

# 双片苣苔的离体培养

罗 洁<sup>1</sup>, 杨 国<sup>2\*</sup>, 陈红锋<sup>3</sup>

(1. 绍兴文理学院 元培学院, 浙江 绍兴 312000; 2. 绍兴文理学院 生命科学院, 浙江 绍兴 312000;  
3. 中国科学院 华南植物园, 广东 广州 510650)

**摘 要:**以珍稀植物双片苣苔(*Didymostigma obtusum*)叶片和叶柄为外植体,以 MS 为基本培养基,研究了外植体的消毒方式,不同生长调节剂及其组合对不定芽诱导及生根的影响,探讨不同光照、pH、叶片放置方式等因素对不定芽诱导的影响。结果表明:适量的链霉素有利于外植体消毒,叶片诱导不定芽发生的适宜培养基为 MS+2.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ+0.2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA,叶柄诱导不定芽发生的适宜培养基为 MS+2.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ+1.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BA,pH 为 5.6~6.0,叶背面朝下接种有利于叶片不定芽的诱导发生,适当增强光照有利于芽苗的生长;适宜生根培养基为 1/2MS+2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA+2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA,生根率达 100%,根系生长较好;试管苗移栽到腐殖质和黄泥(2:1)的混合基质中,置于半荫温室中,成活率达 100%。

**关键词:**双片苣苔;珍稀植物;离体快繁;组织培养

**中图分类号:**S722.89      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2016)03-0165-05

## Rapid Propagation *in vitro* of *Didymostigma obtusum*

LUO Jie<sup>1</sup>, YANG Guo<sup>2\*</sup>, CHEN Hong-feng<sup>3</sup>

(1. Shaoxing University, Academy of Yuanpei, Shaoxing, Zhejiang 312000 China; 2. Shaoxing University, Academy of Life Science, Shaoxing, Zhejiang 312000, China; 3. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650, China)

**Abstract:** Leaves and petioles of *Didymostigma obtusum* were used as explants for rapid propagation. The effects of different cultural conditions on the formation of adventitious buds were examined, such as illumination, pH, disinfection method, plant growth regulators and their combinations, explant orientation for induction. The results showed that streptomycin was beneficial to sterilization, the MS medium combined with 2.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ and 0.2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA was most suitable for shoot organogenesis from leaf explants, and the MS medium combined with 2.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ and 1.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BA was the best for shoot organogenesis from petiole explants, leaf explants placed with adaxial side in contact induced more adventitious shoots. MS medium contained 2.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ and 0.2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA was the best for multiplication and growth of adventitious buds, the optimal pH was 5.6—6.0, growth of adventitious buds was improved by increasing light intensity. Rooting of shoots was achieved on medium on half-strength MS salts and supplemented with 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA and 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA. Plantlets were transplanted to potting mixture (1:2, yellow soil: humus) in half-shadow greenhouse with about 100% survival percentage.

**Key words:** *Didymostigma obtusum*; rare plant; *in vitro* culture; rapid propagation

苦苣苔科(Gesneriaceae)植物大多株型秀美、花色艳丽,有较高观赏价值,国外已选育出大量优秀观赏花卉,如大岩桐属、非洲堇属、芒毛苣苔属等,在世界各地得到广泛的应用<sup>[1]</sup>,中国野生的苦苣苔科资

收稿日期:2015-12-02 修回日期:2016-01-16

基金项目:广东省林业科技创新项目(2015KJCX037);绍兴文理学院校级项目(2014LG1018);绍兴文理学院元培学院院级项目(Z20150014)。

作者简介:罗 洁,女,硕士,研究方向:植物应用和植物造景。E-mail:lj26wlxy@163.com

\* 通信作者:杨 国,男,硕士,研究方向:植物资源开发。E-mail:ygelite@163.com

源极为丰富,但开发利用较少。双片苣苔(*Didymostigma obtusum*)是双片苣苔属多年生草本,叶片正面深绿,叶背紫红色,花冠蓝紫色略带些黄白色,开花时异常美丽,有极高的观赏价值,在广东、福建等地有少量分布,生境受人为干扰比较严重,为我国易危种植物<sup>[2]</sup>。双片苣苔属为中国特有属,对研究苦苣苔科系统演化与亲缘关系有较大的科学价值<sup>[3]</sup>。双片苣苔野外种群数量少,种子较小,而且分布在贫瘠山地中,自然条件下自我更新能力较差。本研究以双片苣苔叶片为材料,研究该植物的组织培养和植株再生体系,旨在为该物种的大规模繁殖、保护和利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及培养条件

