

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2017.10099

周思宇, 王永清. 枇杷叶片胚性愈伤组织诱导与内源激素含量的关系[J]. 植物科学学报, 2017, 35(1): 99-106

Zhou SY, Wang YQ. Relationship between embryonic callus induction from leaves and endogenous hormone content in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) [J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(1): 99-106

# 枇杷叶片胚性愈伤组织诱导与内源激素含量的关系

周思宇, 王永清\*

(四川农业大学园艺学院, 成都 611130)

**摘要:** 为揭示胚性愈伤组织发生过程中内源激素的变化规律, 本研究以枇杷叶片为实验材料, 通过诱导胚性愈伤组织获得体细胞胚, 采用高效液相色谱法测定枇杷叶片及愈伤组织的赤霉素( $GA_3$ )、生长素(IAA)、脱落酸(ABA)和玉米素(ZT)4种内源激素的含量, 探讨胚性愈伤组织发育过程中4种内源激素的动态变化。结果显示, 不同成熟度叶片内 IAA/ZT 比值对胚性愈伤组织的发生有正效应, 而  $GA_3$ /IAA 的比值具有负效应。胚性愈伤组织的发生需要较低含量的  $GA_3$  及高含量的 IAA 和 ABA, IAA/ZT 比值高有利于胚性愈伤组织形成, 培养后期及时添加一定量的外源激素有利于胚性保持。本研究可为离体培养时选择外植体、添加外源激素及控制继代时间提供理论指导, 并为快速获得枇杷胚性材料、开展基因转化研究奠定基础。

**关键词:** 枇杷; 叶片; 胚性愈伤组织; 内源激素; 体细胞胚

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2017)01-0099-08

## Relationship between embryonic callus induction from leaves and endogenous hormone content in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.)

Zhou Si-Yu, Wang Yong-Qing\*

(College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** To understand the relationship between endogenous hormone content during embryonic callus induction, somatic embryos were obtained by embryonic callus induction from loquat leaves. The content of four endogenous hormones, gibberellic acid ( $GA_3$ ), auxin (IAA), abscisic acid (ABA) and zeatin (ZT), were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The dynamic changes of these endogenous hormones in embryonic calli were then explored. Results suggested that the ratio of IAA/ZT in leaves had a positive effect on embryonic callus induction, whereas  $GA_3$ /IAA had a negative effect. Low content of  $GA_3$  and high content of IAA and ABA were required for embryonic calli induction, and a high ratio of IAA/ZT was advantageous to their formation. The timely addition of exogenous hormones in the late period of subculture was helpful for maintaining the embryo. This research provides a theoretical direction for explant selection, extraneous hormone addition to calli subculture, and successive transfer time selection, as well as a foundation for efficiently obtaining embryonic materials and developing the study of gene transformation.

**Key words:** Loquat; Leaf; Embryonic callus; Endogenous hormone; Somatic embryo

收稿日期: 2016-07-13, 退修日期: 2016-09-01。

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2016NYZ0034)。

This work was supported by a grant from the Sichuan Provincial Science and Technology Support Project(2016NYZ0034)。

作者简介: 周思宇(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为枇杷生物技术及遗传育种(E-mail: 1241688390@qq.com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: yqw14@sicau.edu.cn)。

枇杷 (*Eriobotrya japonica* Lindl.) 是原产中国的特色树种, 具有重要的经济与药用价值, 在我国南方地区及日本、西班牙、美国等地均有大面积种植, 其应用价值受到广泛关注<sup>[1]</sup>。然而枇杷在生产及育种中仍存在许多问题, 如核大、耐寒性差、常规育种困难等, 因此利用遗传转化手段进行物种改良是较为可行的方法。植物叶片被普遍认为是离体再生及遗传转化最好的外植体来源, 且其遗传背景相对明确, 取材方便。利用叶片诱导胚性愈伤组织, 不仅可作为种质资源离体保存、外源基因转化及体细胞融合的理想材料<sup>[2]</sup>, 还可为枇杷体细胞胚再生成高稳定性的植株奠定基础。近年来, 许多学者对枇杷叶片离体培养开展了研究, 如吴延军等<sup>[3]</sup>通过种苗叶片诱导愈伤组织实现不定芽再生; 王芳等<sup>[4]</sup>通过幼叶诱导胚性愈伤组织实现植株再生。但实验过程中仍存在进展缓慢、培养难度大、诱导率低、可重复性差等问题。

植物离体培养的形态建成受多种因素影响, 不仅包括培养基和培养环境等外部因素, 还包括培养材料中内源激素含量等内部因素。在前期的枇杷离体培养研究中, 多注重对外部条件的筛选, 而对内部因素探讨较少。内源激素可调控植物生长发育, 其含量对培养过程中脱分化和再分化起重要作用。目前, 已在玉米 (*Zea mays* Linn.)<sup>[5]</sup>、水稻 (*Oryza. sativa* Linn.)<sup>[6]</sup>、苹果 (*Malus domestica* Mill.)<sup>[7]</sup> 等物种中报道了内源激素变化影响植物的离体培养, 而枇杷的相关研究尚未见报道。

