

# 悬铃木下胚轴及叶片再生不定芽的影响因素分析

刘国锋，包满珠<sup>\*</sup>

(华中农业大学园艺林学院，园艺植物生物学教育部重点实验室，武汉 430070)

**摘要：**以悬铃木的下胚轴和离体叶片为材料，研究了基因型、植物生长调节剂、光照条件、外植体部位等因素对其不定芽分化的影响。结果表明：1) 6-BA与BA的浓度比对下胚轴不定芽的分化影响较大，以6-BA/BA小于20/1较为合适；而叶片的不定芽再生受基因型的影响显著，在4种供试材料中，PH2的再生能力最强，但0.1~1.0 mg·L<sup>-1</sup> TDZ不利于其不定芽再生。2) 黑暗培养对下胚轴的不定芽分化有一定的促进作用，但不利于叶片的不定芽再生，50~100 lx的弱光有利于叶片的不定芽分化。3) 不同部位的下胚轴切段及叶片的再生能力差异显著，其中靠近子叶的下胚轴切段和试管苗顶端的2枚叶片再生能力较强。此外，刻伤叶片的再生效果明显优于叶片切块，说明悬铃木的叶片与下胚轴的离体培养存在明显的生物全息现象。

**关键词：**悬铃木；叶片；下胚轴；不定芽分化；组织培养；全息现象

**中图分类号：**S 687.1   **文献标识码：**A   **文章编号：**0513-353X (2009) 03-0399-06

## Factors Affecting Shoot Regeneration from Leaf and Hypocotyl Explants of *Platanus acerifolia* Willd

LIU Guo-feng and BAO Man-zhu<sup>\*</sup>

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Effects of different genotypes, PGRs, illumination conditions and position of explants on adventitious shoot regeneration from hypocotyl and/or leaf of *Platanus acerifolia* were investigated. The results indicated that the ratio of 6-BA to BA in the medium influenced shoot regeneration of hypocotyl segments and 6-BA/BA < 20/1 gave a better effect; Shoot regeneration from leaf explants was significantly different among four different genotypes investigated, with the highest regeneration rate obtained for leaf explants of genotype PH2, and TDZ was less effective than 6-BA to induce shoot regeneration from PH2 leaves. Maintaining the cultures in darkness for the first month promoted shoot regeneration of hypocotyl explants to some extent, but leaves incubated in darkness regenerated less shoots evidently; Light intensity of 50~100 lx was favorable to shoot regeneration. Significant differences of regeneration capability existed among different sections of hypocotyl and position of leaves, and the hypocotyl section adjacent to the cotyledons and the uppermost two leaves of the shoots showed better regeneration capability than the lower sections and leaves. Furthermore, shoot regeneration of the intact leaves wounded by three cuts was more efficient than that of severed leaf segments, indicating that the ECW/O/holographic phenomenon existed during *in vitro* culture of hypocotyls and leaves of *P. acerifolia*.

**Key words:** *Platanus acerifolia*; leaf explant; hypocotyl explant; shoot regeneration; tissue culture; holographic phenomenon

收稿日期：2008-10-08；修回日期：2009-02-20

基金项目：国家自然科学基金项目（30371015, 30500394）

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

悬铃木 (*Platanus acerifolia* Willd.) 在全球范围内被广泛用作行道树和庭荫树。针对悬铃木落果飞毛问题, 园林科研工作者先后从诱变育种、修剪控果、选育少果品系等多方面展开了研究, 但至今仍未能从根本上解决问题。近年来, 通过转基因创造不育已经成功地应用于多种植物 (Brunner et al., 2007), 该技术为无果(毛) 悬铃木的培育提供了快捷、可靠的途径。

本实验室分别以二球悬铃木的下胚轴和叶片作外植体, 成功地建立了其植株再生体系 (Liu et al., 2002; Liu & Bao, 2003); 最近又建立了二球悬铃木的遗传转化技术体系 (Li et al., 2007)。另外, 王磊等 (2004)、李红双等 (2006) 也分别报道了二球悬铃木植株再生体系的建立及遗传转化研究; 范国强等 (2003, 2006) 报道了三球悬铃木的植株再生及遗传转化研究; 邹永梅和施季森 (2005) 报道了一球悬铃木遗传转化体系的建立。尽管目前关于悬铃木的植株再生和遗传转化已有许多篇报道, 但研究仍不系统, 且研究结果存在较大差异, 转化效率低。为此, 作者在已建立的再生体系基础上, 进一步探讨植物生长调节剂、光照、外植体部位、基因型等多种因素对悬铃木下胚轴和叶片再生不定芽的影响, 旨在完善并建立高效的悬铃木再生体系, 为提高其转化效率奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

