

无性繁殖植株的生理年龄—— 由端粒长度引发的思考

王钦美^{1,2}, 张志宏^{1*}, 崔建国²

(1. 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学林学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要:植物细胞中端粒长度随年龄的变化远比动物复杂,可分为不变组、延长组、缩短组和循环变化组。尽管如此,端粒长度亦可用于预测植物年龄。在植物组织培养过程中,端粒长度也会变化。故无性繁殖植株生理年龄值得思考和研究。本文基于端粒长度探讨了无性繁殖植株生理年龄。认为生理年龄较老供体可能会无性繁殖出“小老头”无性系,端粒长度可能成为预测植物材料无性繁殖能力和愈伤组织再分化能力的有效新指标,老树复幼和端粒长度的关系是一个很好的研究课题。此外,提出了植物愈伤组织需要足够的时间来抹除外植体“痕迹”的新观点。关于植物无性繁殖过程中的端粒长度,有很多问题亟待研究和探索。

关键词:端粒;离体快速繁殖;扦插;嫁接;生理年龄

中图分类号:S722.3

文献标识码:A

文章编号:1001-1498(2017)05-0866-05

The Physiological Age of Asexual Plants ——Thinking Arise from Telomere Length

WANG Qin-mei^{1,2}, ZHANG Zhi-hong¹, CUI Jian-guo²

(1. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China;

2. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China)

Abstract: The change of telomere length during aging of plant cells has been found to be much more complicated than that in animals. It can be divided into the invariant group, the prolongation group, the shortening group and the circle change group. Nevertheless, the age of plants can also be predicted based on telomere length. Moreover, the telomere length can change during plant tissue culture. Thus, the physiological age of asexual plants is worth to be studied. In the article, the physiological age of asexual plants is discussed based on telomere length. It is concluded that the older donor might produce clone with small body but old physiological age, telomere length might be a novel reliable indicator for assessment the ability of both asexual propagation and callus redifferentiation of plants, the relationship between old-tree reinvigoration and telomere length might be a good research project. Furthermore, it is proposed that plant calli need enough time to erase the traces of the explants. Many problems about the telomere length during asexual propagation of plants are urgent to be researched and explored.

Keywords: telomere; *in vitro* rapid propagation; cutting; grafting; physiological age

收稿日期: 2016-02-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31600546)、中国博士后科学基金项目(2015M571330)、辽宁省教育厅一般项目(L2015487)、沈阳农业大学教师青年科研基金项目(20131002)、沈阳农业大学教学研究项目(2016-107)。

作者简介: 王钦美, 博士, 硕士研究生导师。主要研究方向: 林木遗传育种。E-mail: wqmw@126.com 地址: 110866, 辽宁省沈阳市沈河区东陵路120号。

* 通讯作者: 张志宏, 教授, 博士研究生导师。主要研究方向: 果树分子生物学。E-mail: zhang_sau@163.com 地址: 110866, 辽宁省沈阳市沈河区东陵路120号。

端粒是位于真核生物染色体末端的核蛋白结构,它由端粒 DNA 重复序列、组蛋白八聚体和蛋白端粒帽子共同形成^[1-2]。大多数陆生植物的端粒 DNA 是拟南芥式的 7 核苷酸重复 (TTTAGGG)_n^[3],但是也有人类似式重复等很多例外情况存在(表 1)^[2]。端粒能够保护线性染色体不被内源核酸酶损伤,避免线性染色体被误识为未配对的染色体断片^[2];端粒与细胞分裂、细胞衰老及寿命有着密切的联系^[4]。在人类^[5-6]和澳大利亚海狮等动物体细胞中^[7-9],端粒随 DNA 复制和细胞分裂次数的增加而缩短。当端粒短到一定程度,细胞进入衰老期^[10]。因此,人类和动物体细胞的端粒缩短被认为是老化的指标。虽然在大麦^[11]和人参^[9]等植物中也检测到年龄和端粒长度呈显著相关^[4],但是植物中端粒长度和年龄的关系却远比动物复杂得多。随着植物年龄的增长和发育的进行,有些物种有些部位的端粒长度呈延长趋势、有些缩短、有些基本不变,甚至有些呈现周期性变化(表 2)。总之,不同植物物种、同一物种不同基因型、同一物种不同组织、同一物种不同分化程度的相同组织、不同环境及生理条件下的相同部位,端粒长度都可能存在差异^[3,9]。尽管如此,针对有些多年生植物物种的研究发现,端粒长度可以用来预测植株的年龄。例如,2015 年 Liang 等人建立了人参年龄和端粒长度相关的数学模型^[9];