高效液相色谱法 (HPLC) 具有准确、灵敏、专一的特点, 广泛应用于植物内源激素测定<sup>[8]</sup>。因此, 本研究以枇杷叶片为实验材料, 采用 HPLC 方法测定叶片外植体及愈伤组织发育过程中内源激素的含量, 分析内源激素与胚性愈伤发生之间的关系, 以期对枇杷种质资源保存及基因转化研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

于 2015 年 3 - 4 月, 从四川农业大学农场枇杷品种‘大五星’实生树体上选取生长状况良好的叶片作为实验材料。

### 1.2 实验试剂

赤霉素 (GA<sub>3</sub>)、玉米素 (ZT)、生长素 (IAA)、

脱落酸 (ABA) 为 Sigma 公司产品; 甲醇、冰乙酸为色谱纯; 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 (BHT)、交联聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP)、石油醚 (30 ~ 60℃)、乙酸乙酯、柠檬酸、正丁醇、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D)、6-苄氨基腺嘌呤 (6-BA)、萘乙酸 (NAA) 均为分析纯。

### 1.3 愈伤组织诱导与继代培养

选摘 3 种不同成熟度的枇杷叶片, 经过表面消毒后截取基部约 1 cm<sup>2</sup> 的叶片, 远轴面接触培养基, 接种于 1/8MS 培养基中 (含 1.0 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L 6-BA, 0.2 mg/L NAA), 暗培养 2 周后置于白光下培养。将初代培养形成的愈伤组织转接至 1/4MS 增殖培养基中 (含 0.5 mg/L 6-BA, 0.2 mg/L 2,4-D)。定时观察愈伤组织生长状态, 统计胚性愈伤组织诱导率 (胚性愈伤组织诱导率 = 胚性愈伤组织发生数/接种数 × 100%)。

### 1.4 内源激素的测定

#### 1.4.1 标准溶液的配制

标样储备液分别含有: 2 g/L GA<sub>3</sub>、1 g/L IAA、1 g/L ABA 和 0.1 g/L ZT, 以色谱甲醇溶解并定容, 置于 -20℃ 冰箱中避光保存。取各组分适量的储备液混合, 用流动相稀释成系列浓度梯度溶液。其中 GA<sub>3</sub> 和 ABA 浓度梯度分别为 0.1、0.05、0.01、0.005、0.001 mg/mL; IAA 浓度梯度分别为 0.1、0.05、0.02、0.01、0.005 mg/mL; ZT 浓度梯度分别为 0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001 mg/mL, 保存备用。

#### 1.4.2 内源激素的提取与纯化

枇杷叶片中内源激素的提取及纯化参照胡晓辉等<sup>[9]</sup>和未晓巍等<sup>[10]</sup>的方法并加以改进。准确称取枇杷叶片 2.0 g, 液氮研磨成粉末, 加入预冷的 80% 甲醇 16 mL (含 30 mg/L BHT) 在弱光冰浴下研磨成浆, 置于 -20℃ 下避光浸提。24 h 后样品以 4℃, 5500 r/min 离心 20 min, 保留上清液; 沉淀加入 7 mL 甲醇浸提 2 次, 以 4℃, 6500 r/min 离心 20 min 后合并上清液。上清液在 35℃ 下减压浓缩至 20 mL, 加入等体积石油醚萃取脱色, 合并 3 次水相。旋转蒸发去除石油醚后, 加入 0.3 g PVPP 于低温弱光下振荡 30 min, 过滤。滤液过 C18 柱洗脱, 调节 pH 值至 2.8, 再加入等体积的乙酸乙酯萃取 3 次。保留有机相, 氮气吹干后加入 2 mL 流动相溶解, 过 0.45 μm 有机滤膜后用于

HPLC 分析(含 GA<sub>3</sub>、IAA、ABA)。无机相经 45℃ 旋转蒸发后,调 pH 值至 8.0,加入等体积的水饱和正丁醇萃取 3 次,其有机相经氮气吹干后加入 2 mL 流动相溶解,过 0.45 μm 有机滤膜后用于 HPLC 分析(含 ZT)。

1. 4. 3 色谱条件

色谱柱为 Agilent 公司 ZORBAX Eclipse Plus C18(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),柱温 30℃,流动相为甲醇:乙酸:水(45:0.8:54.2),流速 0.8 mL/min,进样量 10 μL,检测波长 254 nm。以标样出峰时间定性,外标峰面积定量。实验重复 3 次,采用 DPS 7.05 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2. 1 流动相的确定及定性分析