悬铃木的种子采自华中农业大学校园内一株成年优树 (基因型命名为 PC)。2003—2005 年每年 12 月—翌年 1 月期间, 采集成熟球果, 剥离种子并除净种毛, 晾干后 4℃ 低温贮藏备用。

离体叶片取自本实验室增殖保存的试管苗, 包括 4 种不同的基因型 (PC、PH1、PH2 和 PH6), 其中 PC 由优树的柄下芽萌发增殖而来, PH1、PH2 和 PH6 则分别为 3 个不同实生苗的下胚轴经再生扩繁而来的无性系 (Liu et al., 2002)。试管苗于增殖培养基 MS + 6-BA 0.3 (单位: mg·L<sup>-1</sup>, 下同) 中继代保存, 每 2~3 个月继代 1 次。

### 1.2 下胚轴再生不定芽的影响因素试验

种子发芽后, 取长 2~3 cm 的幼苗, 按 Liu 等 (2002) 的方法消毒后将下胚轴切成 5~7 mm 的小段, 用于接种。

下胚轴切段不分部位接种于 6 种不同植物生长调节剂组合 (表 1) 的培养基中, 于 (25 ±1)℃ 条件下培养。设光照培养 (光照强度 1 000~1 200 lx, 每天光照 14 h) 和先黑暗培养 1 个月再转到光下培养两种处理。

将下胚轴分成上 (靠近胚芽)、中、下 (靠近胚根) 3 个区段, 分别接种于 MS + 6-BA 4.0 + BA 0.5 诱导培养基 (Liu et al., 2002), 于 (25 ±1)℃、光照条件下培养。

培养基中均添加 3% 的蔗糖, 7 g·L<sup>-1</sup> 琼脂粉, pH 值调至 5.8~6.0, 于 121℃, 1.1 kg·cm<sup>-2</sup> 压力下灭菌 20 min (下同)。每处理接种 5 个培养皿, 每皿接入 10 个外植体; 定期观察, 2 个月后统计结果; 试验重复 2 次。

### 1.3 叶片再生不定芽的影响因素试验

基因型: 在无菌条件下剪取 PC、PH1、PH2 和 PH6 的 2 月龄试管苗顶部 3~4 枚完全展开的叶片, 切去叶尖和叶柄, 并用锋利刀片于叶背垂直主脉方向均匀割划 3~4 刀 (不切断叶片), 分别接种于 MS + 6-BA 6.0 + BA 0.5 诱导培养基 (Liu & Bao, 2003), 于 (25 ±1)℃、弱光条件 (50~100 lx, 14 h·d<sup>-1</sup>) 下培养。每处理接种 6 个培养皿, 每皿接入 10 个外植体; 定期观察, 2 个月后统计结果; 试验重复 2 次; 下同。

光照强度: 根据不同基因型的试验结果, 选择再生效果好的 PH2 为材料 (下同), 将其 2 月龄试管苗的叶片割伤后接种于 MS + 6-BA 6.0 + BA 0.5, 分别置于黑暗 (0 lx)、弱光 (50~100 lx)、正常光 (1 000~1 500 lx)、强光 (2 000~2 500 lx) 下, (25 ±1)℃ 培养。

叶片着生部位: 取 PH2试管苗顶部完全展开的4枚叶片, 割伤后按由上往下的着生次序(即第1、第2、第3和第4叶)依次接种于编号为1、2、3、4的培养皿中(培养基为MS+6·BA 6.0+BA 0.5), 每培养皿接种10个着生部位相同的叶片; (25±1)℃、弱光条件下培养。

叶片切割方式: 以PH2为材料, 采用割伤(同上)和切块(将叶片切成完全分开的3~4段)处理叶片后, 分别接种于诱导培养基MS+6·BA 6.0+BA 0.5; (25±1)℃、弱光条件下培养。