供试材料双片苣苔小苗采集于广东省南昆山(113°91'E、23°64'N)。以 MS<sup>[4]</sup>为基本培养基,附加蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>,琼脂 5.5 g·L<sup>-1</sup>,pH 5.8,附加多种植物生长调节剂,所有培养基均在 121℃ 条件下高压灭菌 15 min,培养室温度(25±1)℃,光照 40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光周期 12 h·d<sup>-1</sup>。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 取带叶柄的叶片为外植体,用软毛刷轻刷叶面,自来水洗净后,在超净工作台上用 75%乙醇擦拭 30 s,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液分别消毒 5、6 min 与 7 min,2% NaClO 溶液消毒 15 min,外植体用 2% NaClO 溶液消毒 15 min,无菌水清洗干净,再用 1%链霉素(重庆永川农药有限公司)溶液消毒 20 min(表 1),无菌水冲洗 5 次,无菌纸将水吸干,将叶片接种至不含植物生长调节剂的 MS 培养基上。

1.2.2 不定芽的诱导和生长 以无污染的双片苣苔叶片和叶柄为外植体,将叶片剪成 0.7 cm×0.7 cm 的小块,叶柄长 1 cm,依次接入 9 种诱导培养基(表 1):MS 为对照,2.0 μmol·L<sup>-1</sup> BA (6-Benzyladenine),2.0 μmol·L<sup>-1</sup> TDZ (Thidiazuron),2.0 μmol·L<sup>-1</sup> KT (Kinetin),2.0 μmol·L<sup>-1</sup> TDZ + 0.2 μmol·L<sup>-1</sup> NAA,2.0 μmol·L<sup>-1</sup> BA + 0.2 μmol·L<sup>-1</sup> NAA,2.0 μmol·L<sup>-1</sup> KT + 0.2 μmol·L<sup>-1</sup> NAA,2.0 μmol·L<sup>-1</sup> TDZ + 1.0 μmol·L<sup>-1</sup> BA,2.0 μmol·L<sup>-1</sup> BA + 1.0 μmol·L<sup>-1</sup> TDZ(表 2)。培养 30 d 后,观察外植体生长状况,统计不定芽诱导情况及每个外植体诱导的芽数量。

芽诱导率=分化出芽的外植体数/未污染的外植体总数×100% (1)

每处理统计 20 个外植体,重复 3 次。将较大的

丛芽切割成小丛芽(4~6 芽·丛<sup>-1</sup>),接入含 0.5 μmol·L<sup>-1</sup> BA 的 MS 培养基中继代培养和生长。

1.2.3 生根和移栽 选取高 3 cm 左右的芽苗,将基部清洗干净,接入不同的生根培养基,1/2MS(对照),1/2MS+2.0 μmol·L<sup>-1</sup> IBA (Indole-3-butyric acid),1/2MS+2.0 μmol·L<sup>-1</sup> NAA (α-Naphthaleneacetic acid),1/2MS+2.0 μmol·L<sup>-1</sup> IBA + 2.0 μmol·L<sup>-1</sup> NAA。20 d 后观察结果,记录植株生长状况并计算生根率。将生根的小苗移栽至遮阴温室的混合基质(腐殖质:黄泥=2:1)中,每 4 d 浇 1 次水,30 d 后观察幼苗生长状况,并计算成活率。