表 1 目前发现的陆生植物端粒 DNA 多样性
(非拟南芥式重复)

Table 1 The current knowledge on telomere DNA diversity in land plants
(The non-*Arabidopsis*-type of telomeric repeats)

物种 Species	端粒 DNA 重复单元 Repeat units of telomeric DNA
蒜(<i>Allium sativum</i>)	CTCGGTTATGGG
洋葱(<i>Allium cepa</i>)	CTCGGTTATGGG
琉璃苣(<i>Borago officinalis</i>)	TTAGGG
鸢尾属(<i>Iris</i>)	TTAGGG
矛花属(<i>Doryanthes</i>)	TTTAGGG
蝴蝶兰属(<i>Phalaenopsis</i>)	TTTAGGG
玉米(<i>Zea mays</i>)	TTTAGGG
螺旋狸藻属一种(<i>Genlisea hispida</i>)	TTCAGG
螺旋狸藻属一种(<i>Genlisea nigrocaulis</i>)	TTTTCAGG
番茄(<i>Lycopersicon esculentum</i>)	TTTAGGG
马铃薯(<i>Solanum tuberosum</i>)	TTTAGGG
烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)	TTTAGGG
夜香树属(<i>Cestrum</i>)	TTTTTTAGGG
南芥属(<i>Arabis</i>)	TTTAGGG
松属(<i>Pinus</i>)	TTTAGGG
卷柏属(<i>Selaginella</i>)	TTTAGGG
苔藓(<i>Moss</i>)	TTTAGGG

2015 年刘頔等人建立了油松端粒长度和树龄的相关关系模型^[4]。植物体的端粒调控存在复杂的机制:端粒酶可以在一定程度上维持或者延长端粒 DNA 的长度^[22];在缺乏端粒酶的情况下,端粒可被“依赖于重组的替代机制”所延长^[23];新近研究发现多种表观遗传机制参与了端粒稳定性^[24-25]。可见关于植物端粒长度的维持机制,仍有很多内容有待研究。

表 2 目前发现的植物端粒长度随年龄、发育和细胞分裂的变化情况

Table 2 The current knowledge on telomere length changes in plants during aging, development and cell division

变化趋势分组 Grouping according to changing trend	植株、器官或组织 Plant, organ or tissue
不变组	苹果树 ^[12] 草莓植株 ^[12] 1~200 年生苏格兰松形成层、芽和针叶 ^[13] 番茄叶 ^[14] 女娄菜植株 ^[15] 烟草愈伤组织 ^[16] 白桦树 ^[3]
延长组	银杏叶、愈伤组织 ^[17] 人参根顶端 ^[9] 大麦愈伤培养后期 ^[18] 油松当年生枝条针叶 ^[4] 以女娄菜叶为外植体培养 3 个月的愈伤 ^[19]
缩短组	200 年以上苏格兰松茎形成层 ^[13] 大麦愈伤培养初期 ^[18] 大麦植株 ^[18] 秋季银杏叶 ^[20] 白桦茎形成层(越往树顶越短) ^[3] 白桦组织培养过程中的材料 ^[3]
循环变化组	刺果松针叶 ^[21]

植物离体快速繁殖,即植物组织培养,是植物无性繁殖的典范。它是利用植物细胞的全能性,在无菌条件下,对离体的植物器官、组织、细胞及原生质体进行培养,以获得完整植株的技术。尽管体细胞无性系变异广泛存在^[26-29],较之有性繁殖技术,植物组织培养技术具备繁殖速度快,繁殖植株能在更大程度上保持母株的优良性状等诸多优点^[26]。在林业领域,植物离体快速繁殖具备更加重要的意义。因为林木通常具备生长周期长、子代性状分离显著等特点。一旦发现优良单株,比如杂种优势成年优株,利用离体快速繁殖可以实现短期繁殖大量优良植株的目的。值得注意的是,2014 年 Aronen 和 Ryyänen 研究发现随着白桦愈伤组织离体培养时间的延长,其端粒长度呈逐渐缩短的趋势^[3]。又因