TDZ以PH2为试料, 将其叶片刻伤后分别接种于含有不同浓度TDZ(0.1, 0.5, 1.0 mg·L<sup>-1</sup>)与BA(0, 0.5 mg·L<sup>-1</sup>)组合的MS培养基, 定期观察叶片生长及不定芽的诱导情况。

#### 1.4 数据统计与分析

培养2个月后, 对不同处理按每个培养皿(看作1个重复)统计不定芽的诱导率(再生不定芽的外植体数/外植体总数×100%), 以及平均每外植体诱导芽丛数(诱导芽丛数/诱导出芽外植体数)。所得数据采用SAS软件进行方差分析和多重比较分析(Duncan's法)。百分数和计数数据分别经反正弦( $y = \arcsin x^{1/2}$ )和对数[ $y = \lg(x + 1)$ ]转换后, 再进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 影响悬铃木下胚轴不定芽再生的因素

2.1.1 植物生长调节剂配比与光照条件 试验结果(表1)表明, 在光下培养, 添加不同浓度6·BA和BA的培养基中下胚轴的不定芽再生差异明显, 最高和最低再生频率分别为45.0% (图版, A)和13.3%。其中当6·BA浓度一定时, BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>比0.1 mg·L<sup>-1</sup>更有利于不定芽分化, 且随着6·BA浓度升高, 表现更为明显; 6·BA浓度增加时, 不定芽的诱导率趋于下降, 且当BA浓度相对较低(0.1 mg·L<sup>-1</sup>)时表现更为明显。当6·BA/BA小于20/1时不定芽的诱导率变化不大, 而当超过40/1时诱导率显著下降。不同6·BA与BA配比对平均每外植体再生芽丛数的影响相对较小。

先黑暗培养1个月再转至光下培养可明显改善下胚轴的不定芽分化, 在6种测试培养基中, 4种培养基上存在显著差异; 但黑暗培养对每外植体的出芽数并无显著影响。经过1个月的黑暗培养, 不同植物生长调节剂配比间的差异由显著变为不显著, 不定芽的诱导率均超过40%。

表1 不同6·BA与IBA配比和光照条件对悬铃木下胚轴不定芽再生的影响

Table 1 Influences of 6·BA and IBA combinations and illumination conditions on shoot regeneration from hypocotyl explants of *P. acerifolia*

光照条件 Light condition	生长调节剂组合/(mg·L <sup>-1</sup> ) PGR combination		不定芽再生频率/% Frequency of shoot regeneration	平均每外植体出芽丛数 No. of shoots per regenerating explant
	6·BA	BA		
光照 Light	2.0	0.1	32.6 ±4.8 ba*	2.6 ±0.3 ba
		0.5	45.0 ±6.4 a	2.3 ±0.3 ba
		0.1	21.7 ±4.8 cb*	3.0 ±0.3 a
		0.5	30.0 ±4.1 ba*	2.5 ±0.4 ba
		0.1	13.3 ±2.5 c*	2.2 ±0.1 ba
	6.0	0.5	31.7 ±6.3 ba	1.9 ±0.2 b
		0.1	48.0 ±3.7 a	2.7 ±0.3 a
		0.5	56.0 ±5.1 a	2.5 ±0.4 a
		0.1	41.7 ±4.0 a	3.3 ±0.4 a
		0.5	53.3 ±4.2 a	2.5 ±0.3 a
黑暗 光照 Dark Light	2.0	0.1	41.7 ±3.1 a	2.4 ±0.4 a
		0.5	45.0 ±7.6 a	2.3 ±0.2 a

注: 表中数据为平均值±标准误; 相同培养条件下同一栏中不同英文字母表示数据间差异显著( $P=0.05$ ); \*表示不同光照条件之间存在显著差异( $P=0.05$ )。

Note: Values represent the means ±SE. Means followed by different letters within the same column of same light condition are significantly different at  $P=0.05$ ; \* indicates significant differences between light conditions at  $P=0.05$ .

