

连香树组织培养及植株再生体系的初步研究

陈荣珠,沈应柏,罗晓芳,张俊琦

(北京林业大学 生物科学与技术学院,北京 100083)

摘要:连香树是连香树科连香树属、第三纪古热带的孑遗植物,为我国珍稀濒危二级保护树种,具有极高的科研、经济及观赏价值。试验对连香树无菌体系的建立及植株再生技术进行了研究。结果表明:(1)连香树外植体的最佳消毒方法为0.1%升汞消毒12 min;(2)芽增殖最佳培养基:MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+GA₃ 2.0 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂 7.0 g·L⁻¹,pH 6.0;(3)愈伤诱导的最佳培养基:MS+6-BA 0.1 mg·L⁻¹+2,4-D 2.0 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂 7.0 g·L⁻¹,pH 6.0;(4)生根培养基:1/2MS+IBA 1.0 mg·L⁻¹+6-BA 0.1 mg·L⁻¹+蔗糖 20 g·L⁻¹+琼脂 6.8 g·L⁻¹,pH 6.0。

关键词:连香树;组织培养;植株再生

中图分类号:S792.99

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)01-0016-06

连香树(*Cercidiphyllum japonicum* Sieb. et Zucc)别名为山白果、五君树、紫荆叶木,是连香树科连香树属的高大落叶乔木,第三纪古热带的孑遗植物,为我国二级保护植物,迄今为止国内外学者对连香树的栽培及解剖构造进行了一些研究^[1-4],但在组织培养方面的研究还比较少。

连香树树姿雄伟,叶型奇特美观,观赏价值很高,可作为园林绿化树种^[5]。它的果和叶可作药用、叶可作香料^[6]、树干可作材用^[7],因此具有很高的经济价值。并且连香树为东南亚的孑遗植物,可被用来研究中国植物区系和日本植物区系的关系,因此具有较高的科研价值。综上所述,连香树具有较高的科研、药用和经济价值,近年来已被广泛引种栽培^[8]。但连香树雌雄异株,多为单株分布,结实量少、结实率低,难以成苗,天然更新能力差。近年来的大量盗挖林下幼苗,使其处于濒危状态^[9-11]。目前,虽然对连香树的组织培养有了一定的研究,也获得了连香树的再生体系。但是增殖系数并不高^[12-15],组织培养技术还不够成熟,远不能满足科研、园林绿化市场对苗木的需求。现对连香树(*Cercidiphyllum japonicum*)的

组织培养和再生体系进行研究,旨在提高连香树的增殖系数,从而实现工厂化育苗。为保存珍稀濒危树种连香树种质资源及引种栽培提供所需苗木,为连香树基因改良及分子生物学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料于2010年5月底采自湖北省宜昌市五峰县的连香树枝条。

1.2 方法

1.2.1 无菌体系的建立 枝条剪成3~4 cm左右(先将大叶片剪去),放入洗衣粉水中(加2~3滴滴露)浸泡20 min,软毛笔轻轻刷洗干净,自来水中冲洗30 min后无菌水冲洗3~4遍后阴干,置于超净工作台中。70%的酒精消毒30 s,无菌水冲洗3遍,每遍2 min;0.1%的升汞进行表面消毒(时间分别为8、10、12、14、16 min),最后无菌水冲洗5遍,每遍2 min。用无菌滤纸将外植体表面的水分吸干,把长段剪成1.5 cm左右的小段,每段带1~2个芽,同时将两端消毒时受伤变色的部分剪去,上端平齐,下端剪成斜面,插入1/2MS空白培养基中。每处理3次重复,每次重复10瓶,每瓶接种1棵芽,10 d后统计污染率、死亡率及存活率。

1.2.2 培养基类型及不同浓度的激素对丛生芽增殖的影响 增殖培养的筛选采用4因素3水平的正交设计(L₉3⁴)。因素为:基本培养基(MS、WPM、N6)、6-BA(0、1.0、2.0 mg·L⁻¹)和NAA(0、0.5、1.0 mg·L⁻¹)。每处理3次重复,每