流动相组成直接影响激素的分离效果,不同种类色谱柱流动相具有不同的效果。本研究选择 3 种常用的流动相:甲醇-乙腈-0.6%乙酸(50:5:45)<sup>[11]</sup>、甲醇-水-乙酸(45:54.2:0.8)<sup>[12]</sup>和甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液(15:15:70, pH 3.5)<sup>[13,14]</sup>,比较其分离效果。结果发现,在第一种流动相中,4 种激素出峰时间均在 8 min 内,且 GA<sub>3</sub>和其他 3 种激素 ZT、IAA、ABA 均不能完全分离,灵敏度较低。第三种流动相中,4 种激素分离效果得到明显改善,但无机盐的存在易造成色谱柱堵塞,使用后要严格冲柱,操作相对复杂。在第二种流动相中,4 种激素能够完全分离(图 1),其中 ZT 保留时间为 2.34 min,GA<sub>3</sub>为 3.35 min,IAA 为 6.18 min,ABA 为 10.32 min。4 种激素可在 14 min 内分离完全,且重复性较好。经过综合比较,确定甲醇-水-乙酸(45:54.2:0.8)为最佳流动相。

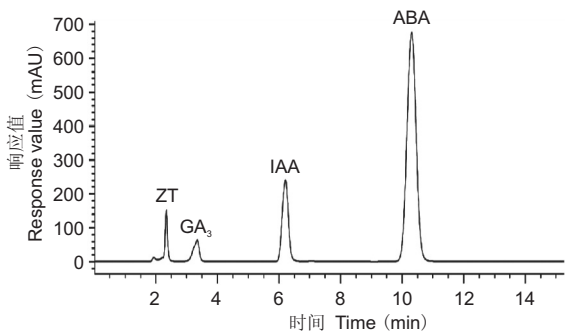


图 1 标准品色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of hormone standards

2. 2 定量分析

将配制好的系列浓度梯度混合标准溶液,按上述色谱条件依次进样,得到 4 种激素在不同浓度上的峰面积。以峰面积为纵坐标,标准品浓度为横坐标绘制标准曲线,计算各组分的回归方程及相关系数(表 1)。

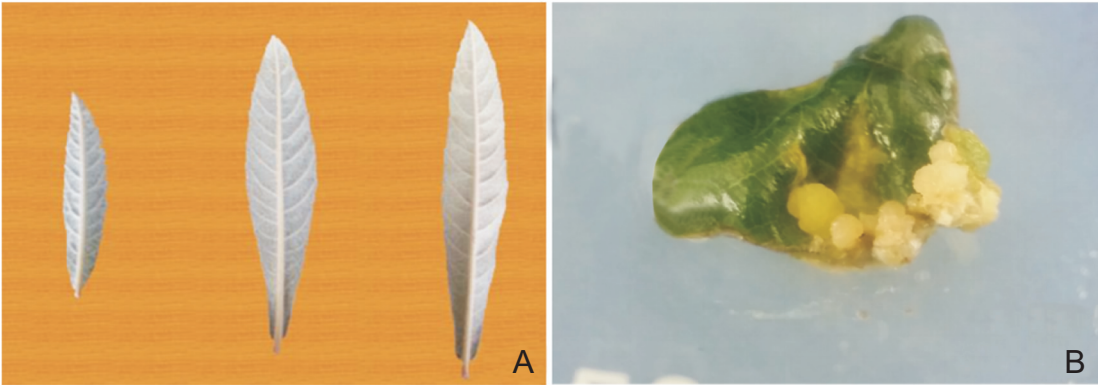
表 1 4 种激素的回归方程及相关系数  
Table 1 Regression equations and correlation coefficients of the standards of endogenous hormones

内源激素 Endogenous hormones	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient
ZT	$y = 38082x + 16.74$	$R^2 = 0.9978$
GA <sub>3</sub>	$y = 7823.89x + 54.33$	$R^2 = 0.9991$
IAA	$y = 12027x + 88.94$	$R^2 = 0.9996$
ABA	$y = 61695x + 83.90$	$R^2 = 0.9985$

2. 3 不同成熟度枇杷叶片的内源激素含量及愈伤组织诱导结果

本研究选用 3 种成熟度的枇杷叶片(图 2: A),展叶时间分别为 8、12、18 d,依次定义为 1 级、2 级和 3 级叶。其中 1 级叶为幼嫩材料,叶长约 9 cm,外被褐色绒毛,毛量较多,叶片薄而软呈黄绿色;2 级叶为中等成熟材料,叶长约 14 cm,外被浅褐色绒毛,毛量较少,叶片略革质化呈浅绿色;3 级叶为较成熟材料,叶长约 17 cm,外被少量浅褐色绒毛,叶片革质化明显且较厚,呈深绿色。截取叶片基部 5 cm<sup>2</sup>的部分,按 1.4.2 中的方法对不同成熟度叶片内源激素进行提取和分离,得到 HPLC 图谱(图 3)。在选定色谱条件下样品的目标峰明显,且与杂峰得到了很好的分离,说明上述提取方法较为可靠。