### 1.2.4 不同光照强度对不定芽诱导和生长的影响

以 MS+2.0 μmol·L<sup>-1</sup> TDZ+0.2 μmol·L<sup>-1</sup> NAA 为基本培养基,叶片外植体培养瓶分别放入光照为 0、40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>、70 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>、130 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 的培养室,培养 30 d 后,观察不定芽的生长状况,统计不定芽的诱导率和个数。

1.2.5 不同 pH 对双片苣苔不定芽诱导和生长的影响 以 MS+2.0 μmol·L<sup>-1</sup> TDZ+0.2 μmol·L<sup>-1</sup> NAA 为基本培养基,叶片外植体分别接种在 pH5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4 与 6.6 的诱导培养基,培养 30 d 后,观察不定芽的生长状况,统计不定芽的诱导率和个数。

1.2.6 叶片不同放置方式对不定芽诱导的影响 以 MS+2.0 μmol·L<sup>-1</sup> TDZ+0.2 μmol·L<sup>-1</sup> NAA 为培养基,叶片背面贴向培养基和叶正面贴向培养基 2 种方式进行培养,培养 20 d 与 40 d 后,统计不定芽的诱导率和数量(表 5)。

### 1.3 数据分析

每处理 20 个外植体,重复 3 次。数据分析和数据处理采用 Excel 2007 和 SPSS16.0 软件,同列数据后不同小写英文字母表示经 LSD 法检验差异显著( $p < 0.05$ ),百分数的差异显著性分析经过反正弦转换。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒处理对外植体的影响

0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液消毒的外植体污染率随消毒时间的增加而降低,但成活率均较低,最高仅为 2.5%,可见双片苣苔叶片和叶柄对 HgCl<sub>2</sub> 溶液较敏感,容易致死。当单独使用 2% NaClO 溶液消毒 15 min 时,成活率显著提高,成活率达 54.8%,但污染率为 51.2%,2% NaClO 溶液和 1%链霉素溶液结合使用时能减低外植体的污染率,保证较高成活率,成活率约为 63.5%(表 1)。

表 1 不同消毒处理对外植体消毒效果的影响

Table 1 Effect of disinfection on shoot organogenesis from leaf and petiole explants

消毒处理	污染率/%	成活率/%
0.1% HgCl <sub>2</sub> 溶液 5 min	88.9	1.1 b
0.1% HgCl <sub>2</sub> 溶液 6 min	65.5	2.5 b
0.1% HgCl <sub>2</sub> 溶液 7 min	20.0	1.7 b
2% NaClO 溶液 15 min	51.2	54.8 a
2% NaClO 溶液 15 min+1%链霉素溶液 20 min	24.6	63.5 a

2.2 不定芽的诱导和生长

叶片和叶柄外植体在不含激素的 MS 对照培养基上培养 30 d 后,不定芽的诱导率为 46.3%,平均每个外植体产生不定芽 12.6 个;单独使用 TDZ 培

表 2 不同生长调节剂对双片苣苔不定芽诱导的影响

Table 2 Effect of growth regulators on shoot organogenesis from leaf and petiole explants of *D. obtusum*

植物生长调节剂 /( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	叶片外植体		叶柄外植体	
	诱导率/%	平均芽数/外植体	诱导率/%	平均芽数/外植体
0	46.3 b	12.6 d	19.4 c	4.4 d
KT2.0	84.8 a	23.7 c	64.7 b	8.3 c
BA2.0	92.7 a	27.3 c	79.8 a	15.4 b
TDZ2.0	92.9 a	28.6 c	82.6 a	16.8 b
BA2.0+NAA0.2	93.4 a	36.3 b	80.9 a	15.7 b
KT2.0+NAA0.2	94.0 a	28.1 c	78.1 a	15.0 b
TDZ2.0+NAA0.2	98.4 a	44.6 a	84.7 a	17.4 b
BA2.0+TDZ1.0	98.2 a	35.6 b	79.2 a	16.8 b
TDZ2.0+BA1.0	98.9 a	36.9 b	85.9 a	23.0 a