收稿日期:2011-09-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871727);高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20090014110014);国家自然科学基金资助重点项目(30330490)

第一作者简介:陈荣珠(1986-),女,福建省漳州市人,硕士,从事植物组织培养研究。E-mail: chenrongzhu2006@126.com。

通讯作者:沈应柏(1959-),男,云南省人,教授,从事植物生理生态研究。E-mail: ybshen@bjfu.edu.cn。

次重复 6 瓶,30 d 后统计增殖系数。

1.2.3 不同浓度的 GA_3 对丛生芽增殖系数及苗高的影响 将试验中生长状况差不多的无菌苗接种在添加不同浓度的 GA_3 的培养基中,培养基及激素浓度同上面筛选出来的最佳配方, GA_3 的浓度为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 $mg \cdot L^{-1}$ 。每处理 3 次重复,每次重复 6 瓶,每瓶接种 1 棵苗,30 d 后统计增殖系数和植株高度。

1.2.4 激素对叶片及茎段诱导愈伤组织的影响 无菌苗的叶片剪成 0.5 cm×0.5 cm,接种在诱导愈伤组织培养基上,暗处培养。2,4-D(0、1.0、2.0、4.0 $mg \cdot L^{-1}$),6-BA(0、0.1、0.5 $mg \cdot L^{-1}$)。每处理 3 次重复,每次重复 6 瓶,每瓶接种 3 个小叶片。培养 30 d 后统计愈伤组织的诱导率。

1.2.5 壮苗、生根培养及移栽 将 2.0 cm 左右的丛生苗自基部切下,移至壮苗培养基,即 1/2MS 空白培养基中培养 20 d。然后将小苗转接到生根培养基中进行生根培养,生根培养基的基本培养基为 1/2MS 培养基,6-BA 浓度为 0、0.1 $mg \cdot L^{-1}$, IBA 浓度为 0.1、1.0、1.5 $mg \cdot L^{-1}$,蔗糖含量为 20 $g \cdot L^{-1}$,琼脂 6.8 $g \cdot L^{-1}$,pH6.0。每处理 3 次重复,每次重复 6 瓶,每瓶接种一棵小苗。接种后观察培养基中苗长根的时间,30 d 后统计生根率、根数和根长。

生根状况良好及生长健壮的小苗在拟南芥培养箱中进行炼苗。10 d 后,用镊子将其从培养瓶中取出,放在 30℃ 左右的温水中,洗净根部的培养基后移入基质(蛭石:珍珠岩=1:1)中,温度 20℃,空气湿度 80%,光照强度为标准光强度,30 d 后统计移栽成活率。

1.3 培养条件

组培室培养条件为:温度(24±2)℃,光照强度为 2 000~3 000 lx(由欧司朗三原色冷光灯提供),光照周期 14 h·d⁻¹(6:00~19:00)。

1.4 试验数据统计

污染率、存活率和死亡率分析前需进行反正弦变换处理^[16]。

试验数据用 SPSS17.0 数据分析软件进行方差分析和邓肯多重比较。

污染率/%=(污染的外植体数/接种外植体总数)×100;死亡率/%=(死亡的外植体数/接种外植体总数)×100;存活率/%=(存活的外植体数/接种外植体总数)×100;增殖系数/%=丛生

芽继代数/接种数;成愈率=(产生愈伤数/接种总数)×100;生根率/%=(生根苗数/培养苗数)×100;成活率/%=(移栽存活的试管苗数/移栽试管苗总数)×100。

2 结果与分析

2.1 消毒处理对连香树外植体存活情况的影响

消毒处理后的外植体在培养基中培养 7 d 后,大部分外植体存活了下来(见图 1)。各处理对污染率和死亡率的影响均达到极显著水平,对存活率的影响差异不显著。0.1%升汞消毒 8 min 的污染率最高达到 68.86%,随着消毒时间的延长,外植体的污染率降低,存活率升高,当消毒时间为 12 min 时,污染率最低,为 52.78%,存活率为 28.78%;继续延长消毒时间,污染率变化不大,但是死亡率增大,存活率明显下降(见表 1)。因此,0.1%升汞消毒 12 min 为连香树外植体的最佳消毒时间。



