

‘巴斗’杏再生体系的建立与耐盐突变体的筛选

杜雪玲^{1,*}, 余如刚¹, 宋运贤¹, 张振霞²

¹淮北师范大学生命科学学院资源植物学安徽省重点实验室, 安徽淮北235000; ²韩山师范学院生物系, 广东潮州521041

摘要: 以‘巴斗’杏试管苗茎段为外植体, 研究其再生体系的建立以及在含不同浓度NaCl培养基上诱导耐盐愈伤组织, 筛选耐盐突变体。结果显示: 茎段在MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+IBA 0.5 mg·L⁻¹培养基上诱导愈伤组织效果最好, 芽的分化率可达88%; 将出芽愈伤组织块接种到附加IBA 0.5 mg·L⁻¹+KT 2.0 mg·L⁻¹的MS分化培养基上效果最佳, 芽的分化系数最高为12.7; 较理想的生根培养基为MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹, 生根率在46.3%以上; 在含0.8% NaCl的愈伤组织诱导培养基中, 连续继代筛选2代, 转入不含NaCl的分化培养基中, 分化出了完整植株。经继代培养筛选, 测定发现获得的耐盐植株比正常培养植株的游离脯氨酸含量高。

关键词: ‘巴斗’杏; 植株再生; 耐盐筛选; 突变体

Establishment of Plant Regeneration System and Salt-Tolerant Mutant Selection of ‘Badou’ Apricot Embryonic Calli

DU Xue-Ling^{1,*}, YU Ru-Gang¹, SONG Yun-Xian¹, ZHANG Zhen-Xia²

¹College of Life Science and Anhui Key Laboratory of Plant Resources and Biology, Huaibei Normal University, Huaibei, Anhui 235000, China; ²Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou, Guangdong 521041, China

Abstract: Using stem as explant, the regeneration system of ‘Badou’ apricot and filtering of salt tolerance mutant were studied. The results showed that the best callus induction media was on MS media with 6-BA 1.5 mg·L⁻¹ and IBA 0.5 mg·L⁻¹, and the rate of differentiation was 88%. The coefficient of differentiation reached 12.7 when the calli were inoculated on the MS media with the IBA 0.5 mg·L⁻¹ and KT 2.0 mg·L⁻¹. The most suitable rhizogenic media was MS with NAA 0.1 mg·L⁻¹ and IBA 0.2 mg·L⁻¹, and the rooting rate was above 46.3%. The callus could differentiate plant when the calli were inoculated on induction media with 0.8% NaCl. The free proline content of filtering plant was higher than that of the contrast.

Key words: ‘Badou’ apricot; plantlet regeneration; salt-tolerant selection; mutant

‘巴斗’杏, 别名: ‘大巴斗’杏、‘黄巴斗’杏。原产安徽萧县, 是安徽淮北地区的古老品种。品质上佳, 果实酸甜较丰产, 是优良的鲜食和加工兼用品种(韩康平1999)。目前, ‘巴斗’杏的繁殖主要采用无性繁殖, 周期较长, 同时病害的发生, 逐渐导致‘巴斗’杏现有品种种性退化、产量和品质下降, 而通过组织培养技术却可以解决这方面的问题(覃兰英和姚砚武1994; 李梦玲等1998; 周玲艳等2009; Perez-Tornero等2000; Miguel和Oliverira 1999)。目前尚未有淮北‘巴斗’杏组织培养方面的报道。另外, 土壤盐渍化是限制农林业生产的一个世界性问题, 培育耐盐作物品种是利用盐碱地荒地的一条经济而有效的途径。利用组织培养、细胞培养技术, 从高等植物细胞中筛选耐盐细胞无性系及变异体或突变体的研究已有报道(刘海学等2008; 李振侠2006; 高玉红和李云2004; 韦小敏等2007),

