型,易脆型)进行了测定,未发现倍性变异,虽然已证明斗蓬型形态变异起源于迅速生长

性愈伤组织,这一结果与曾认为这种形态变异是外遗传变异一致^[33]。

Diaz 等^[34]对榛子 (*Corylus avellana*) 成年树叶片起源,并保持长期继代培养的试管苗叶片中的多肽和 DNA 甲基化形式进行了分析,与成年树和幼苗叶相比,在离体培养组织中发现了质和量的变异,通过对不同植株源的比较得出结论,离体培养植株表现出不同的生化 and 分子形式,认为诱导变异的特性与长期继代培养的成年植株的高度形态遗传潜能有关。

Gallego 等^[35]用 40 个 10 碱基 RAPD 引物对 12 个基因型栎 (*Quercus suber*) 的体胚系进行了检测,其中 1 个体胚系以次生胚增殖方式经过了几次体胚再发生,未发现无性系内变异及随培养时间的增加而产生的变异,基于遗传距离的聚类结果与体胚系所属种源一致。

Marcotrigiano 等^[36]用泡桐 (*Paulownia tomentosa*) 萌发种子的胚轴诱导愈伤,经由体细胞变异获得一个新的栽培变种,该变种有不规则的叶部色斑,幼叶有绿色与黄绿色到乳白色的斑点,成熟叶也可包括以上各种色斑。

万方数据
Tibok 等^[37]用 14 日龄的桉树胚轴诱导愈伤组织,经器官或胚胎发生途径获得再生植株,其中 28% 为单倍体、12% 为 3 倍体、其它为 2 倍体。吴敏生等^[38]用赤桉幼苗的子叶和下胚轴诱导愈伤组织并获得再生植株,再生植株继代培养增殖,取根尖切片进行染色体观察,结果表明再生植株经过连续继代培养染色体数目变化较大,非整倍体随继代代增加而增加,染色体数目改变的重要原因之一是有丝分裂不正常。

郭晓红等^[39]以四合木 (*Tetraena mongolica*) 种子萌发幼苗为外植体诱导愈伤组织,对继代培养 1~2 a 的愈伤组织进行染色体制片并计数,结果发现愈伤组织在继代培养过程中染色体数目变异显著,有亚倍体、多倍体和超倍体出现,继代培养 1 a 以上的愈伤组织中多倍体和超倍体占优势,亚倍体较少,而正常的二倍体则少见,同时还出现了异常的有丝分裂现象。

3 林木体细胞无性系变异研究中存在的问题与前景展望

作为植物组织培养中经常发生的事件,体细胞无性系变异对于利用组织培养技术进行优良基因型快速繁殖、种质资源离体保存、体细胞杂交和基因工

程育种带来了不利影响,因为在此过程中都需要保持植物原有遗传基础的相对稳定。而另一方面,体细胞无性系变异又为植物育种工作者提供了一个新的变异来源和有效的育种途径,可以通过突变体筛选进行品种改良^[1,2,40,41]。

从现有资料看,体细胞无性系变异在林木中也相当普遍,但研究工作还不够深入,多数研究只是发现了体细胞无性系变异现象,有关体细胞无性系变异的遗传机理及影响因素虽有一些报道,但研究缺乏系统性,变异原因还没有被完全揭示。

目前,许多林木的组织培养再生系统已经建立并用于良种繁殖和生物技术育种,深入系统的开展林木体细胞无性系变异研究,揭示其遗传机理和产生变异的真正原因,建立控制变异发生的技术方法,对于实现林木体细胞无性系变异发生的人为调控,使组织培养技术更好的为林木定向遗传改良和良种快速繁殖服务具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] 李浚明. 体细胞无性系及其变异[J]. 遗传, 1983, 5(1): 41-44.
- [2] 朱至清. 体细胞无性系变异与植物改良[J]. 植物学通报, 1991, 8(增刊): 1-8.
- [3] 赵成章. 再论植物体细胞无性系变异与植物改良[J]. 生物工程进展, 1993, 13(4): 32-36.
- [4] Larkin P J, Scowcroft W R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement [J]. Theor. Appl. Genet., 1981, 60: 197-214.
- [5] Skirvin R M, McPheeters K D, Norton D. Source and frequency of somaclonal variation [J]. HortScience, 1989, 29: 1232-1237.
- [6] 陈纯贤, 孙敬三. 植物体细胞无性系变异研究进展[J]. 生物学杂志, 1994, (3): 4-6.
- [7] 刘进平, 郑成木, 胡新文. 体细胞无性系变异研究进展[J]. 华南热带农业大学学报, 2001, 7(2): 22-29, 34.
- [8] 刁现民, 孙敬三. 植物体细胞无性系变异的细胞学和分子生物学研究进展[J]. 植物学通报, 1999, 16(4): 372-377.
- [9] 张春义, 杨汉权. 植物体细胞无性系变异的分子基础[J]. 遗传, 1994, 16(2): 44-48.
- [10] Veilleux R E, Johnson A A T. Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization [J]. Plant Breeding Reviews, 1998, 16: 1229-269.
- [11] Al-Zahim M A, Ford-Lloyd B V, Newbury V J. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis [J]. Plant Cell Reports, 1999, 18: 473-477.
- [12] De Verno L L, Park Y S, Bonga J M, et al. Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss.] [J]. Plant Cell Reports, 1999, 18: 948-953.