图 1 连香树无菌芽

Fig. 1 Germ-free shoots of *Gercidiphyllum japonicum*

2.2 不同生长调节剂对连香树丛生芽增殖的影响

由表 2 可知,最高的增殖系数达到 5.30,最低的为 1.08;结果表明基本培养基类型、6-BA 浓度、NAA 浓度对连香树丛生芽增殖系数的影响均达到显著水平;3 种因素对腋芽增值系数影响的作用效果为 6-BA>NAA>基本培养基。可见,MS+6-BA 1.0 $mg \cdot L^{-1}$ +NAA 0.5 $mg \cdot L^{-1}$ +蔗糖 30 $g \cdot L^{-1}$ +琼脂 7.0 $g \cdot L^{-1}$ +pH 6.0 为最佳腋芽增殖培养基配方。

2.3 GA_3 浓度对连香树丛生芽增殖系数及株高的影响

GA_3 浓度的变化对增殖系数的影响未达到显著水平,对株高的影响差异显著。由表 3 可知,随

表 1 不同消毒处理对连香树外植体的污染率、死亡率及存活率的影响

Table 1 Effects of sterilization methods on the rate of contamination,mortality and germination of *Cercidiphyllum japonicum* %

处理 Sterilization methods	污染率 Contamination rate	死亡率 Mortality rate	存活率 Germination rate
0.1%升汞 8 min	68.86±2.71a	0a	21.14±2.71ab
0.1%升汞 10 min	66.14±2.71a	0a	23.86±2.71ab
0.1%升汞 12 min	52.78±2.01b	21.14±2.71b	28.78±2.21a
0.1%升汞 14 min	54.78±2.01b	23.86±2.71bc	23.86±2.71ab
0.1%升汞 16 min	54.78±2.01b	28.78±2.21c	18.43±0b

注:不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著,相同字母表示差异不显著。下同。
Note:Different lowercase letters mean significant difference on the 0.05 level,the same letter says no difference. The same below.

表 2 不同生长调节剂对连香树丛生芽增殖的影响

Table 2 Effects of different growth regulators on clump shoot regeneration

基本培养基类型 Basic medium	6-BA 浓度/mg·L ⁻¹ 6-BA concentration	NAA 浓度/mg·L ⁻¹ NAA concentration	增殖系数 Multiplication coefficient
1(MS)	1(0)	1(0)	1.08±0.08a
1	2(1.0)	2(0.5)	5.30±0.22d
1	3(2.0)	3(1.0)	4.83±0.30b
2(WPM)	1	3	1.67±0.08a
2	2	1	3.33±0.08c
2	3	2	4.75±0.14b
3(N6)	1	2	1.50±0.14a
3	2	3	4.50±0.38b
3	3	1	3.25±0.14c

表 3 不同 GA₃ 浓度对连香树
增殖系数及株高的影响

Table 3 Effect of different GA₃ levels on
clump shoot regeneration and plant height

GA ₃ 浓度/mg·L ⁻¹ GA ₃ concentration	增殖系数 Multiplication coefficient	株高/cm Plant height
0	5.33±0.08a	1.53±0a
0.5	5.42±0.08ab	1.57±0.01a
1.0	5.67±0.08ab	1.65±0b
1.5	5.83±0.08ab	1.76±0.01c
2.0	6.33±0.08b	2.35±0.04d
2.5	5.67±0.17ab	2.06±0.01e

着 GA₃ 浓度的增加,增殖系数呈缓慢增加的趋势,株高值也升高,当 GA₃ 浓度达到 2.0 mg·L⁻¹ 时,增值系数和株高达到最大值(见图 2),分别为 6.33 和 2.35 cm,当继续增加 GA₃ 浓度,增值系数和株高都有所降低。

2.4 连香树叶片及茎段愈伤组织的诱导

叶片和茎段在培养基中培养 10 d 后,叶片主



图 2 培养基加 GA₃ 的连香树增殖情况
Fig. 2 Reduplication of *Cercidiphyllum japonicum* with culture medium adding GA₃