而‘巴斗’杏也未有这方面的研究报道。因此本试验以淮北地区‘巴斗’杏茎段为培养材料, 建立‘巴斗’杏再生体系, 并对‘巴斗’杏耐盐突变系筛选进行初步研究, 为进一步开展杏树优良种质资源保存以及品种改良建立了一定的基础。

材料与amp;方法

1 材料

试材为‘巴斗’杏(*Armeniaca vulgaris* Lam. cv. ‘Badou’)无菌组培苗(淮北黄里‘巴斗’杏, 4月份取嫩枝进行带芽茎段增值培养3代, 每代20 d, 获得组培苗)取自淮北师范大学生命科学学院生物技术培

收稿 2010-12-16 修定 2011-01-21

资助 2008年度安徽省高校自然科学研究项目(KJ2008B230)。

* 通讯作者(E-mail: xuelingdu@yahoo.com.cn; Tel: 0561-3803119)。

养室, 无菌组培苗在MS+BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹+琼脂6 g·L⁻¹的带芽增值培养基上继代培养。

2 方法

2.1 培养基及培养条件

本试验均以MS为基本培养基附加蔗糖30 g·L⁻¹、琼脂6 mg·L⁻¹, pH 5.8, 121 °C高压灭菌15 min。光照培养: 白天(25±1) °C, 夜晚(20±1) °C, 光照时间12 h·d⁻¹, 光照强度30~40 μmol·m⁻²·s⁻¹; 黑暗培养: 温度25 °C, 无光照。

2.2 基本培养基的筛选

取继代培养生长良好的组培苗嫩茎段0.5 cm (140株)分别接种在MS、WPM和White为基本培养基(均附加有6-BA 1.5 mg·L⁻¹和IBA 0.5 mg·L⁻¹)上。暗培养15 d后, 统计愈伤组织诱导率, 转入光下培养15 d后, 统计芽的分化率。然后将出芽愈伤组织转入附加IBA 0.5 mg·L⁻¹+KT 2.0 mg·L⁻¹的MS分化培养基上, 光照培养30 d后, 统计芽的分化系数。

2.3 植物生长调节剂的筛选

取组培苗嫩茎段0.5 cm (180个), 接种在(1)、(2)培养基(表1)中, 暗培养15 d后, 统计愈伤组织诱导率, 转入光下培养15 d后, 统计芽的分化率。然后将出芽愈伤组织转入(1)、(3)分化培养基(表1)上, 光照培养30 d后, 统计芽的分化系数。然后转

入附加不同浓度配比NAA和IBA的MS培养基中进行生根诱导, 20 d后, 统计结果。

2.4 耐盐突变系筛选与检验

设计的5个NaCl浓度梯度为0.3%、0.5%、0.8%、1.0%、1.5%, 逐步增加愈伤组织诱导及分化培养基含盐量。将组培苗嫩茎段0.5 cm (120个)接入以MS为基本培养基附加6-BA 1.5 mg·L⁻¹和IBA 0.5 mg·L⁻¹, 15 d后, 将具有活性愈伤组织接入继代培养(2代, 每代20 d)。筛选具有活性能耐0.5%、0.8%、1.0%盐胁迫的3个愈伤组织。挑出耐0.8%盐胁迫的愈伤组织块转入以MS为基本培养基附加KT 2.0 mg·L⁻¹和IBA 0.5 mg·L⁻¹无盐分化培养基中, 然后将耐0.8% NaCl分化苗与正常分化苗进行常规耐盐比较试验, 同时采用酸性茚三酮法(朱广廉等1990)测定其游离脯氨酸含量, 初步测定是否发生突变。

实验结果

1 不同基本培养基对愈伤组织诱导及丛生芽分化的影响

培养基的选择是建立植物再生体系的基础, 本试验将‘巴斗’杏茎段分别接入均附加有6-BA 1.5 mg·L⁻¹及IBA 0.5 mg·L⁻¹的MS、WPM和White三种培养基上, 由表2、3可知, MS、WPM和White三种