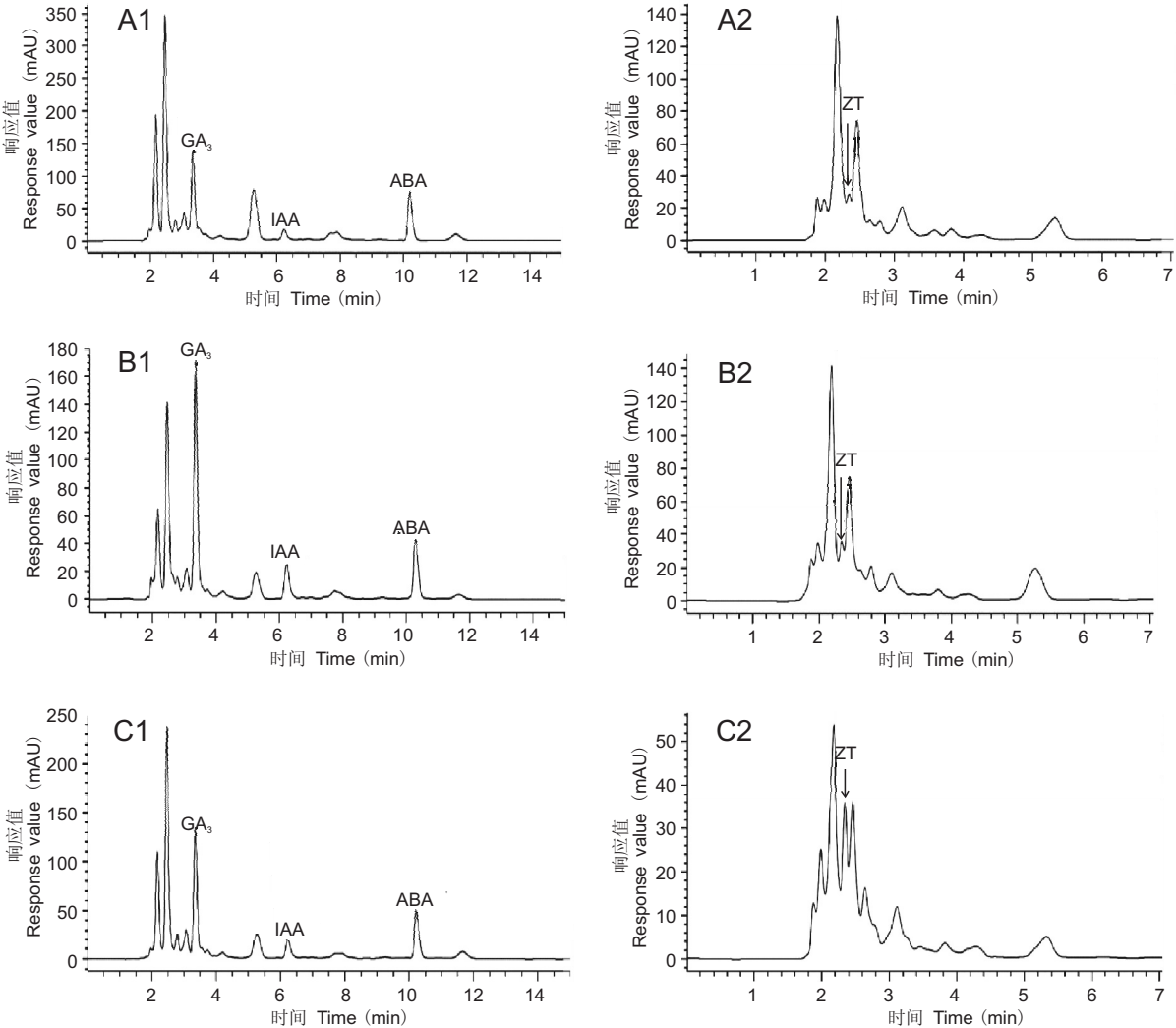
不同成熟度叶片的内源激素含量测定结果如表 2 所示。3、4 月时,枇杷展叶 8 ~ 18 d 内,随叶面积的扩大,ZT 含量逐渐增加,ABA 逐渐减少,GA<sub>3</sub>和 IAA 均表现为先增加后减少的趋势。对不同成熟度叶片离体培养后发现(表 3),2 级和 3 级叶的愈伤组织发生率较高,1 级叶在培养时大量褐化,出愈率最低。观察结果显示:非胚性愈伤组织发生较早,在初代培养 2 周后出现较多淡绿或黄绿色、结构较为松散的愈伤组织,并伴有一定程度的褐化。而胚性愈伤组织在初培 2 周后仅在叶片切口处形成 1 颗淡黄色球型细胞;在第二代继代培养后期,切口附近有淡黄色、半透明、表面光泽,排列



A: 从左至右依次为, 1 级叶(展叶 8 d)、2 级叶(展叶 12 d)和 3 级叶(展叶 18 d); B: 叶片培养产生的胚性愈伤组织。  
A: From left to right, level 1 leaf (8 d), level 2 leaf (12 d) and level 3 leaf (18 d); B: Embryonic calli induced from leaves of loquat.