2.3 不同生长调节剂对生根与移栽的影响

对照生根率为 71.6%,生根系数仅 4.9;添加适量的生长素的生根培养基能提高双片苣苔的生根率和生根系数,2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA 和 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 结合使用,生根效果最好,生根 11.9 条,根系较健壮(表 3、图 2D)。将苗高 3 cm 以上的生根幼苗移栽到腐殖质和黄泥(2:1)的混合基质中,置于半荫温室里面,60 d 后,成活率达 100%(图 2E)。

表 3 双片苣苔生根培养

Table 3 Root formation of *D. obtusum* after 20-day culture

生长素 /( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	生根 /%	生根数/外植体
0	71.6 b	4.9 c
IBA2.0	100.0 a	8.2 b
NAA2.0	100.0 a	7.6 b
IBA2.0+NAA2.0	100.0 a	11.9 a

2.4 不同光照、pH、放置方式对双片苣苔叶片不定芽诱导和生长的影响

在黑暗环境中,不定芽的诱导数量较少,仅为 20.8,且不定芽发育不良,多为黄化苗;当光照强度

养 20 d 后,叶柄愈伤化,有少许不定芽在绿色的愈伤组织表面形成(图 2A),当 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ 和 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BA 结合使用时,叶柄不定芽诱导效果最明显,诱导率达 85.9,每个外植体产生不定芽 23.0 个(表 2);当 MS 培养基中添加一些植物生长激素时,叶片不定芽的诱导率都得到大幅提高,细胞分裂素(TDZ、BA、KT)和生长素 NAA 结合使用比其单独使用效果更佳,2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ 和 0.2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 结合利于不定芽的诱导,平均每个外植体产生不定芽达 44.6 个(图 2B);将大的丛芽切割成小丛芽(4~5 芽·丛<sup>-1</sup>),接入含 0.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BA 的 MS 培养基继代,20 d 后,芽苗长大(图 2C),可用于生根培养。

增加时,不定芽诱导率和平均不定芽数量也随之增加,但并无显著性差异,但当光照为 130  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  时,芽苗生长状况最佳(表 4)。但光照的强弱对不定芽诱导率和数量影响不大,适当增强光照,具有壮苗的效果。

表 4 不同光照对双片苣苔叶片不定芽发生的影响

Table 4 Effect of light on shoot organogenesis from leaf explants of *D. obtusum*

光量子数 /( $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	诱导率 /%	平均芽数 /外植体	生长状况
0.0	87.7 a	20.8 b	芽苗发育不良,黄化
40.0	94.0 a	43.2 a	芽苗较细,叶片较小,黄绿色
70.0	96.5 a	45.9 a	芽苗中等,叶片中等,黄绿色
130.0	94.5 a	47.5 a	芽苗粗壮,叶片较大,青绿色

随着诱导培养基的 pH 升高,不定芽的诱导率和不定芽数量总体呈先上升后下降的趋势,当 pH 为 5.6 时,不定芽的诱导率和数量达到最大值,偏酸性的培养基更利于双片苣苔不定芽的诱导。所以,当培养基 pH 为 5.6—6.0 时,有利于不定芽的发生(图 1)。