表1 基本培养基及植物生长调节剂浓度配比

Table 1 Basic culture medium and plant growth regulator concentrations

处理	基本培养基	基本激素及浓度/mg·L ⁻¹	附加激素及浓度/mg·L ⁻¹
1	MS	IBA 0.5	6-BA 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 KT 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 TDZ 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0
2	MS	6-BA 1.5	NAA 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5 IBA 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5 2,4-D 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5
3	MS	KT 2.0	NAA 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5 IBA 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5 2,4-D 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5

表2 不同基本培养基对愈伤组织分化的影响

Table 2 Effects of basic medium on callus differentiation frequency

基本培养基	愈伤组织结构状态	愈伤组织诱导率/%	芽分化率/%
MS	松散、易碎	100 ^{Aa}	88.0 ^{Aa}
WPM	紧实、易碎	100 ^{Aa}	77.8 ^{Bb}
White	膨大、紧实、核硬	100 ^{Aa}	71.1 ^{Bb}

芽的分化率后有相同字母表示Duncan's新复极差测验(小写字母表示 $P<0.05$ 水平, 大写字母表示 $P<0.01$ 水平)差异不显著, 不同字母表示相同处理条件下差异显著。下同。

表3 不同基本培养基对丛生芽的影响

基本培养基	接种的出芽愈伤组织数/个	总芽数/个	芽的分化系数
MS	44	484	11.0 ^{Aa}
WPM	35	248	7.1 ^{Bb}
White	32	205	6.4 ^{Bb}

基本培养基对‘巴斗’杏茎段的愈伤组织诱导率均为100%。但是在激素及其浓度配比相同的条件下,芽的分化率、芽的分化系数差异极显著,在MS中芽分化率高达88%,芽的分化系数高达11,分化苗生长正常,而White中芽分化率为71.1%,芽的分

化系数为6.4, WPM中芽分化率为77.8%,芽的分化系数为7.1,且生长势很弱,部分叶片弯曲。可见,MS培养基为‘巴斗’杏茎段愈伤组织诱导及芽分化的最适培养基。因此本文采用MS培养基作为愈伤组织诱导及芽分化苗的基本培养基。

2 植物生长调节剂种类和浓度对愈伤组织诱导和丛生芽分化的影响

本试验观察结果显示,茎段在各植物生长调节剂培养基上培养1周后在茎段的伤口处开始产生白色、淡黄色、有的为浅褐色的愈伤组织,15 d后均能形成愈伤组织(图1-A),愈伤组织诱导率为100%。