2.1.2 下胚轴部位 如表2所示，下胚轴上部切段再生能力最强，出芽率为50%，平均每外植体出芽2~3丛（图版，B）；下部切段再生能力最差；中部切段介于两者之间。

## 2.2 影响悬铃木叶片不定芽再生的因素

2.2.1 基因型 表3表明，不同基因型间的再生频率及平均每叶片出芽数均达到极显著差异（ $P < 0.001$ ），其中PH2的再生能力最强，其次为PH6，PH1和PC最低。

2.2.2 光照条件 叶片在弱光（50~100 lx）下培养再生效果最佳（表4；图版，C）；随光照增强再生频率急剧下降，光照达2 000~2 500 lx时叶片基本丧失再生能力（图版，D）；黑暗中叶片的再生频率与正常光下没有显著差异，但正常光下叶片生长缓慢，并在培养初期形成大量花青素，然后在切口部位（尤其是主脉处）形成一些致密的绿色愈伤组织，不定芽分化相对较晚；黑暗中叶片膨大迅速并形成较多的淡黄近白色疏松愈伤，不定芽的分化较早。

2.2.3 叶片着生部位 位于试管苗顶端的2枚叶片再生能力最强（表5），然后依次为第3和第4叶（图版，E），即着生部位越低再生能力越差。

2.2.4 叶片切割方式 采用刻伤处理的叶片不定芽的诱导率在70%以上，平均每外植体出芽3~4丛；而完全切断的叶块的不定芽诱导率仅为20%左右，平均每外植体出芽1~2丛（图版，F）。可见，将悬铃木的叶片切成多块对再生十分不利。

2.2.5 TDZ含1.0 mg·L<sup>-1</sup> TDZ以及0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA的培养基均可诱导部分叶片形成不定芽，但分化频率很低（6.7%~20%），不定芽多呈畸形，或难以继续生长成正常小苗；培养1个月后，多数培养基中的外植体逐渐发黑，呈水渍状死亡，且TDZ浓度越高，表现越明显。

## 3 讨论

本研究结果表明，除植物生长调节剂配比外，光照对悬铃木下胚轴不定芽分化也有较大影响。一般认为暗处理可减少外植体酚类物质的释放，从而利于不定芽分化。本研究中当植物生长调节剂配比不利于下胚轴分化芽时，先黑暗培养1个月可以显著提高不定芽的分化频率；而当芽的诱导率相对较高（>30%）时，黑暗培养对不定芽的分化却没有显著影响，可能是因为其分化频率已接近上限。

基因型是影响悬铃木叶片再生的关键因素，本研究中4种遗传背景不同的材料中仅PH2的再生效果相对较好（表3）。叶片的着生部位也很重要，其中处于试管苗顶端的第1枚叶片最容易分化不

表2 不同部位下胚轴切段不定芽再生能力的差异  
Table 2 Differences of shoot regeneration capability of different position of hypocotyl segments

下胚轴部位 Position of hypocotyl section	再生频率 / % Frequency of shoot regeneration	平均每外植体出芽丛数 Number of shoots per regenerating explant
上部 Upper	50.0 ±4.5 a	2.6 ±0.2 a
中部 Middle	30.0 ±3.2 b	1.7 ±0.2 b
下部 Lower	10.0 ±3.2 c	1.3 ±0.2 b

表3 不同基因型对悬铃木叶片不定芽再生的影响  
Table 3 Effect of different genotypes on shoot regeneration from leaves of *P. acerifolia*

基因型 Genotype	再生频率 / % Frequency of shoot regeneration	平均每叶片出芽丛数 Number of shoots per regenerating leaf
PH1	10.0 ±3.7 c	1.4 ±0.2 c
PH2	75.0 ±4.3 a	3.5 ±0.3 a
PH6	41.7 ±5.4 b	2.2 ±0.2 b
PC	6.7 ±3.3 c	1.3 ±0.2 c

表4 不同光照强度对悬铃木叶片不定芽再生的影响  
Table 4 Effect of light intensity on shoot regeneration from leaves of *P. acerifolia*

光照强度 / lx Light intensity	再生频率 / % Frequency of shoot regeneration	平均每叶片出芽丛数 Number of shoots per regenerating leaf
黑暗 Dark	33.3 ±3.4 b	2.1 ±0.2 b
50~100	72.5 ±4.8 a	3.4 ±0.4 a
1 000~1 500	21.4 ±4.7 b	3.1 ±0.5 a
2 000~2 500	6.3 ±3.8 c	1.0 ±0.0 c