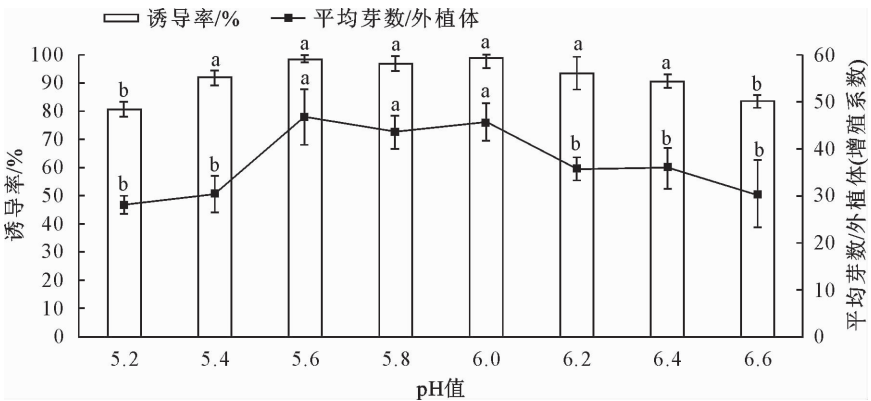
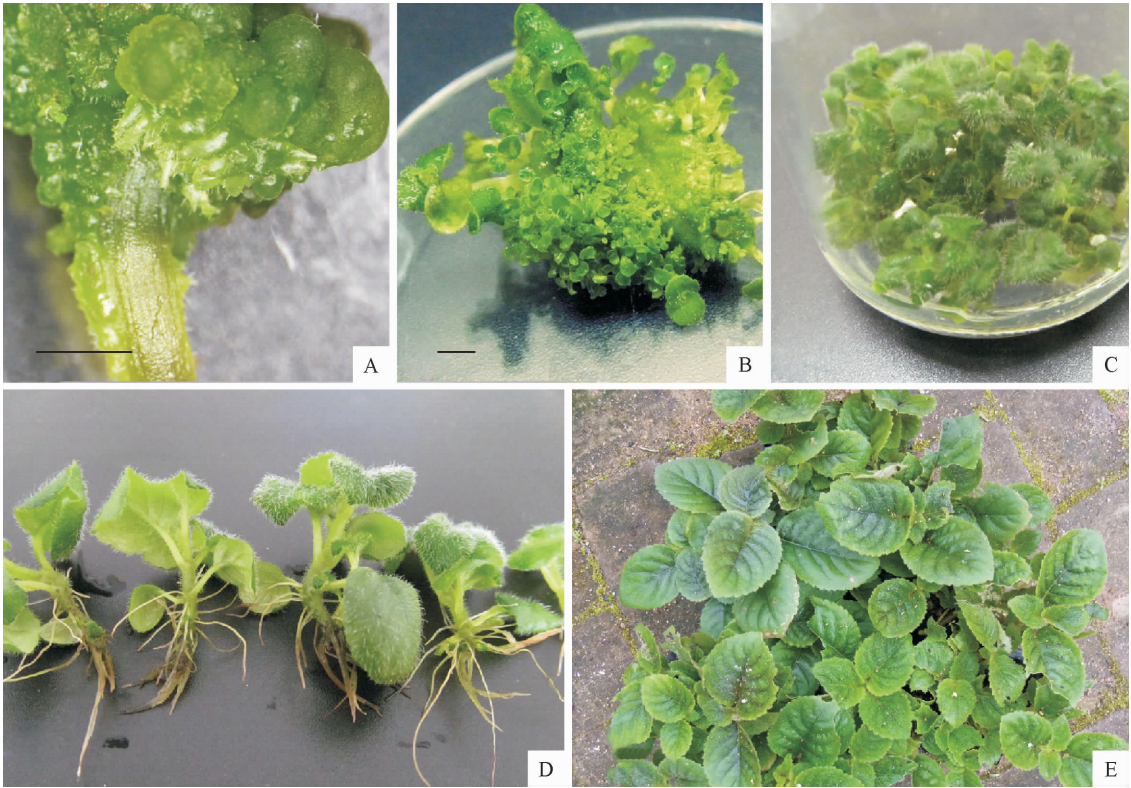


图 1 不同 pH 对双片苣苔叶片不定芽诱导的影响

Fig. 1 Effect of pH on shoot organogenesis from leaf explants of *D. obtusum*



注：A：叶柄在  $MS+2.0\ \mu mol\cdot L^{-1}$  TDZ+ $1.0\ \mu mol\cdot L^{-1}$  BA 培养基上培养 30 d 后，愈伤组织形成的不定芽；B：叶片在  $MS+2.0\ \mu mol\cdot L^{-1}$  TDZ+ $0.2\ \mu mol\cdot L^{-1}$  NAA 培养基上培养 30 d 后，叶表面形成的叶状不定芽；C：不定芽在  $MS+0.5\ \mu mol\cdot L^{-1}$  BA 培养基上增殖和生长；D：在  $1/2MS+2.0\ \mu mol\cdot L^{-1}$  IBA+ $2.0\ \mu mol\cdot L^{-1}$  NAA 培养基上培养 20 d 生根；E：移栽到混合基质(腐殖质：黄泥土=2：1)中，2 个月后长大的植株，标尺 3 mm。