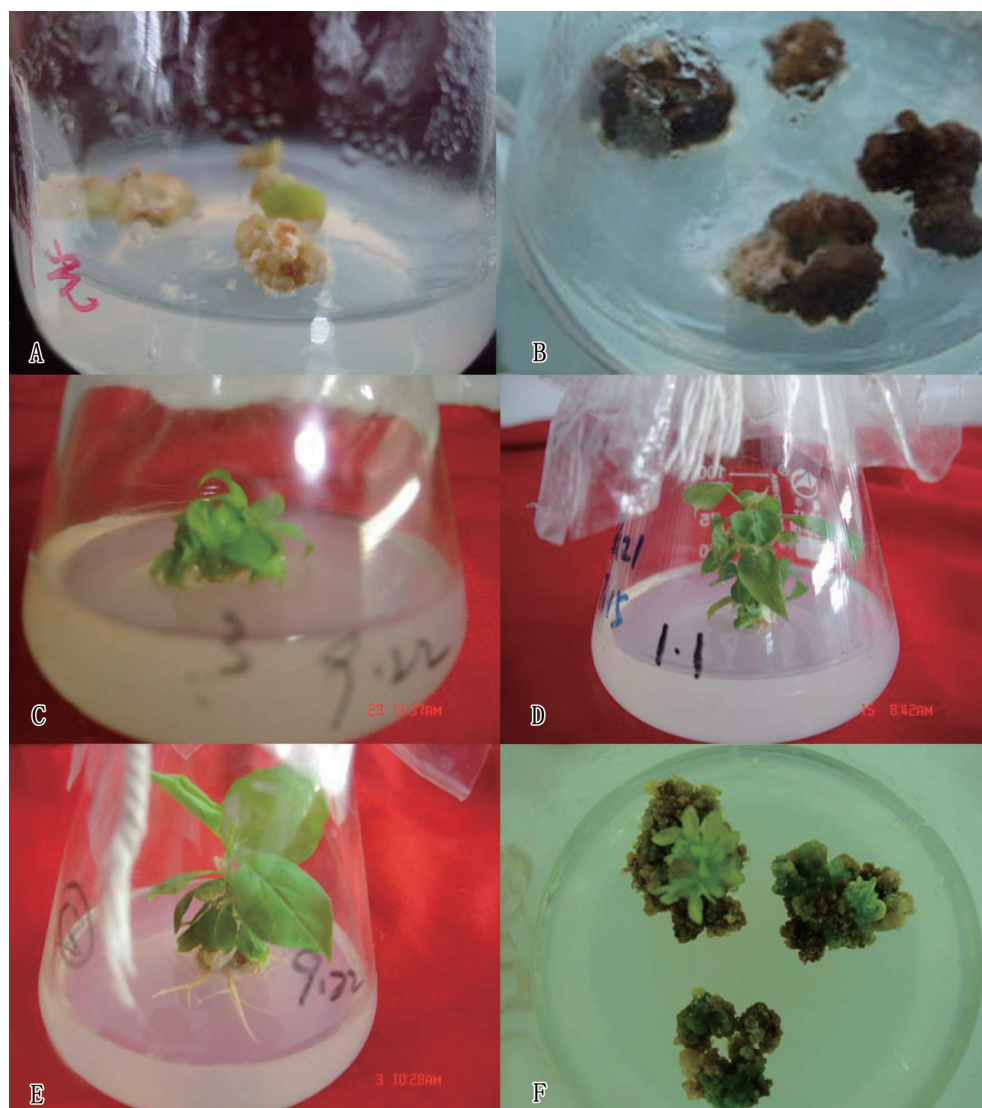


图1 ‘巴斗’杏的组织培养和植株再生

Fig.1 Tissue culture and plant regeneration of ‘Badou’ apricot

A: 20 d后正常茎段愈伤组织; B: 30 d后褐色愈伤组织; C: 再生丛生芽; D: 再生芽伸长培养; E: 试管苗生根; F: 耐0.8% NaCl再生芽。

但是光照培养15 d后,不是所有的愈伤组织均可以分化出芽,有的愈伤组织长势很好,但不能分化,特别是那些颜色褐色(图1-B)、质地干燥紧实表面有很多瘤状突起的愈伤组织都没有分化出芽。有的颜色淡黄,外层松散,内层硬实的愈伤组织一般在1次继代后,逐渐产生绿色芽点并最终分化成苗(图1-C)。

2.1 不同浓度生长素对愈伤组织诱导和芽分化的影响

由图2可以看出,不同浓度NAA、IBA、2,4-D对芽的分化率影响很大,芽的分化率随着生长素浓度的增加而提高,在生长素浓度为0.5 mg·L⁻¹时,芽的分化率分别达到最大值的72.2%、86.1%、77.8%,随着生长素浓度的进一步增加芽的分化率开始下降。观察得知2,4-D处理产生的芽玻璃化现象明显,形态不正常。所以,本实验均采用IBA浓度为0.5 mg·L⁻¹作为建立‘巴斗’杏再生体系时诱导愈伤组织分化的最适宜生长素及其浓度。