表5 着生部位对悬铃木叶片不定芽再生的影响  
Table 5 Effect of different positions of leaves on shoot regeneration in *P. acerifolia*

叶片着生次序 Position of leaves	再生频率 / % Frequency of shoot regeneration	平均每叶片出芽丛数 Number of shoots per regenerating leaf
第1叶 First leaf	93.3 ±3.3 a	4.3 ±0.4 a
第2叶 Second leaf	85.0 ±6.2 a	4.2 ±0.6 ab
第3叶 Third leaf	66.7 ±4.9 b	3.2 ±0.5 ab
第4叶 Fourth leaf	46.7 ±4.2 c	2.7 ±0.4 b

定芽，这是因为位于植株上部的叶片仍处于生长阶段，细胞分裂活跃，对离体诱导的反应比较敏感，而下部的叶片已基本停止生长，对离体诱导的反应迟钝。然而，饶红宇（2000）在杨树研究中发现下部（第4、5枚）叶片的分化频率较高，说明不同物种间存在差异。光照条件同样有着重要的影响，强光不仅不利于芽的分化，而且会抑制愈伤组织的形成与生长，这与 Yepes和 Aldwinckle（1994）在研究苹果叶片再生时的报道是一致的。

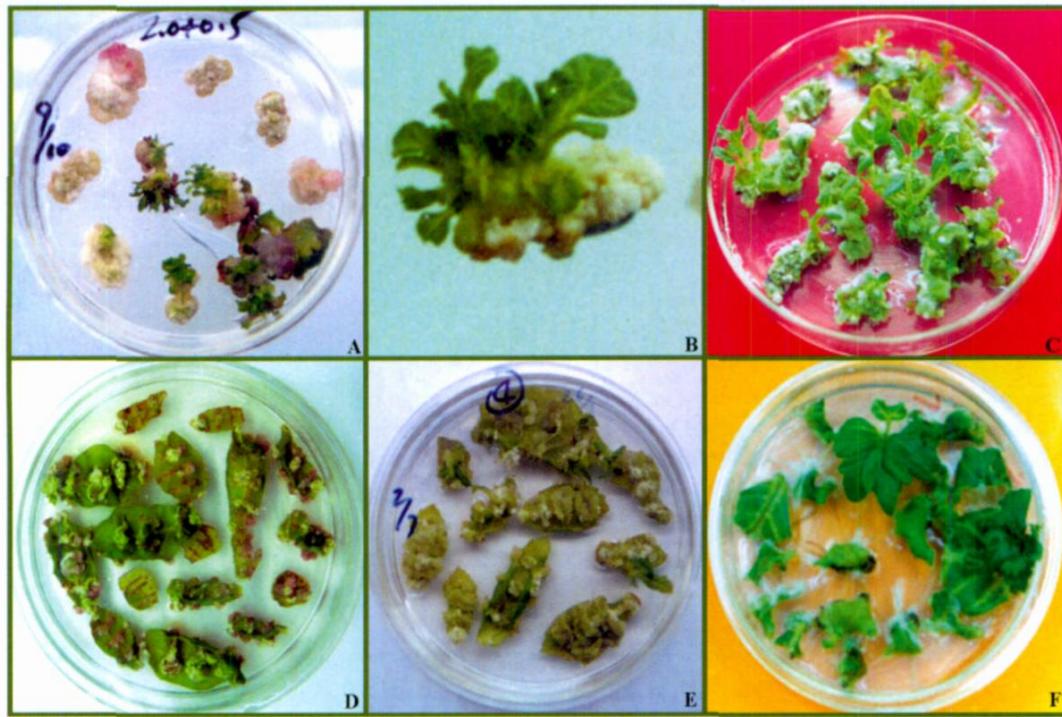
据 Huetteman 和 Preece（1993）报道，TDZ是木本植物离体培养中活性最强的细胞分裂素类似物质，但本研究表明 TDZ并不适宜于悬铃木叶片的植株再生。邹永梅和施季森（2005）在进行一球悬铃木叶片不定芽分化研究时也发现，TDZ不管是单独作为细胞分裂素使用还是与 6-BA合用，均不能促进不定芽分化；Pawlicki 和 Welander（1994）、Caboni 等（1999）也曾分别报道 TDZ对部分苹果品种和野生梨的离体再生表现不利，说明 TDZ并非对所有木本植物均能表现出良好的离体诱导效果。