为端粒长度也可以用于预测植物细胞的分裂能力和植株的年龄^[4,9,30],所以以上发现引发了我们对于无性繁殖植株生理年龄的思考,本文将围绕端粒长度这条主线探讨无性繁殖植株的生理年龄。

1 端粒长度与“小老头”无性系

研究发现同一植株不同器官的端粒长度有所不同^[3,9,17],那么对于叶片细胞中端粒较短的植株。如果选用叶片作为外植体,叶片再分化产生的愈伤组织再分化产生植株的端粒长度与同等大小的实生苗相比会不会有所变化?愈伤组织可能的高端粒酶活性在一定程度上使端粒的长度有所恢复甚至变得更长^[17-19],那么以叶片为外植体的不经过愈伤的直接器官或直接体细胞胚胎发生植株的端粒长度又会如何呢?如果叶片产生植株端粒长度比相应的实生苗短,是否证明叶片无性植株的生理年龄老于实生苗?本课题组先前的研究发现以大花君子兰叶片作为外植体,通过直接器官发生路径产生的植株存在生长异常缓慢的现象。这很可能是因为叶片直接发生植株的端粒长度较短、实际生理年龄较老。如果用于无性繁殖的外植体或插条取自百年老树,“小老头”无性系,即表现为“三岁之躯,百岁之身”的无性系,是否真的存在?如果存在,那么这种无性繁殖植株会成为典型“小老头树”且寿命会短于实生苗。

研究发现从生理年龄较老的器官或组织取外植体进行无性繁殖,其后代往往存在早衰或优势衰退甚至丧失等现象,但是从接近根际部位或生理年龄较小的器官或组织取外植体获得无性系较容易保持母株优良性状,无性系苗木生长健壮、生机盎然^[31]。由于一般树木接近根际部位的茎干形成层的端粒长度较长^[3,13]。所以推测较长的端粒赋予植物更佳的无性繁殖表现。这也证明由端粒长度预测细胞增殖能力和无性繁殖表现的可行性。然而,经过愈伤阶段的间接器官/体细胞胚胎发生可能会是特例。因为已有研究证明合适的离体培养条件会使愈伤细胞的端粒长度延长至大于外植体细胞端粒的长度^[17-19]。愈伤组织特有的端粒延长机制,恰恰解释了为什么植物的分化外植体能够返老还童式地再生出大量看似幼嫩的植株。

豆科固氮速生丰产树种马占相思(*Acacia mangium* Willd.)的叶子具备二型性^[32]。幼龄植株首先产生小叶数不同的复叶,然后产生中间过渡类型的叶状柄,之后产生的为完全叶状柄。完全叶状柄被认为是马占相思植株成熟的标志,而复叶被认为是

马占相思幼龄的标志^[32-33]。研究发现取自幼龄马占相思植株的茎外植体产生的幼龄形态的试管苗比例明显高于成龄植株外植体产生的试管苗;成龄茎外植体也可产生幼龄形态试管苗,但其产生试管苗多数具备成龄形态的叶状柄^[32]。可能因为具备成龄特征试管苗的生理年龄大于具备幼龄特征的试管苗和实生苗的生理年龄。推测成龄茎外植体的叶腋分生组织端粒长度可能短于幼龄外植体,从而致使老龄外植体产生的试管苗多数具备成龄树的特征——叶状柄。因此,可以认为具备成龄形态叶状柄的马占相思试管苗生理年龄较老,为“三岁之躯,百岁之身”的典范。比较研究马占相思幼龄特征试管苗和成龄特征试管苗的寿命、端粒长度以及两种叶子和外植体的端粒长度是很有必要的。

老树树干形成层端粒越往上越短^[3,13],越接近树干基部的枝条扦插通常越容易生根^[34]。那么是否可以认为树干较上位置的侧枝扦插得到的植株的生理年龄较老?推测这类扦插繁殖植株的生理年龄大于同等大小的实生苗。以上证据仍然支持“三岁之躯,百岁之身”。

总之,生理年龄较老的植物材料作为无性繁殖的供体,不经过愈伤组织阶段产生的无性系的生理年龄可能远远大于同等大小的实生苗。尽管这类无性繁殖植株在初期看上去也是“娇小”如童,但是从生理上来讲它们可能已算“百岁老人”!