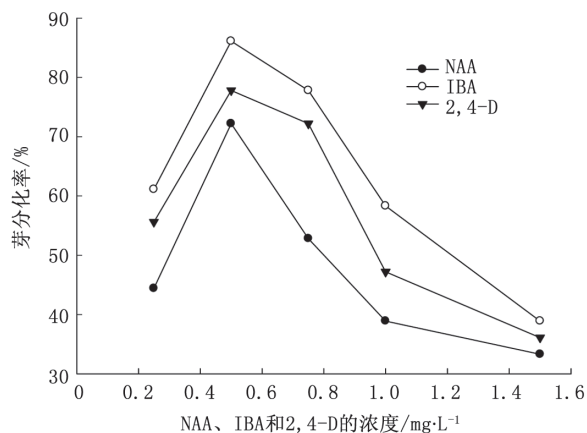


图2 不同浓度的NAA、IBA和2,4-D对愈伤组织分化的影响
Fig.2 Effects of different NAA, IBA and 2,4-D concentrations on callus differentiation frequency

由图3可知,IBA在0.5 mg·L⁻¹时芽的平均分化系数显著高于其他,其平均分化系数8.9;NAA和2,4-D各浓度芽的平均分化系数与IBA相比差异显著,其中NAA最多为5.2、2,4-D最多仅为3.2。由此看出各生长素对‘巴斗’杏丛生芽分化的效果依次为IBA>NAA>2,4-D。本试验以IBA 0.5 mg·L⁻¹作为‘巴斗’杏丛生芽分化的最适宜生长素及其浓度。

2.2 不同浓度细胞分裂素对愈伤组织诱导和芽分化的影响

由图4可知,当6-BA浓度为1.5 mg·L⁻¹时,芽分

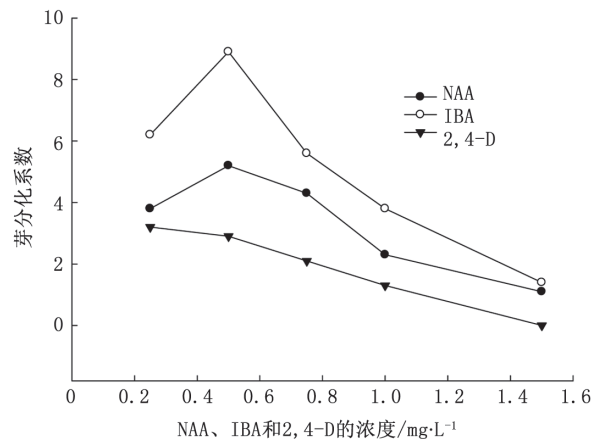


图3 不同浓度的NAA、IBA和2,4-D对丛生芽分化的影响
Fig.3 Effects of different NAA, IBA and 2,4-D concentrations on adventitious buds inducing

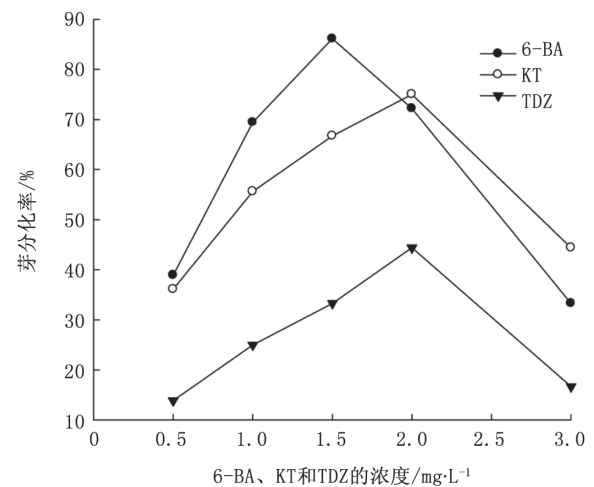


图4 不同浓度的6-BA、KT和TDZ对愈伤组织分化的影响
Fig.4 Effects of different 6-BA, KT and TDZ concentrations on callus differentiation frequency