倪德祥（1986）、汤朝起等（1996）、陈火英等（1999）、周根余等（2000）、宋英今等（2007）先后以大蒜鳞茎、黄瓜子叶、番茄下胚轴、洋桔梗叶片和生菜子叶为外植体，证实了组织培养过程中器官形态发生的生物全息律。本研究结果显示，悬铃木下胚轴从上到下各段的不定芽诱导能力依次减小（表2），这种梯度变化与陈火英等（1999）用番茄下胚轴培养时所得的规律一致，体现了生物全息律的全息对应关系；在悬铃木的叶片培养中，刻伤的叶片比切块具有更强的再生能力，而且无论是刻伤还是切段的叶片，不定芽的再生主要发生在外植体的近基端（即刻伤叶片的基部和叶片切块的下段），这也是生物全息律的重要体现。根据全息胚学说，叶片切段后，任何一段都是一个全息胚，它们的生理生化特性应和整体相对应；且全息胚的级越低，独立性越大，与整体的联系就越小，器官再生就越困难。

## References

- Brunner A M, Li J, DiFazio S P, Shevchenko O, Montgomery B E, Mohamed R, Wei H, Ma C, Elias A A, van Wommer K, Strauss S H. 2007. Genetic containment of forest plantations. *Tree Genetics & Genomes*, 3 (2): 75 - 100.
- Caboni E, Tonelli M G, Lauri P, Angeli S D, Damiano C. 1999. In vitro shoot regeneration from leaves of wild pear. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 59: 1 - 7.
- Chen Huo-ying, Zhang Jian-hua, Xiong Chang-hai, Chen Yun-peng. 1999. Holographic phenomenon in organogenesis of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hypocotyl *in vitro* culture. *Acta Agriculturae Shanghai*, 15 (3): 24 - 27. (in Chinese)
- 陈火英, 张建华, 熊昌海, 陈云鹏. 1999. 番茄下胚轴组培中器官发生的全息现象. 上海农业学报, 15 (3): 24 - 27.
- Fan Guo-qiang, Jiang Jian-ping, He Yao-qing, Li Feng. 2003. In vitro efficient plant regeneration with *Platanus orientalis* L. leaves as explants. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (2): 236 - 238. (in Chinese)
- 范国强, 蒋建平, 贺窑青, 李 锋. 2003. 悬铃木叶片植株再生系统的建立. 园艺学报, 30 (2): 236 - 238.
- Fan Guo-qiang, Zhao Zhen-li, Cao Yan-chun. 2006. Optimization of genetic transformation system in *Platanus orientalis* L. by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Henan Agricultural University*, 40 (4): 359 - 374. (in Chinese)
- 范国强, 赵振利, 曹艳春. 2006. 根癌农杆菌介导的悬铃木叶片遗传转化体系研究. 河南农业大学学报, 40 (4): 359 - 374.
- Huetteman C A, Preece J E. 1993. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant cell tissue culture. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 33: 105 - 121.
- Li Hong-shuang, Wang Lei, Su Hong-yan, Cui De-cai. 2006. Transformation of *Platanus acerifolia* Willd with antisense-PLD gene. *J Shandong Agricultural University: Natural Science Edition*, 37 (4): 546 - 552. (in Chinese)
- 李红双, 王 磊, 宿红艳, 崔德才. 2006. 反义磷脂酶 D 基因转化悬铃木的研究. 山东农业大学学报: 自然科学版, 37 (4): 546 - 552.
- Li ZN, Fang F, Liu G F, Bao M Z. 2007. Stable *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of London plane tree (*Platanus acerifolia* Willd.). *Plant Cell Rep*, 26: 641 - 650.
- Liu G F, Huang J, Cheng L Q, Bao M Z. 2002. Plant regeneration from excised hypocotyl explants of *Platanus acerifolia* Willd. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 38 (6): 1 - 6.
- Liu G F, Bao M Z. 2003. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of London plane tree (*Platanus acerifolia* Willd.). *Plant Cell Rep*, 21: 640 - 644.
- Ni De-xiang. 1986. The studies of bio-holographic phenomenon in morphogenesis of plant organ *in vitro*. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2 (1): 27 - 32. (in Chinese)
- 倪德祥. 1986. 植物离体器官形态发生中的生物全息现象. 上海农业学报, 2 (1): 27 - 32.