2 端粒长度与外植体无性繁殖能力

Liang 等人建立了人参年龄和端粒长度相关的数学模型。根据此模型,可由人参主根上部的端粒长度预测人参年龄^[9]。那么是否可以由端粒长度预测植物材料的无性繁殖能力呢?报道显示欧洲赤松和白桦树干下端形成层端粒长度长^[3,13];树干下端枝用做插穗生根率相对较高^[34];越老的组织用于做外植体,离体再生能力越弱^[28];很多植物的端粒长度随年龄和发育的进行而变化^[4,9]。以上发现证明端粒长度可以反映植物/细胞的生理年龄,而植物材料/细胞的生理年龄又可以决定其无性繁殖能力。所以推测植物材料/细胞的端粒长度很可能成为预测其无性繁殖能力的有效新指标。

3 端粒长度与愈伤组织再分化潜能

研究发现大麦的端粒随着分化而逐渐缩短,但是在大麦愈伤组织培养初期端粒缩短,之后又逐渐延长^[18]。此外,几乎所有植物的愈伤组织都要在培

养一段时间之后才能分化^[26,29]。这证明愈伤组织端粒长度很可能是愈伤再分化的限制因子之一。合适的愈伤培养时间使细胞有足够的机会延长端粒、降低生理年龄,进而为再分化做好准备。因此在具体实验过程中,应该选用端粒较长的愈伤组织用于诱导出芽。如果以上推论成立,愈伤端粒长度也将成为评判愈伤再分化能力的有效新指标。

研究发现可可再生植株叶片的甲基化状态处于外植体供体植株叶片和雄蕊(外植体)之间。随着愈伤组织培养时间的延长,愈伤再生植株叶片的甲基化状态和 SSR 标记逐渐接近供体植株叶片^[35]。即短期培养愈伤给出的无性植株的体细胞无性系变异频率高,长期培养愈伤给出的植株的体细胞无性系变异频率反而低。有报道显示在端粒长度与生理年龄负相关的大麦愈伤组织培养初期端粒长度变短,而后随着培养时间的延长端粒又逐渐变长^[18]。如果以上关于端粒长度和体细胞无性系变异的两项研究发现在植物界较具普遍性,则证明较长端粒对应较低的体细胞无性系变异频率、较短端粒对应较高的体细胞无性系变异频率。因为一般的 DNA 修复系统对端粒序列是无效的,所以端粒缩短也是总体 DNA 损伤积累的感受器^[36]。故推测愈伤组织培养初期的端粒缩短恰恰是 DNA 损伤和体细胞无性系变异积累的体现,而愈伤组织培养后期则相反。从这个角度来讲,愈伤端粒长度的动态变化和愈伤产生植株的体细胞无性系变异情况是相吻合的。虽然前人和课题组前期研究证明植株再生不需要完全精准地模仿植物发育过程^[29],但是以上研究发现证明已经分化的外植体细胞需要足够的时间和细胞分裂次数来尽可能清除以前细胞状态下的“痕迹”(包括端粒长度和甲基化状态)。一定的愈伤培养周期提供了逐步抹除“痕迹”的机会。所以随着愈伤培养时间的延长,痕迹清除越来越彻底,产生的植株也就可能越“保真”了。综上所述,在进行组织培养实验时,应该选择脱分化彻底的、外植体“痕迹”尽可能少的愈伤组织来诱导芽丛或体细胞胚。

4 端粒长度与老树复幼

植物和动物一样,也会成熟和衰老^[36]。但是植物和动物又不同——衰老植物会返老还童,比如老树会通过嫁接复幼^[37]。复幼的老树不仅能恢复幼年期的生长势、外表形态、生理生化状态和细胞调控机制等,而且扦插生根能力也能完全恢复^[38]。可见复幼老树的生理年龄大大降低,那么复幼老树的端粒长度

是否也恢复到幼龄时的状态呢?复幼老树的生理年龄具体又该如何计算呢?如果科学研究确实能够证明复幼老树端粒也恢复到幼龄状态,那么进一步研究比较老树接穗与幼树砧木的端粒长度以及复幼老树的端粒恢复机制,将是很有意思的研究课题。