图 2 3 种不同成熟度的枇杷叶片及胚性愈伤组织

Fig. 2 Three kinds of loquat leaves of different maturity and embryonic calli



A ~ C: 依次为 1 级叶、2 级叶和 3 级叶图谱。A1、B1、C1 为  $GA_3$ 、IAA、ABA 的色谱峰, A2、B2、C2 为 ZT 色谱峰。  
A - C: HPLC of level 1 leaf to level 3 leaf. A1 - C1 chromatographic peaks of  $GA_3$ , IAA, and ABA; A2 - C2 chromatographic peak of ZT.

图 3 不同成熟度叶片内源激素的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of leaves of different maturity



表 2 不同成熟度叶片的内源激素含量  
Table 2 Endogenous hormone content in leaves of different maturity

叶片 Leaf	激素含量 Hormone content (μg/g)					
	GA <sub>3</sub>	IAA	ABA	ZT	IAA/ZT	GA <sub>3</sub> /IAA
1 级	34.02 ± 11.46	6.64 ± 3.94	4.45 ± 7.69	3.68 ± 1.37	1.80 ± 0.36	5.12 ± 0.14
2 级	42.34 ± 14.75	8.66 ± 5.77	3.68 ± 15.33	4.24 ± 0.79	2.04 ± 0.28	4.88 ± 0.09
3 级	39.91 ± 8.28	7.32 ± 1.89	3.03 ± 6.83	5.04 ± 4.91	1.45 ± 0.16	5.45 ± 0.21

注：表中数值为平均值 ± 标准误 (n = 3)。  
Note: All date in the table are average value ± SE (n = 3).

表 3 不同成熟度叶片愈伤组织诱导率及胚性愈伤组织发生率  
Table 3 Rate of callus and embryonic callus induction from leaves of different maturity

叶片 Leaf	外植体数 Number of explants	出愈数 Number of calli	胚性愈伤数 Number of embryonic calli	愈伤组织诱导率 Callus induction rate (%)	胚性愈伤组织 诱导率 Embryonic callus induction rate (%)
1 级	120	61	49	50.53	40.83
2 级	120	92	63	76.67	52.50
3 级	120	79	35	65.82	29.17

较为紧密、表面具球型小颗粒的胚性愈伤组织团形成(图 2: B)，明显区别于非胚性愈伤组织。2 次继代培养后统计胚性愈伤组织发生率，结果表明，2 级叶的胚性愈伤组织发生率最高，达 52.50%，是枇杷叶片培养最佳的实验材料。1 级叶产生愈伤组织较少，但胚性愈伤占很大比例，其发生率仅次于 2 级叶。而 3 级叶虽产生较多愈伤组织，但多数为质地松散的非胚性愈伤，在培养过程中逐渐褐化死亡。结合各成熟度叶片内源激素含量综合分析发现，IAA/ZT 比值与胚性愈伤诱导率呈正相关 ( $R^2 = 0.9885$ )，GA<sub>3</sub>/IAA 比值对胚性愈伤诱导率可产生负效应 ( $R^2 = 0.9917$ )，外植体内 ABA 含量与胚性愈伤组织诱导无明显相关性。因此，出愈率的高低并非取决于某一种内源激素的含量，而是多种效应相互作用的结果。

2.4 愈伤组织发育过程中内源激素含量变化

将初代培养形成愈伤组织的培养物转接至继代培养基中，每隔 10 d 观察并测定内源激素含量。结果表明，随培养时间的增加，愈伤组织内源激素含量发生明显变化(图 4)。GA<sub>3</sub> 始终处于较高水平，在培养 0 ~ 20 d 内逐渐增加并达到峰值，30 d 时 GA<sub>3</sub> 含量明显减少，40 d 时略有增加，之后逐渐减少。IAA 含量在 0 ~ 30 d 期间逐渐增加，其中 10 ~ 20 d 内急剧增长，20 ~ 30 d 缓慢增长，于 30 d 时达到最大值，之后逐渐降低。ZT 和 ABA 在愈伤组织内含量较少，ZT 含量在培养初期