脉的伤口处和茎基部开始膨大,继续培养 20 d,形成愈伤组织(见图 3)。6-BA 浓度和 2,4-D 浓度对茎段愈伤组织诱导率均达到了显著水平,而 2,4-D对叶片诱导愈伤组织达到显著水平,6-BA 达到显著水平(见表 4)。叶片和茎段的最高愈伤诱导率分别为 61.11 %和 77.78 %,且愈伤组织



图 3 愈伤组织的诱导

Fig. 3 Induction of callus

的生长情况都较好, 这为细胞的悬浮培养准备了材料, 因此最佳诱导愈伤组织的配方为: MS+2,4-D 2.0 mg·L⁻¹+6-BA 0.1 mg·L⁻¹+蔗糖

30 g·L⁻¹+琼脂 6.8 g·L⁻¹, pH 6.0, 茎段的愈伤组织诱导要优于叶片。

2.5 壮苗、生根及移栽培养

选取株高 2~3 cm、粗壮的连香树苗接种在 1/2MS空白培养基, 进行壮苗培养。培养 20 d 后转接到生根培养基中, 15 d 左右可见从愈伤组织或者皮部有不定根长出, 30 d 后不定根迅速生长。IBA 浓度对连香树的生根率和平均根长的影响均达到了显著水平, 而对平均根数未达到显著水平。最高的生根率为 77.78%, 最多平均根数为 5.14, 最长平均根长为 6.09 cm(见表 5, 图 4, 图 5)。最佳生根培养基配方 1/2MS+IBA 1.0 mg·L⁻¹+6-BA 0.1 mg·L⁻¹+蔗糖 20 g·L⁻¹+琼脂 6.8 g·L⁻¹, pH 6.0。

表 4 不同激素的浓度组合对连香树叶片及茎段愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effect of different levels of the hormones on induction of the callus of the leaf and stem

2,4-D 浓度/mg·L ⁻¹ 2,4-D concentration	6-BA 浓度/mg·L ⁻¹ 6-BA concentration	叶片 Leaf		茎段 Stem	
		愈伤诱导率/%	生长情况	愈伤诱导率/%	生长情况
		Induction of callus	Growth situation	Induction of callus	Growth situation
0.1	0	33.33±0ab	小、硬实、黄褐色	38.89±5.56ab	小、硬实、黄色
1.0	0	38.89±5.56ab	较小、硬实、黄色	44.44±5.56abc	较小、疏松、绿色
2.0	0	55.56±5.56cd	较小、疏松、浅黄色	61.11±5.56de	中等、硬实、黄色
4.0	0	50.00±0bcd	小、硬实、绿色	55.56±5.56cde	小、疏松、浅黄色
0.1	0.1	44.44±5.56abc	中等、硬实、黄色	44.44±5.56abc	中等、疏松、浅黄色
1.0	0.1	50.00±0cd	中等、硬实、黄色	61.11±5.56de	中等、疏松、黄色
2.0	0.1	61.11±5.56d	较大、疏松、浅黄色	77.78±5.55f	较大、疏松、浅黄色
4.0	0.1	44.44±5.56bc	小、硬实、红褐色	66.67±0def	大、疏松、黄色
0.1	0.5	27.78±5.55a	较小、硬实、绿色	33.33±0a	较小、硬实、绿色
1.0	0.5	38.89±5.56ab	小、疏松、浅黄色	44.44±5.56abc	小、疏松、黄褐色
2.0	0.5	50.00±0cd	中等、疏松、黄色	50.00±0bcd	中等、疏松、淡黄色
4.0	0.5	44.44±5.56bc	较小、硬实、绿色	55.56±5.56cde	中等、疏松、黄褐色

表 5 不同生长调节剂对连香树组培苗生根的影响

Table 5 Effect of different plant growth induction growth regulators on rooting of the plants