图 2 双片苣苔(*D. obtusum*)叶片和叶柄组织离体快繁

Fig. 2 Micropropagation via leaf and petiole explants of *D. obtusum*

双片苣苔叶片不同的放置方式对不定芽诱导具有一定影响，叶背面向下接种培养时，平均每个外植体不定芽的数量为 35.8，而叶正面向下接种培养时，平均每个外植体不定芽的数量仅为 23.2，差异较显著(表 5)。

3 结论与讨论

苦苣苔科植物离体培养时可以使用多种不同外植体，大岩桐<sup>[5]</sup>和非洲紫罗兰<sup>[6]</sup>以叶片和叶柄外植

表 5 不同叶片放置方式对不定芽诱导的影响

Table 5 Effect of leaf orientation on shoot organogenesis of *D. obtusum*

外植体 放置方式	培养 20 d		培养 40 d	
	诱导率/%	平均芽数 /外植体	诱导率/%	平均芽数 /外植体
叶正面向下	85.7 a	35.8 a	98.7 a	55.8 a
叶背面向下	84.0 a	23.2 b	95.5 a	36.2 b

体、海角樱草<sup>[7]</sup>以叶片和花瓣为外植体，通过不定芽

或体细胞胚诱导都建立了离体快繁体系。本研究发现双片苣苔叶片外植体的诱导系数较叶柄的高,叶片是较适宜的外植体。

双片苣苔叶片和叶柄有较多柔毛,不易消毒,如何建立无菌体系成为了本试验的关键。使用适量的抗菌素溶液辅助消毒,效果较好。在芍药<sup>[8]</sup>和红掌<sup>[9]</sup>的外植体消毒中也有类似的发现。

外植体的不同放置方式对不定芽或体细胞胚的诱导有较大的影响,T. Orlikowska<sup>[10]</sup>等研究发现变叶木茎段腋芽茎尖朝下贴着培养基培养时能有效地提高不定芽的增殖系数,特洛亚枳橙和越桔的茎段平放在培养基上培养时,不定芽的增殖系数更高<sup>[11-12]</sup>,西红柿<sup>[13]</sup>、大豆<sup>[14]</sup>和向日葵<sup>[15]</sup>子叶外植体的放置方式不同,其不定芽和体细胞胚的诱导率也不一样。本研究发现双片苣苔叶正面向下接种培养时能增加不定芽的增殖系数。报春苣苔的叶片离体快繁中也有相同的发现<sup>[16]</sup>。

黑暗条件下双片苣苔的不定芽诱导率低,生长状况差,适当增强光照,有壮苗的效果。可见,光照的强弱在试管苗诱导和生长过程中起着重要的作用,W. P. Gow<sup>[17]</sup>发现光照对蝴蝶兰体细胞胚发生和生长至关重要,蝴蝶兰叶片外植在黑暗条件下培养 60 d,有利于体细胞胚的诱导和生长,但在一直有光的条件下,体细胞胚诱导难度大,而且诱导出的体细胞胚最终褐化死亡;尤海波<sup>[18]</sup>发现低光照增加蝴蝶兰试管苗对蔗糖的吸收量;王华<sup>[19]</sup>的研究表明,弱光条件有利于葡萄试管苗根系和地上部分生长,可增强试管苗光合自养能力,移栽后更易成活。

双片苣苔幼苗生长速度较快,对土壤的要求不高,耐阴性好,是理想的园林地被植物,本研究为双片苣苔在园林中的应用奠定了一定的基础。

参考文献:

[1] 韦毅刚. 华南苦苣苔科植物[M]. 南宁:广西科学技术出版社, 2010:1-20.