化率达到最大值的86.1%,随着6-BA浓度的增大芽分化率显著降低。与6-BA相比,KT浓度为2.0 mg·L⁻¹时最大芽分化率为75%,低于6-BA。在TDZ上培养形成比较硬实、绿色并有浅褐色愈伤块,虽有芽的分化,但芽分化率明显比6-BA和KT上的少,最高仅为44.4%,显然KT和TDZ都不是诱导愈伤组织分化最佳的细胞分裂素类型。因此,本实验采用6-BA浓度为1.5 mg·L⁻¹时作为建立‘巴斗’杏再生体系时诱导愈伤组织分化的最适宜细胞分裂素及其浓度。

由图5可知,芽的分化系数随着细胞分裂素浓

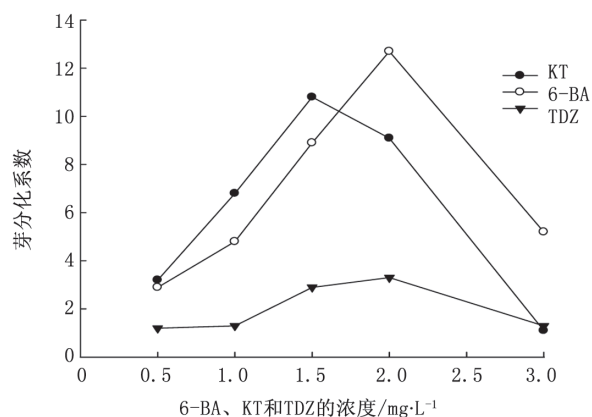


图5 不同浓度的6-BA、KT和TDZ对丛生芽分化的影响
Fig.5 Effects of different 6-BA, KT and TDZ concentrations on adventitious buds inducing

度的增加而提高,在浓度1.5~2.0 mg·L⁻¹范围内,芽的分化系数达到最大值10.2~12.7,随着激素的进一步增加芽的分化率开始下降,且产生的芽形态不正常,叶片不能正常伸展,玻璃化现象明显。在TDZ上培养,芽的分化系数明显比KT和6-BA上的小,最高为3.3,分化出的芽短粗,叶片弯曲。由于KT在2.0 mg·L⁻¹时,芽的分化系数最大为12.7,因此,本试验以KT 2.0 mg·L⁻¹作为‘巴斗’杏丛生芽分化的最适宜细胞分裂素及其浓度。

3 组培苗的生根

以MS+IBA 0.3 mg·L⁻¹为壮苗培养基,将长2~3 cm的健壮嫩芽(66株,图1-D)置于不同生根培养基上培养15 d后,结果见表4。从中可见:不同浓度NAA和IBA对比对诱导生根的效果差异明显,最适的生根培养基为MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹,根多而粗壮(图1-E),生根率最高为46.3%。

4 ‘巴斗’杏耐盐突变体的筛选

将‘巴斗’杏茎段接种到分别含有0.3%、0.5%、0.8%、1.0%、1.5% NaCl的MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+IBA 0.5 mg·L⁻¹培养基上进行耐盐培养。结果(表5)表明,各处理条件下都形成了愈伤组织,但是观察显示各处理中只有个别细胞存活下来,突起小绿点,大部分呈浅褐色,特别是在含1.5%氯化钠培养基中愈伤组织呈现为褐色,有的甚至为黑色。当NaCl浓度为0.3%时显著抑制芽的分化;当NaCl达到0.5%时,极显著地抑制芽的分化,因此选0.5% NaCl作为耐盐筛选的最低临界值;当NaCl浓

表4 不同植物生长调节剂浓度对‘巴斗’杏生根的影响

Table 4 Effect of different plant growth regulator concentrations on rooting rate of ‘Badou’ apricot

处理	基本培养基	NAA/mg·L ⁻¹	IBA/mg·L ⁻¹	生根率/%
(1)	MS	0	0.1	12.1 ^{Cc}
(2)	MS	0	0.2	25.4 ^{Bb}
(3)	MS	0	0.3	22.6 ^{Bb}
(4)	MS	0.1	0.0	10.8 ^{Cc}
(5)	MS	0.1	0.1	15.8 ^{Cc}
(6)	MS	0.1	0.2	46.3 ^{Aa}
(7)	MS	0.1	0.3	29.6 ^{Bb}
(8)	MS	0.2	0.0	11.2 ^{Cc}
(9)	MS	0.2	0.1	13.6 ^{Cc}
(10)	MS	0.2	0.2	25.2 ^{Bb}
(11)	MS	0.2	0.3	24.1 ^{Bb}