IBA 浓度/mg·L ⁻¹ IBA concentration	6-BA 浓度/mg·L ⁻¹ 6-BA concentration	生根率/% Rooting rate	平均根数/条 Average ends	平均根长/cm Length of root
0.1	0	39.89±5.56a	3.57±0.78a	3.58±0.83a
1.0	0	55.56±5.56b	4.60±1.17b	4.24±1.47b
1.5	0	55.56±5.56b	4.80±1.14ab	4.47±1.24c
0.1	0.1	44.44±5.56a	4.50±1.20a	5.00±1.35a
1.0	0.1	77.78±5.55b	5.14±1.29b	6.09±2.05b
1.5	0.1	61.11±5.56b	4.55±1.33ab	5.36±1.51c

连香树生根苗通过炼苗后,移栽到基质(蛭石:珍珠岩=1:1)中,置于拟南芥培养箱中。10 d 后有新叶长出,植株长高(见图 6),并且有新根长

出(见图 7,图 8),30 d 后其成活率在 50%。在试验中发现,移栽 10 d 后一些苗萎蔫,没有新的根长出或者苗根已经腐烂。



图 4 生根培养基根情况

Fig. 4 Root in rooting culture medium



图 5 生根苗的生长情况

Fig. 5 Seedling growth in rooting culture medium



图 6 拟南芥培养箱中的连香树

Fig. 6 *Cercidiphyllum japonicum* in *Arabidopsis* incubator



图 7 连香树根的生长情况

Fig. 7 Root growth of *Cercidiphyllum japonicum*



图 8 连香树的生长情况

Fig. 8 Growth of *Cercidiphyllum japonicum*

3 结论

由试验结果得出最佳的消毒方法为:先用洗衣粉水+2~3 滴滴露浸泡 20 min,自来水冲洗 30 min,再用无菌水冲洗 2 次后阴干,在超净工作台中用 70 %酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 2 次,然后用 0.1%升汞(加 2~3 滴吐温-80)消毒 12 min,再用无菌水冲洗 5 次。

丛生芽增殖的最佳配方:MS + 6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.5 mg·L⁻¹ + GA₃ 2.0 mg·L⁻¹ + 蔗糖 30 g·L⁻¹ + 琼脂 7.0 g·L⁻¹, pH 6.0;最佳的生根培养基配方:1/2MS + IBA 1.0 mg·L⁻¹ + 6-BA 0.1 mg·L⁻¹ + 蔗糖 20 g·L⁻¹ + 琼脂 6.8 g·L⁻¹, pH 6.0;愈伤组织诱导的最适合培养基配方:MS + 6-BA 0.1 mg·L⁻¹ + 2,4-D 2.0 mg·L⁻¹ + 蔗糖 30 g·L⁻¹ + 琼脂 7.0 g·L⁻¹, pH 6.0。

根据连香树小苗对光强等条件的需求,在 AR-36L3 拟南芥培养箱中进行炼苗效果最好,其中温度为(24±2)℃,湿度为 60%左右,在移栽的

后期管理中一定要保证气候箱中的湿度。

4 讨论

植物细胞或组织培养体系的建立,外植体的选择很重要。试验采用一年生带腋芽的茎段作为试验材料,取得了很好的效果。

由于材料是采自室外,细菌很多,为了获得有活力的材料,消毒剂种类及消毒时间的选择是非常关键的一步^[17],是后期无菌苗获得的基础。试验所用的消毒剂为升汞,并且成功地筛选出了最佳的消毒处理方法:75%的酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 2 次,再用 0.1%的升汞(加 2~3 滴吐温-80)消毒 12 min,用无菌水冲洗 5~6 次。

在增殖培养的试验中,通过对不同激素及激素浓度的筛选,成功地获得了较高的增殖系数,高达 6.33,高于其它研究^[14-16]的增殖系数。张先云等^[15]用种子作为外植体,也取得较好的效果。采集外植体的季节对后期无菌苗的生长情况也很重要,试验没有从季节方面进行筛选。为了试验的