[2] 邢福武. 中国的珍稀植物[M]. 长沙:湖南教育出版社, 2005: 92-221.

[3] 李振宇,王印政. 中国苦苣苔科植物 [M]. 郑州:河南科学技术出版社, 2004:13-677.

[4] MURASHIGE T,SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue [J]. *Physiol. Plant.*, 1962, 15 (3):473-497.

[5] XU Q L,HU Z,LI C Y,*et al.* Tissue culture of *Sinningia speciosa* and analysis of the *in vitro*-generated tricussate whorled phyllotaxis (twp) variant [J]. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.*, 2009,45(5):583-590.

[6] MITHILA J,HALL J C,VICTOR J M R,*et al.* Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic

embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) [J]. *Plant Cell Reports*,2003,21(5):408-414.

[7] CHAUDHURY A,POWER J B,DAVEY M R. High frequency direct plant regeneration from leaf and petals of *Cape primrose* (*Streptocarpus*) [J]. *J. Crop Sci. Biotech.*, 2010,13 (2): 107-112.

[8] 王吉凤,李青,包欣. 芍药组织培养中污染现象的克服[J]. *植物研究*,2012,32(1):84-90.

[9] 简兴,王米力,石大兴. 红掌组培苗继代过程中细菌污染的防治试验[J]. *亚热带植物科学*,2003,32(2):52-54.

[10] ORLIKOWSKA T,SABALA I,KUCHARSKA D. The effect of leaf and shoot tip removal and explant orientation on axillary shoot proliferation of *Codiaeum variegatum* Blume var. *pictum* Muell. Arg. cv. excellent [J]. *Scientia Horticulturae*,2000,85(1/2):103-111.

[11] GARCÍA-LUIS A,MOLINA R V,VARONA V,*et al.* The influence of explant orientation and contact with the medium on the pathway of shoot regeneration in vitro in epicotyl cuttings of *Troyer citrange* [J]. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2006,85(2):137-144.

[12] DEBNATH S C,DEBNATH S C. Micropropagation of lingonberry;influence of genotype, explant orientation, and overcoming TDZ-induced inhibition of shoot elongation using zeatin[J]. *Hortscience*,2005,40(1):185-188.

[13] BHATIA P,ASHWATH N,MIDMORE D J. Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato [J]. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*,2005,41(4):457-464.

[14] KO T S,LEE S,KRASNYANSKI S. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium strain* and orientation of immature cotyledonary explant [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2003,107(3):439-447.

[15] VEGA T A,NESTARES G M. Biochemical and histological changes associated with in vitro responses in sunflower cotyledonary explants [J]. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*,2007,43 (5):415-422.

[16] MA G H,HE C X,REN H,*et al.* Direct somatic embryogenesis and shoot organogenesis from leaf explants of *Primulina tabacum* Hance [J]. *Biologia Plantarum*,2010,54(2):361-365.

[17] GOW W P,CHEN J T,CHANG W C. Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis orchids* [J]. *Acta physiologiae plantarum*,2009,31(2):363-369.

[18] 尤海波,毕洪文,谭巍. 光、CO<sub>2</sub> 和蔗糖对蝴蝶兰组培苗生长及光合的影响[J]. *西北林学院学报*,2007,22(5):75-77.

YOU H B,BI H W,TAN W. Influences of illumination,CO<sub>2</sub> and cane sugar intensive on the growth and photosynthesis of tissue culture seedlings of *Moth orchid* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*,2007,22(5):75-77. (in Chinese)

[19] 王华,王艳妮,苏娟. 组培微环境对瑞引葡萄 Granior 试管苗生长及生理特性的影响[J]. *西北林学院学报*,2011,26(1):72-76.

WANG H,WANG Y N,SU J. Effects of *in vitro* microenvironment on the growth and physiological characteristics of wine grape cultivar “Granior” from Switzerland [J]. *Journal of Northwest Forestry University*,2011,26(1):72-76. (in Chinese)