表5 NaCl浓度对愈伤组织诱导及芽分化的影响

Table 5 Effect of NaCl concentration on callus induction and bud differentiation frequency

NaCl/%	茎段数/个	愈伤组织诱导率/%	芽分化率/%
0	50	100 ^{Aa}	11.24 ^{Aa}
0.3	50	100 ^{Aa}	7.62 ^{Bb}
0.5	50	100 ^{Aa}	5.28 ^{Cc}
0.8	50	100 ^{Aa}	3.56 ^{Cc}
1.0	50	100 ^{Aa}	1.78 ^{Dd}
1.5	50	100 ^{Aa}	0 ^{Dd}

度超过1%时芽的分化率极低,将其作为最高临界值。将含0.5%、0.8%、1.0%氯化钠培养基中的愈伤组织刮去表面愈伤组织进行继代培养,如此重复继代培养2次,发现愈伤组织逐渐扩大、存活细胞增多,颜色为淡绿色,松散。挑选耐0.8% NaCl愈伤组织块转至无盐愈伤组织诱导与分化培养基MS+KT 2.0 mg·L⁻¹+IBA 0.5 mg·L⁻¹上进行培养,20 d左右分化出芽(图1-F)。

5 ‘巴斗’杏耐盐突变体的检验

随机抽取20株耐0.8% NaCl分化的不定芽,移到不含NaCl的壮苗培养基上培养一个月后,再移入含有0.8%氯化钠溶液增殖培养基中与对照组进行比较,30 d后观察。结果显示:在0.8% NaCl增殖培养基中耐盐突变体依旧保持其不定芽的耐盐稳定性,生长状况良好,叶片伸展,而对照移入0.8% NaCl培养基14 d后便逐渐死亡。测定耐0.8% NaCl植株的游离脯氨酸含量为8.325 mg·g⁻¹,对照株为2.204 mg·g⁻¹,可见耐盐突变株系的脯氨酸含量明显高于对照。

讨 论

1 基本培养基和植物生长调节剂对植株再生的影响

有关杏再生体系的建立中基本培养基的选择多以MS、WPM和White培养基为主(王鸿2005; 郭晖2007; 马锋旺和李嘉瑞1998; 马锋旺等1999; 王玖瑞等2000)。本实验通过多因素比较实验得出‘巴斗’杏以MS为基本培养基时愈伤组织和丛生芽分化诱导效果最好。再生培养基中, 植物生长调节剂的种类和浓度的选择在外植体的离体培养中起关键的作用。王鸿(2005)用山杏下胚轴切段在附加TDZ $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和NAA $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的改良MS培养基($1/2\text{NH}_4\text{NO}_3$)上获得较高的愈伤组织诱导率和再生频率; 本实验利用高浓度的细胞分裂素($1.5\sim 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)和低浓度的生长素($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA)通过‘巴斗’杏茎段直接诱导出愈伤组织并分化出芽。同时通过实验观察发现生长素2,4-D适合‘巴斗’杏愈伤组织诱导, 可是2,4-D对愈伤组织分化效果明显不如IBA, 对于2,4-D是不是有利于愈伤组织诱导, 而不利于愈伤组织分化还需进一步研究(由于本实验采用一步法诱导愈伤组织及芽的分化, 在诱导出愈伤组织后培养基不变的情况下继续诱导芽)。本实验将出芽愈伤组织块接种到附加IBA $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +KT $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MS分化培养基上效果最佳, 芽的分化系数最高, 为12.7。另外王鸿(2005)在杏的再生体系建立研究中用改良MS+IBA $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上培养形成完整植株, 生根率为75.8%, 本实验‘巴斗’杏在MS+NAA $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 生根率最高, 达46.3%, 同时本试验仅仅是建立试管苗无性系, 如何进一步提高其生根率及移栽成活率, 将这一技术尽快应用于生产, 还需进一步深入研究。