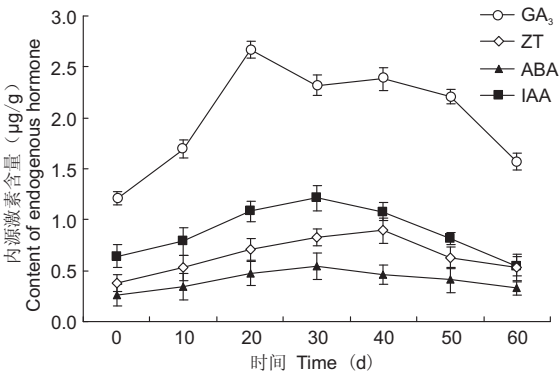
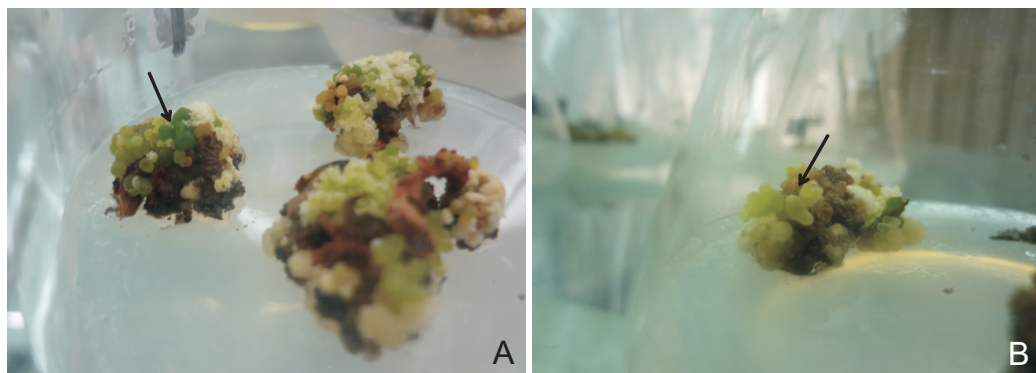


图 4 愈伤组织内源激素含量的动态变化  
Fig. 4 Dynamic changes in endogenous hormone content in calli

逐渐增加，于 40 d 时达到最大值。ABA 变化范围较小，30 d 时含量达到最大值。观察愈伤组织生长状态发现，0 ~ 20 d 内愈伤组织快速生长，30 d 左右淡黄色胚性愈伤组织团出现；40 ~ 60 d 愈伤组织生长缓慢，边缘逐渐老化并伴有一定程度的褐化。研究结果表明，胚性愈伤组织大量发生时，GA<sub>3</sub> 含量有所减少，IAA 和 ABA 均处于最大值。因此，枇杷叶片胚性愈伤组织的发生需要较低水平的 GA<sub>3</sub> 及较高水平的 IAA 和 ABA。另外，IAA/ZT 比值高也有利于胚性愈伤组织的形成。30 d 后各激素水平降低可能是造成愈伤组织逐渐老化的原因。以 15 d 为继代周期，材料及时转接至 1/2MS 培养基中(含 0.5 mg/L 6-BA，0.2 mg/L NAA)，转接 4 次后，胚性愈伤组织表面突起，表面光泽的球形胚和心形胚相继出现(图 5)。



A: 球形胚; B: 心形胚。

A: Globular embryo of loquat; B: Heart shaped embryo of loquat.

图 5 球形胚和心形胚

Fig. 5 Globular embryo and heart shaped embryo

### 3 讨论

培养难度大、再生困难等现状严重制约了枇杷离体快繁及遗传改良技术的发展。本研究从内源激素的角度探究胚性愈伤组织发生的条件,为深入研究枇杷体细胞胚发生机制奠定了基础。

#### 3.1 内源激素的提纯及 HPLC 的色谱条件

本研究初步探索了 HPLC 测定枇杷叶片及愈伤组织内源激素的方法。结果表明 ZT、IAA 和 ABA 在 250 ~ 260 nm 范围内均有较大的吸收峰,而  $GA_3$  在 210 nm 下吸收峰最大。实验曾尝试设置双波长以提高检测灵敏度,结果发现 210 nm 下受甲醇干扰较大,基线难平,因此最后选定 254 nm 作为检测波长。鉴于枇杷叶片内含较多色素及多酚类物质,易对 HPLC 目标峰产生干扰,因此实验采用多次萃取、PVPP 吸附及 C18 小柱分离相结合的方法,较好地排除了杂质干扰,有效实现 4 种激素的提纯。

#### 3.2 叶片内源激素含量与胚性愈伤组织诱导

枇杷叶面积增大,叶片内组织的分化及结构发育都受到激素调控。而叶片的发育程度也影响其离体再生能力。本研究结果表明,枇杷叶片由幼嫩转为成熟的过程中, $GA_3$  和 IAA 含量均呈先上升后下降的变化趋势,ABA 含量逐渐下降,这与马海燕等<sup>[12]</sup>的研究结果一致。高庆玉等<sup>[15]</sup>在树莓(*Rubus corchorifolius* Linn. f.)叶片发育过程中也发现, $GA_3$  和 IAA 在叶面积快速增长长期时含量迅速升高,随后含量逐渐降低。本研究还发现外植体内单个激素水平与胚性愈伤组织的发生没有明显