- [13] 达克东,金德欧,伏建民,等. 苹果体细胞无性系变异的 RAPD 评估[J]. 核农学报,2001,15(2):81-85.
- [14] Lester D T, Berbee J G. Within - clone variation among black poplar trees derived from callus culture [J]. Forest Science, 1977, 23(1):122-131.
- [15] Son S H, Moon H K, Hall R B. Somaclonal variation in plants regenerated from callus culture of hybrid aspen (*Populus alba* L. × *P. grandidentata* Michx.) [J]. Plant Science Limerick, 1993, 90(1):89-94.
- [16] Antonetti P L E, Pinon J. Somaclonal variation within poplar [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 35(1):99-106.
- [17] Jehan H, Brown S, Marie D, et al. Ontogenesis and ploidy level of plantlets regenerated from *Populus trichocarpa* × *deltoides* cv. Hunnegem root, leaf and stem explants [J]. Journal of Plant Physiology, 1994, 144(4-5):576-585.
- [18] Saieed N T, Douglas C C, Fry D J. Induction and stability of somaclonal variation in growth, leaf phenotype and gas exchange characteristics of poplar regenerated from callus culture [J]. Tree Physiology, 1994, 14(1):1-16.
- [19] Ostry M, Hackett W, Michler C, et al. Influence of regeneration method and tissue source on the frequency of somatic variation in *Populus* to infection by *Septoria musiva* [J]. Plant Science Limerick, 1994, 97(2):209-215.
- [20] Vijay R, Ajay P, Raina S N, et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh [J]. Plant Cell Reports, 1995, 14(7):459-462.
- [21] Wang Gejiao, Castiglione S, Chen Ying, et al. Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a bacillus thuringiensis toxin gene: insecticidal activity and genomic analysis [J]. Transgenic Research, 1996, 5(5):289-301.
- [22] Fourre J L, Berger P, Niquet L, et al. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94(2):159-169.
- [23] Isabel N, Boivin R, Levasseur C, et al. Occurrence of somaclonal variation among somatic embryo - derived white spruces (*Picea glauca*, Pinaceae) [J]. Amer J Bot, 1996, 83(9):1121-1130.
- [24] 杨金玲,桂耀林,郭仲琛. 白嵌胚性愈伤组织长期继代培养中的分化能力及染色体稳定性研究[J]. 西北植物学报,2000,20(1):44-47.
- [25] Isabel N, Tremblay L, Michaud M, et al. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis - derived populations of *Picea mariana* (Mill.) [J]. Theor Appl Genet, 1993, 86(1):81-87.
- [26] Roth R, Ebert I, Schmidt J. Trisomy associated with loss of maturation capacity in a long - term embryogenic culture of *Abies alba* [J]. Theor Appl Genet, 1997, 95(3):353-358.
- [27] Gajdosova A, Vookova B. Karyological study of *Abies* sp. callus culture [J]. Biologia Bratislava, 1991, 46(3):211-217.
- [28] Libiakova G, Cajdosova A, Vookova B, et al. Karyological study of *Abies concolor* × *Abies grandis* calli and shoots regenerated in vitro [J]. Biologia Bratislava, 1995, 50(1):61-64.
- [29] Richard S, Gauthier S, Laliberte S. Isozyme assessment of the genetic stability of micropropagated hybrid larch (*Larix* × *eurolepis* Henry) [J]. Can J For Res, 1995, 25(7):1103-1112.
- [30] Berlyn G P, Anoruo A O, Beck R C, et al. DNA content polymorphism and tissue culture regeneration in caribbean pine [J]. Can J Bot, 1986, 65:954-961.
- [31] Michael H R, Graeme P B. Stability of nuclear DNA content during adventitious shoot formation in *Pinus taeda* L. tissue culture [J]. Amer J Bot, 1984, 71(2):268-272.
- [32] Rival A, Bertrand L, Beule T, et al. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) [J]. Plant Breeding, 1998, 117(1):73-76.
- [33] Rival A, Beule T, Barre P, et al. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed - derived plants [J]. Plant Cell Reports, 1997, 16(12):884-887.
- [34] Diaz S C, Rey M, Boronat A, et al. Variations in the DNA methylation and polypeptide patterns of adult hazel (*Corylus avellana* L.) associated with sequential in vitro subcultures [J]. Plant Cell Reports, 1995, 15(3-4):218-221.
- [35] Gallego F J, Martinez I, Celestino C, et al. Testing somaclonal variation using RAPDs in *Quercus suber* L. somatic embryos [J]. International Journal of Plant Sciences, 1997, 158(5):563-567.
- [36] Marcotrigiano M, Jagannathan L. Paulownia tomentosa somaclonal snowstorm [J]. HortScience, 1988, 23(1):226-227.
- [37] Tibok A, Blackhall N W, Power J B, et al. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla* [J]. Plant Science Limerick, 1995, 110(1):139-145.
- [38] 吴敏生,汪杏芬. 赤桉连续继代培养过程中染色体数目的变异[J]. 中国农业大学学报,1998,3(1):16.
- [39] 郭晓红,慈忠玲,孙静,等. 珍稀濒危树种四合木组织培养过程中的染色体变异[J]. 内蒙古农业大学学报,2001,22(1):55-59.
- [40] 李周岐. 高等植物体细胞突变体离体筛选技术及其在林木抗盐育种上的应用[J]. 陕西林业科技,1994,(4):50-55.
- [41] 李金花,苏晓华,张绮纹. 细胞工程育种—林木耐盐体细胞突变体育种研究进展[J]. 世界林业研究,1997,(6):15-20.