5 前景和展望

目前关于植物端粒长度和年龄相关的研究报道仍然很有限^[9,36]。很多植物物种,尤其是多年生林木的无性繁殖植株的端粒长度及寿命有待研究。外植体的端粒长度是否可以用于预测再生能力,愈伤组织的端粒长度是否可以预测再分化能力,何时诱导愈伤组织再分化更合适?什么样的愈伤细胞才能成为再分化的感受态细胞?嫁接诱导老树复幼是否与端粒长度的变化有关?组培再生植株的幼龄化表型是否与端粒的长度有关?这些都是亟需研究和解决的科学问题。例如,仅仅对于用叶片作为外植体的离体快速繁殖,就有很多内容是值得研究的(表3)。尤其对于叶片端粒长度与植株其它部位存在明显差异的物种。我们坚信随着高通量测序等实验技术手段的不断进步,这些问题在不久的将来都将被揭晓。

表3 不同材料端粒长度比较可能揭示的内容

Table 3 The substance which might be revealed by comparing telomere length among different materials

用于比较端粒长度的材料 Materials used for comparing length of telomere	拟揭示的内容 Substance to be revealed
细胞全能性叶片 vs. 细胞无全能性叶片	全能性与端粒长度的相关性
外植体叶片 vs. 叶片直接发生植株	端粒长度与直接发生的关系
外植体叶片 vs. 叶片产生愈伤组织	脱分化及愈伤增殖与端粒长度的相关性
叶片产生无分化能力愈伤 vs. 有分化能力愈伤	端粒长度与分化能力的关系
叶片产生玻璃化愈伤 vs. 正常没玻璃化愈伤	愈伤玻璃化与端粒长度的相关性
叶片产生愈伤组织 vs. 叶片间接发生植株	再分化与端粒长度的相关性
外植体叶片 vs. 叶片间接发生植株	外植体对间接植株端粒长度的影响
叶片直接发生植株 vs. 叶片间接发生植株	愈伤阶段对端粒长度的影响
同等发育程度实生苗 vs. 叶片间接发生植株	直接发生植株的生理年龄和预后
同等发育程度实生苗 vs. 叶片直接发生植株	间接发生植株的生理年龄和预后

参考文献:

- [1] 慕莹,赵晓燕,景丹龙,等. 银杏不同组织器官及愈伤组织培养中端粒酶活性测定[J]. 北京林业大学学报, 2014, 36(3): 95

-99.