相关性,而激素间的比值可以影响离体培养的效果。

#### 3.3 胚性愈伤组织的发生与内源激素含量

植物愈伤组织诱导及体细胞胚的发生受内源激素调控,其中 IAA 和 CTK 之间维持平衡是离体再生的重要生理条件。ABA 被认为是器官发生的调节器<sup>[16]</sup>,而  $GA_3$  与 IAA 的作用类似<sup>[17]</sup>。付凤玲等<sup>[18]</sup>研究发现,高水平的 IAA、ABA 和低水平的  $GA_3$  有利于玉米胚性愈伤组织的诱导,此结果与本研究一致。而贾小霞等<sup>[5]</sup>研究认为,高水平  $GA_3$  利于胚性愈伤组织的诱导。郭敏敏等<sup>[19]</sup>研究发现,高含量 ABA 对胚性愈伤的形成有促进作用,而过高浓度的 IAA 不利于胚性细胞形成。田春英等<sup>[7]</sup>的研究也表明,苹果叶片离体培养初期,IAA、ABA 和 ZR (玉米素核苷)含量均较高,而在细胞旺盛分裂期和分化期 IAA 逐渐降低,而 ABA 和 ZR 含量仍保持较高水平。

除植物本身存在内源激素差异外,造成激素表现差异的原因还可能包括以下几点。一是取材部位不同(如幼胚、花药、叶片)。各部位组成结构不同可能导致激素水平的差异。二是胚性愈伤组织的发生方式不同。本研究中胚性愈伤组织由叶片直接诱导获得,若经过愈伤组织诱导后再进入胚性愈伤组织阶段,可能使内源激素的含量出现较大差异。三是继代次数不同。短时间的继代培养可能通过增加酶活性的方式促进愈伤组织胚性化<sup>[20]</sup>,但随继代次数增多,内源激素水平下降在很大程度上影响了培养物的生长,因此在及时继代培养的基础上还应注意调整外源激素的种类及添加量。另外,胚性

保持是培养过程中的一大难题, 洪森荣等<sup>[21]</sup>提出的包埋超低温保存法可为枇杷胚性愈伤组织的保存提供一条解决途径。

## 参考文献:

- [1] Chen FX, Liu XH, Chen LS. Developmental changes in pulp organic acid concentration and activities of acid-metabolizing enzymes during the fruit development of two loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars differing in fruit acidity[J]. *Food Chem*, 2009, 114: 657-664.
- [2] 陈小飞, 萧浪涛, 鲁旭东, 童建华. 石刁柏胚性细胞诱导过程中的内源激素和多胺含量变化[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(5): 826-830.
- Chen XF, Xiao LT, Lu XD, Tong JH. Changes in endogenous phytohormone and polyamine contents during embryogenic cells induction of *Asparagus officinalis* L. [J]. *Plant Physiology Communications*, 2006, 42(5): 826-830.
- [3] 吴延军, 谢鸣, 蒋桂华, 陈俊伟, 吴江, 张上隆. 枇杷成熟子叶及叶片不定芽再生研究[J]. 林业科学, 2007, 43(1): 107-110.
- Wu YJ, Xie M, Jiang GH, Chen JW, Wu J, Zhang SL. Adventitious shoot regeneration from mature cotyledons and leaves of loquat (*Eriobotrya japonica*) [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2007, 43(1): 107-110.
- [4] 王芳, 吕洪飞, 徐红霞, 杨勇, 严其成, 汪志平. 枇杷幼叶组织培养与植株再生研究[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(1): 53-56.
- Wang F, Lü HF, Xu HX, Yang Y, Yan QC, Wang ZP. Plantlet regeneration from leaves of *Eriobotrya japonica* Lindl [J]. *Letters in Biotechnology*, 2011, 22(1): 53-56.
- [5] 贾小霞, 王汉宁, 孔维萍, 梁慧光, 张金文. 玉米幼胚和成熟胚愈伤组织诱导过程中内源激素的比较[J]. 核农学报, 2009, 24(4): 555-560.
- Jia XX, Wang HN, Kong WP, Liang HG, Zhang JW. Comparison of dynamic changes of endogenous hormones in callus between mature and immature embryos of maize [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2009, 24(4): 555-560.
- [6] 吴顺, 萧浪涛, 刘清, 沈革志, 王若仲. 水稻愈伤组织中内源激素水平与遗传转化的关系[J]. 核农学报, 2009, 23(2): 257-261.
- Wu S, Xiao LT, Liu Q, Shen GZ, Wang RZ. Relationship between endogenous hormones in rice calli and genetic transformation[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2009, 23(2): 257-261.
- [7] 田春英, 邵建柱, 刘莹, 徐继忠. 红富士苹果叶片不定芽再生中激素、多胺和 NO 含量的变化[J]. 园艺学报, 2010, 37(9): 1403-1408.
- Tian CY, Shao JZ, Liu Y, Xu JZ. Change of hormones, polyamines and NO content during regeneration of adventitious buds from *in vitro* leaves of Red Fuji apple[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010, 37(9): 1403-1408.
- [8] 丁广文, 李华, 何桥. 植物内源激素检测技术的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(3): 1258-1265.
- Ding GW, Li H, He Q. Progress in study of endogenous hormones detection methods in plant[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(3): 1258-1265.
- [9] 胡晓辉, 江玉萍, 苗华荣, 石运庆, 陈静. 高效液相色谱法测定花生内源激素的改进研究[J]. 花生学报, 2014, 43(4): 50-53.
- Hu XH, Jiang YP, Miao HR, Shi YQ, Chen J. Study on the improvement of HPLC method for analyzing endogenous hormone in peanut[J]. *Journal of Peanut Science*, 2014, 43(4): 50-53.
- [10] 未晓巍, 勾畅, 徐民泽, 徐洪伟, 周晓馥. 高效液相色谱法测定玉米内源激素方法的改进研究[J]. 玉米科学, 2013, 21(3): 144-148.
- Wei XW, Gou C, Xu MZ, Xu HW, Zhou XF. Study on the improvement of HPLC method for analyzing endogenous hormone in maize[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2013, 21(3): 144-148.
- [11] 张媛媛, 马晖玲, 俞玲, 赵媛. 草地早熟禾愈伤组织诱导和分化中内源激素水平分析[J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 48(2): 74-79.
- Zhang YY, Ma HL, Yu L, Zhao Y. Tissue culture and endogenous hormones change of *Poa Pratensis*[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2013, 48(2): 74-79.
- [12] 马海燕, 王美丽, 张振文. 葡萄新梢生长过程中内源激素含量的动态变化[J]. 西北农业学报, 2007, 16(4): 177-179.
- Ma HY, Wang ML, Zhang ZW. Changes of endogenous hormones in the shoots of grapevine[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2007, 16(4): 177-179.
- [13] 曾庆钱, 陈厚彬, 鲁才浩, 李建国. HPLC 测定荔枝不同器官中内源激素流程的优化[J]. 果树学报, 2006, 23(1): 145-148.
- Zeng QQ, Chen HB, Lu CH, Li JG. An optimized HPLC procedure for analyzing endogenous hormones in different organs of litchi [J]. *Journal of Fruit Science*, 2006, 23(1): 145-148.
- [14] 周红玲, 赖钟雄, 郑加协, 张娟, 李永裕, 陈石. 梯度洗脱测定枇杷试管苗内源激素方法的研究[J]. 热带作物学报, 2010, 31(12): 2292-2296.
- Zhou HL, Lai ZX, Zheng JX, Zhang J, Li YY, Chen S. Determination of intrinsic hormones in plantlets *in vitro* of loquat cultivar by HPLC with gradient elution[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2010, 31(12): 2292-2296.
- [15] 高庆玉, 闫超, 张丙秀, 王振武, 王雪娇, 张宇. 树莓叶片生