2 耐盐植株的鉴定

脯氨酸含量是鉴定作物耐盐性的一个生理生化指标。一般认为, 脯氨酸含量高的植株耐盐性强(阮先乐等2009; 周立名等2009)。李周岐等(1995)在河北杨体细胞抗盐性变异系氨基酸组分变异性分析中的结果表明, 7个抗盐性变异系的氨基酸代谢均发生显著变化, 各变异系的变化程度

和方式均不同。这与本研究在耐盐突变体的检验中试验株脯氨酸含量显著高于对照组结果一致。但鉴于植物的耐盐性是许多性状相互作用的一种综合表现, 不同植物由于其耐盐方式和耐盐机理不同, 使得其生理代谢和生化变化也不同(杨升等2010), 我们将在以后的试验中进一步跟踪调查。

参考文献

- 高玉红, 李云(2004). 植物离体培养筛选耐盐突变体的研究. 核农学报, 18 (6): 448~452
- 郭晖(2007). 大扁杏离体组织茎芽分化诱导试验. 平原大学学报, 24 (4): 122~125
- 韩康平(1999). 辽阳引种的巴斗杏表现良好. 新农业, (10): 37
- 李梦玲, 李嘉瑞, 马锋旺(1998). 杏的茎尖培养研究. 干旱地区农业研究, 15 (1): 111~116
- 李振侠(2006). 苹果砧木耐盐突变体的筛选及其鉴定[学位论文]. 河北保定: 河北农业大学
- 李周岐, 邱明光, 杨秀平(1995). 河北杨体细胞抗盐性变异系氨基酸组分变异性分析. 陕西林业科技, (3): 7~10
- 刘海学, 李雪松, 苏明, 刘鹏, 刘海臣(2008). 向日葵耐盐突变体筛选. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 23 (2): 161~163
- 马锋旺, 李嘉瑞(1998). 山杏原生质体培养再生植株. 园艺学报, 25 (3): 224~229
- 马锋旺, 张军科, 李嘉瑞(1999). 杏离体繁殖的研究. 西北农业大学学报, 27 (4): 12~15
- 阮先乐, 王红星, 陈龙, 张杰(2009). 园艺植物耐盐细胞突变体的筛选和鉴定. 植物生理学通讯, 45 (11): 1115~1117
- 覃兰英, 姚砚武(1994). 杏砧木的组织培养. 植物生理学通讯, 30 (5): 354~355
- 王鸿(2005). 杏的再生体系建立研究[学位论文]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学
- 王玖瑞, 吕增仁, 李春立(2000). 杏组织培养研究进展. 河北果树, (2): 6~7
- 韦小敏, 王鹏, 季良越, 胡彦民(2007). 玉米耐盐愈伤组织变异体的筛选及生理特性分析. 华北农学报, 22 (3): 137~140
- 杨升, 张华新, 张丽(2010). 植物耐盐生理生化指标及耐盐植物筛选综述. 西北林学院学报, 25 (3): 59~65
- 周立名, 王飞, 王佳(2009). EMS诱变处理定向筛选猕猴桃耐盐突变体研究. 西北农业学报, 18 (5): 330~335, 340
- 周玲艳, 秦华明, 赖幸韵, 陈楚欢, 梁红(2009). 猕猴桃实生苗再生体系的建立. 广西植物, 29 (4): 514~517
- 朱广康, 钟海文, 张爱琴(1990). 植物生理学实验. 北京: 北京大学出版社
- Miguel CM, Oliverira MM (1999). Transgenic almond (*Prunus dulcis* Mill.) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf explants. Plant Cell Rep, 18: 387~393
- Perez-Tornero O, Egea J, Vanoostende A, Burgos L (2000). Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. Plant Sci, 158: 61~70