- [2] Schrupfová P P, Šárka Schorová, Fajkus J. Telomere- and telomerase-associated proteins and their functions in the plant cell[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(188):1-17.
- [3] Aronen T, Ryyänänen L. Silver birch telomeres shorten in tissue culture[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2014, 10(1):67-74.
- [4] 胡旭东, 撒静宜, 要笑云, 等. 油松端粒长度与树龄相关关系研究[J]. *广东农业科学*, 2015, 42(12):61-65.
- [5] Harley C B, Fitcher A B, Greider C W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts[J]. *Nature*, 1990, 345(6274):458-460.
- [6] Hastie N D, Dempster M, Dunlop M G, et al. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing[J]. *Nature*, 1990, 346(6287):866-868.
- [7] Christopher I, Hamer D J, Terry B, et al. Telomere length and age in pinnipeds: The endangered Australian sea lion as a case study [J]. *Marine Mammal Science*, 2011, 27(4):841-851.
- [8] Pauliny A, Wagner R H, Augustin J, et al. Age-independent telomere length predicts fitness in two bird species[J]. *Molecular Ecology*, 2006, 15(6):1681-1687.
- [9] Liang J, Jiang C, Peng H, et al. Analysis of the age of *Panax ginseng* based on telomere length and telomerase activity. [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:7985-7985.
- [10] Vleck C M, Haussmann M F, Vleck D. The natural history of telomeres: tools for aging animals and exploring the aging process. [J]. *Experimental Gerontology*, 2003, 38(7):791-795.
- [11] Kilian A, Stiff C, Kleinhofs A. Barley telomeres shorten during differentiation but grow in callus culture[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92(92):9555-9559.
- [12] Moriguchi R, Kato K, Kanahama K, et al. Analysis of telomere lengths in apple and cherry trees [J]. *Acta Horticulturae*, 2007, 738(738):389-395.
- [13] Aronen T, Ryyänänen L. Variation in telomeric repeats of Scots pine (*Pinus sylvestris*, L.) [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2012, 8(2):267-275.
- [14] Broun P, Ganai M W, Tanksley S D. Telomeric arrays display high levels of heritable polymorphism among closely related plant varieties [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(4):1354-1357.
- [15] Riha K, Fajkus J, Siroky J, et al. Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(10):1691-1698.
- [16] Fajkus J, Fulnecková J, Hulánová M, et al. Plant cells express telomerase activity upon transfer to callus culture, without extensively changing telomere lengths [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1998, 260(5):470-474.
- [17] Liu D, Qiao N, Song H, et al. Comparative analysis of telomeric restriction fragment lengths in different tissues of *Ginkgo biloba* trees of different age [J]. *Journal of Plant Research*, 2007, 120(4):523-528.
- [18] Kilian A, Stiff C, Kleinhofs A. Barley telomeres shorten during differentiation but grow in callus culture[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92(92):9555-9559.
- [19] Riha K, Fajkus J, Siroky J, et al. Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(10):1691-1698.
- [20] Song H, Liu D, Chen X, et al. Change of season-specific telomere lengths in *Ginkgo biloba*, L. [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(2):819-824.
- [21] Flanary B E, Kletetschka G. Analysis of telomere length and telomerase activity in tree species of various life-spans, and with age in the bristlecone pine *Pinus longaeva* [J]. *Biogerontology*, 2005, 6(2):101-111.
- [22] Fajkus J, Kovarik A, Krulovics R. Telomerase activity in plant cells [J]. *Febs Letters*, 1996, 391(3):307-9.
- [23] Fajkus J, Sykorová E, Leitch A R. Telomeres in evolution and evolution of telomeres [J]. *Chromosome Research*, 2005, 13(5):469-479.
- [24] Dvoráčková M, Fojtová M, Fajkus J. Chromatin dynamics of plant telomeres and ribosomal genes [J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2015, 83(1):18-37.
- [25] Gutierrez C, Puchta H. Chromatin and development: a special issue[J]. *The Plant Journal*, 2015, 83(1):1-3.
- [26] Wang Q M, Gao F Z, Gao X, et al. Regeneration of *Clivia miniata* and assessment of clonal fidelity of plantlets[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2012, 109(2):191-200.
- [27] Wang Q M, Wang L, Zhou Y, et al. Leaf patterning of *Clivia miniata* var. *variegata* is associated, with differential DNA methylation [J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(1):167-184.
- [28] Wang Q M, Wang L. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection [J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(9):1535-1547.
- [29] Wang Q M, Wang Y Z, Sun L L, et al. Direct and indirect organogenesis of *Clivia miniata* and assessment of DNA methylation changes in various regenerated plantlets [J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(7):1283-1296.
- [30] Murray B G, Friesen N, Heslop - Harrison J S. Molecular cytogenetic analysis of *Podocarpus* and comparison with other gymnosperm species[J]. *Annals of Botany*, 2002, 89(4):483-489.
- [31] 尹伟伦, 王华芳. 林业生物技术[M]. 科学出版社, 2009, pp 33,94.
- [32] Monteuis O. In vitro rooting of juvenile and mature, *Acacia mangium*, microcuttings with reference to leaf morphology as a phase change marker [J]. *Trees*, 2004, 18(1):77-82.
- [33] Baurens F C, Nicolleau J, Legavre T, et al. Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated in vitro with reference to leaf morphology as a phase change marker [J]. *Tree Physiology*, 2004, 24(4):401-407.
- [34] 陈晓阳, 沈熙环. 林木育种学[M]. 高等教育出版社, 2005, pp 94.
- [35] López C M R, Wilkinson M J. Progressive erosion of genetic and epigenetic variation in callus-derived cocoa (*Theobroma cacao*) plants[J]. *New Phytologist*, 2010, 186(4):856-868.
- [36] Watson J M, Riha K. Telomeres, ageing, and plants: from weeds to Methuselah-a mini-review[J]. *Gerontology*, 2011, 57(2):129-136.
- [37] Revilla M A, Pacheco J, Casares A, et al. In vitro reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1996, 32(4):257-261.
- [38] 尹伟伦, 王华芳. 林业生物技术[M]. 科学出版社, 2009, pp 125-130.

(责任编辑:张 研)