- 长过程中内源激素含量变化初步研究[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(24): 6280–6283.
- Gao QY, Yan C, Zhang BX, Wang ZW, Wang XJ, Zhang Y. Changes of endogenous hormone content during the growth of raspberry leaves[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2015, 54(24): 6280–6283.
- [16] Rai MK, Shekhawat NS, Harish, Gupta AK, Phulwaria M, Ram K, Jaiswal U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2011, 106: 179–190.
- [17] Huang WL, Lee CH, Chen YR. Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2012, 108: 257–263.
- [18] 付凤玲, 冯质雷, 渠柏艳, 李晚忱. 玉米未成熟胚胚性愈伤组织诱导率与内源激素含量的关系[J]. 核农学报, 2006, 20(1): 10–14.
- Fu FL, Feng ZL, Qu BY, Li WC. Relationships between induction rate of embryonic callus and endogenous hormones content in maize[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2006, 20(1): 10–14.
- [19] 郭敏敏, 王清连, 胡根海. 利用高效液相色谱法分离和测定棉花组织培养过程中 4 种内源激素[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(2): 213–216.
- Guo MM, Wang QL, Hu GH. Separation and determination of four plant hormones during somatic embryogenesis of *Gossypium hirsutum* L. with HPLC[J]. *Letters in Biotechnology*, 2009, 20(2): 213–216.
- [20] 刘艳君, 张超, 杨静慧, 李冰, 刘婷, 秦艳筠. 塔杨松散型均质胚性愈伤组织培养体系[J]. 植物研究, 2016, 36(1): 123–128.
- Liu YJ, Zhao C, Yang JH, Li B, Liu T, Qin YJ. Culture system on loose, homogeneous, embryogenic callus of *Populus×canadensis* Moench ‘Tower’[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2016, 36(1): 123–128.
- [21] 洪森荣, 尹明华, 王艾平. 江西铅山红芽芋胚性愈伤组织的包埋玻璃化超低温保存[J]. 植物科学学报, 2014, 32(1): 80–87.
- Hong SR, Yin MH, Wang AP. Cryopreservation of Jiangxi Yanshan red bud taro embryogenic calli by encapsulation-vitrification[J]. *Plant Science Journal*, 2014, 32(1): 80–87.

(责任编辑: 周 媛)