- Pawlaki G, Welander M. 1994. Adventitious shoot regeneration from leaf segments of *in vitro* cultured shoots of the apple rootstock 'Jork 9'. *J Hort Sci*, 69 (4): 687 - 696.
- Rao Hong-yu. 2000. Study on the transformation of poplar with the divalent insect-resistant genes [Ph D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Forestry University.
- 饶红宇. 2000. 双价抗虫基因转化杨树的研究 [博士论文]. 南京: 南京林业大学.
- Song Ying-jin, Ji Jing, Liu Hai-xue, Wang Gang. 2007. Research on tissue culture and the holographic phenomenon of *Lactuca sativa* var *capitata* L. *Northem Horticulture*, 31 (1): 142 - 144. (in Chinese)
- 宋英今, 季 静, 刘海学, 王 罂. 2007. 生菜子叶组织培养及全息现象的研究. 北方园艺, 31 (1): 142 - 144.
- Tang Zhao-qi, Wang Qi, Cen Yi-qun, Jiang Ru-min, Ni De-xiang. 1996. The holographic phenomenon in organogenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledon *in vitro* culture. *J Fudan University: Natural Science Edition*, 35 (2): 183 - 188. (in Chinese)
- 汤朝起, 王 琦, 岑益群, 蒋如敏, 倪德祥. 1996. 黄瓜子叶组培中器官发生的全息现象. 复旦学报: 自然科学版, 35 (2): 183 - 188.
- Wang Lei, Li Hong-shuang, Lin Na, Cui De-cai. 2004. Establishment of leaf regeneration system in *Platanus acerifolia*. *Scientia Silvae Sinicae*, 40 (1): 58 - 63. (in Chinese)
- 王 磊, 李红双, 林 娜, 崔德才. 2004. 悬铃木叶片再生体系的建立. 林业科学, 40 (1): 58 - 63.
- Yepes L M, Aldwinckle H S. 1994. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 37: 257 - 269.
- Zhou Gen-yu, Shen Guang-hua, Cheng Lei. 2000. The holographic phenomenon of *Eustamia grandiflora* leaf culture *in vitro*. *Plant Physiol Communications*, 36 (3): 212 - 216. (in Chinese)
- 周根余, 沈光华, 程 磊. 2000. 洋桔梗叶片培养中的全息现象 (简报). 植物生理学通讯, 36 (3): 212 - 216.
- Zou Yong-mei, Shi Ji-sen. 2005. Establishment of high frequency regeneration system of adventitious bud of *Platanus occidentalis* Linn. *J Nanjing Forestry University: Natural Science Edition*, 29 (4): 15 - 19. (in Chinese)
- 邹永梅, 施季森. 2005. 北美一球悬铃木高效遗传转化体系的建立. 南京林业大学学报: 自然科学版, 29 (4): 15 - 19.



图版说明: A、B. 悬铃木下胚轴切段的不定芽再生 ( $MS + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA}$ )；C、D.  $50 \sim 100 \text{ lx}$  (C) 和  $2000 \sim 2500 \text{ lx}$  (D) 条件下叶片的离体培养 ( $MS + 6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA}$ )；E. 试管苗第4叶片的不定芽再生；F. 叶片切块的不定芽再生。

**Explanation of plates:** A, B. Shoot regeneration from hypocotyl segments of *Platanus acerifolia*, after 50 d of cultivation on  $MS + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA}$ ; C, D. Leaf explants cultured on  $MS + 6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA}$  under light intensity of  $50 - 100 \text{ lx}$  (C) and  $2000 - 2500 \text{ lx}$  (D) for 60 d; E. Shoot regeneration of the fourth leaf on  $MS + 6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA}$ ; F. Shoot regeneration of leaf segments cultured on  $MS + 6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA}$  under low light intensity ( $50 - 100 \text{ lx}$ ).