完备性,今后可以从采集外植体的季节再进一步筛选。

试验采用了无菌叶片及茎段为诱导愈伤的材料,获得较高愈伤的诱导率,并且得出茎段比叶片更适合作为愈伤的诱导材料,这与张先云等^[15]对连香树再生体系的建立中的研究结果相似;但不同的是试验中用 2,4-D 及 6-BA 进行组合,成功地获得愈伤组织。从激素的功能来看,NAA 与 2,4-D 都能促进愈伤组织的生长,2,4-D 对促进愈伤组织的生成比 NAA 的作用效果更好,可能与不同试验材料对激素响应的特异性有关。

试验中瓶苗的炼苗环境采用 AR-36L3 拟南芥培养箱,温度为 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$,湿度为 60%左右,该环境下苗木长势良好,对于后期的移栽是一个很重要的过渡。连香树的叶片较大,蒸腾速率较大,要注意控制培养箱中的湿度,以免小苗干死,但浇水过多会导致连香树烂根。因此湿度及光强的控制是后期小苗生长状况最重要的外界条件。

参考文献:

- [1] 王东,高淑贞.中国连香树的系统研究 I. 叶的宏观结构及叶柄维管束变化[J]. 西北植物学报,1990,10(1):37-41.
- [2] 王东,高淑贞.中国连香树的系统研究 II. 次生木质部的显微和超微结构[J]. 西北植物学报,1991,11(4):28-29.
- [3] Swamy B G L, Bailey I W. The morphology and relationships of *Cercidiphyllum*[J]. Arnold Arb,1949,30:187-210.
- [4] Erdtman G. Pllen morphology taxonomy angiosperms(corrected reprint of the edition of 1952)[M]. New York and London:Hafner publishing Company,1966.
- [5] 任全进,于金平.古老稀有植物——连香树[J]. 中国野生植物资源,1998,17(4):37-38.
- [6] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第二十七卷[M]. 北京:科学出版社,1979.
- [7] 周正.世界主要用材树种概论[M]. 北京:中国林业出版社,1980.
- [8] Bob Gibbons. Tree of Britain and Europe[M]. London:Chancer press,1995.
- [9] 傅立国.中国植物红皮书——稀有濒危植物:第一册[M]. 北京:科学出版社,1992.
- [10] 国家林业部.国家珍贵树种(第一批)[R]. 1992.
- [11] 于永福.中国野生植物保护工作的里程碑——《国家重点保护野生植物名录(第一批)》出台[J]. 植物杂志,1999(5):4-11.
- [12] 吴安湘,金晓玲,熊芳.珍稀濒危植物组织培养研究进展[J]. 西北植物学报,2006,26(1):211-216.
- [13] 麦苗苗,石大兴,王米力.连香树的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2005,41(6):801.
- [14] 麦苗苗,石大兴,王米力.连香树离体快繁初步研究[J]. 园艺学报,2006,33(1):186-189.
- [15] 张先云,袁秀云,马杰,等.连香树再生体系的建立[J]. 北方园艺,2009(9):77-79.
- [16] 李春喜,王志和,王文林.生物统计学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2002.
- [17] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1991.

Research on Tissue Culture and Plant Regeneration of *Cercidiphyllum japonicum*

CHEN Rong-zhu, SHEN Ying-bai, LUO Xiao-fang, ZHANG Jun-qi

(Biological Sciences and Biotechnology College of Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract: *Cercidiphyllum japonicum* is a relict species of tertiary ancient tropical plant, which has been listed the national second-grade protected kind and possesses researched economic and appreciatory value. In this paper the plant regeneration of *Cercidiphyllum japonicum* was researched. The result showed that the best sterilization methods was using 0.1% HgCl_2 for 12 min; $\text{MS} + 6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{GA}_3 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ sucrose} + 7.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ agar}$, pH 6.0 was optimum for reduplication; $\text{MS} + 6\text{-BA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 2,4\text{-D } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ sucrose} + 7.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ agar}$, pH 6.0 was optimum to induce callus; $1/2\text{MS} + \text{IBA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 6\text{-BA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ sucrose} + 6.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ agar}$, pH 6.0 was optimum medium for growing root.

Key words: *Cercidiphyllum japonicum*; tissue culture; plant regeneration