

研究报告

Research Report

不同草地早熟禾品种愈伤组织再生体系研究

雷炳琪[✉], 代亮[✉], 柳玉霞[✉], 刘洁[✉], 徐筱[✉], 徐倩[✉], 徐吉臣[✉]

北京林业大学林木育种国家工程实验室, 北京, 100083

✉ 通讯作者: jcxu282@sina.com ✉ 作者

分子植物育种, 2012年, 第10卷, 第76篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0076

收稿日期: 2012年06月03日

接受日期: 2012年06月28日

发表日期: 2012年12月23日

本文首次发表在《分子植物育种》(2012年第10卷第6期751-755页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

雷炳琪等, 2012, 不同草地早熟禾品种愈伤组织再生体系研究, 分子植物育种(online) Vol.10 No.76 pp.1553-1558 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0076)

引用格式(英文):

Lei et al., 2012, Callus Regeneration Study of *Poa pratensis* L. Varieties, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.76 pp. 1553-1558 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0076)

摘要 草地早熟禾(*Poa pratensis* L.)是一种复杂的多倍体植物且具有兼性无融合生殖方式, 建立高效的愈伤组织培养体系是进行基因工程育种的重要环节。本研究利用生产中常用的6个草地早熟禾品种为材料, 经愈伤组织诱导后, 对其愈伤组织分化及再生体系进行了研究。结果发现, 不同草地早熟禾品种的分化再生能力具有明显的差异, 不同激素处理组合对草地早熟禾愈伤组织的分化有显著的影响: 品种如“帝王”、“超级伊克利”、“蓝鸟”等较易分化和再生, 品种如“盛宴”、“布鲁克”等则只在特定条件下分化和再生; 培养基激素处理组合V (2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D)较适合于所有检测的品种, 处理组合IV (2 mg/L 6-BA)和VI (2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D)对部分品种的分化有较大的促进作用。研究同时评估了2种激素配比(6-BA和2,4-D)对草地早熟禾愈伤分化再生的影响, 发现不同草坪草品种对单独使用的6-BA浓度敏感性不同, 补加2,4-D后不同品种的分化率也存在明显差异。研究建立的不同草地早熟禾品种的高效再生体系, 不仅有利于这些品种的基因工程改造, 也为草地早熟禾愈伤组织再生体系研究奠定了重要的理论基础。

关键词 草地早熟禾; 组织培养; 再生; 品种

Callus Regeneration Study of *Poa pratensis* L. Varieties

Lei Bingqi[✉], Dai Liang[✉], Liu Yuxia[✉], Liu Jie[✉], Xu Xiao[✉], Xu Qian[✉], Xu Jichenao[✉]

National Engineering Laboratory for Tree Breeding, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, P.R. China

✉ Corresponding author, jcxu282@sina.com; ✉ Authors

Abstract *Poa pratensis* L. is a kind of polyploid Kentucky Bluegrass plant with facultative apomictic mode of reproduction. An efficient system of callus differentiation and plant regeneration is important in the gene engineering breeding. The research here was to optimize the system in 6 Kentucky Bluegrass varieties. The results revealed that the Kentucky Bluegrass varieties had the different ability in callus differentiation and plant regeneration, and had the different sensitivity to the phytohormone treatment. The variety of *Diva*, *Total Eclipse* and *Bluebird* were easier to differentiate and regenerate while *Feast brand* and *Brook lawn* were conditionally. The treatment V (2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D) were suitable for each variety, and the treatment VI (2 mg/L 6-BA) and VI (2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D) were in more contribution to some varieties. Meanwhile, the ratio of phytohormone 6-BA and 2,4-D in medium can affect the callus differentiation significantly. The only use of 6-BA or the further addition of 2,4-D promoted the callus differentiation differently among varieties. The efficient differentiation system established for each Kentucky Bluegrass variety here would be useful for their gene engineering breeding program, and also be an important theoretical basis for the differentiation theory study in Kentucky Bluegrass.

Keywords Kentucky bluegrass; Tissue culture; Regeneration; Genotype

研究背景

草地早熟禾(*Poa pratensis* L.)是北方最常用的冷季型草坪草, 具有耐践踏、绿期长、坪观质量好等优点, 但也具有耐旱性差、易感病、温度敏感等缺点。作为一种复杂的多倍体及兼性无融合生殖方式植物, 利用传统育种技术如自然筛选、常规父母本

杂交及理化诱导突变体等进行目的性状改造, 周期长, 且需要投入大量的人力、物力和财力。近些年来, 一些实验室利用基因工程技术对草地早熟禾品种进行有针对性地目的性状改造获得成功(余建明等, 2005; Chai et al., 2003; Gao et al., 2006), 显示出极大的潜力。

高效率的组织培养体系是进行基因工程育种中的重要环节。目前有部分实验室从一定层面对个别早熟禾品种开展了再生体系的研究, 包括培养基的筛选(陈智勇等, 2007)、激素的优化(高丽美, 2007; 马晖玲等, 2009; 马忠华等, 1999; 麻冬梅等, 2008; 皮伟等, 2004; Valk et al., 1995)等。结果显示, 不同品种的组培体系存在较大的差异, 特别是植株分化再生环节。本研究拟对生产上常用的 6 个草地早熟禾品种再生体系进行系统研究, 以期建立这些品种的高效再生体系, 探讨早地早熟禾再生体系的特点, 为进一步开展这些品种的基因工程育种奠定基础。

1 结果分析

1.1 不同品种草地早熟禾愈伤组织分化率比较

早熟禾的种子在诱导培养基上暗培养约 40 d 后, 陆续产生白色或淡黄色的非胚性愈伤组织, 其表面湿润, 质地疏松且呈透明状。继代培养至 2 个月以后, 愈伤组织颜色变为浅黄色, 表面干燥且有颗粒状突起, 体积增大至 5 mm 左右。挑选块状愈伤组织于分化培养基上生长, 光照处理 3 周左右, 部分愈伤组织上长出绿芽, 转接到生根培养基后均能生根成苗(图 1); 部分愈伤组织维持状态不变或长出白色的根毛, 这些愈伤组织块均不能继续分化出小苗。

计算不同品种的分化再生频率发现, 不同草地早熟禾品种间存在较大差异(表 1): 有些品种容易分化和再生, 如“帝王”、“超级伊克利”、“蓝鸟”等, 在各种处理下都有愈伤组织分化和再生, 而“盛宴”、“布鲁克”等则只在特定条件下才能分化和再生。再生率最高的是“蓝鸟”(60%), 其不同处理下分化再生频率的均值也达到了 25.57%, 其次为“超级伊克利”和“帝王”, 再生率分别达到 35.7%和 46.7%,

不同处理下的均值分别为 23.20%和 22.80%。

比较分化再生过程中的几种组合处理发现, 不同处理对分化再生的频率影响很大。其中处理组合 V (2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D)适合于所有检测的品种, 表明不同品种对这一组合处理的广泛适应性; 而组合 I 的表现最差, 有一半品种没有分化, 分化品种的分化率也都较低(10%以下); 组合处理IV和VI中虽然都有 2 个品种不能分化, 但其它品种的分化率都较高, 显示出品种差异对组合处理的敏感性。

1.2 单独使用 6-BA 对草地早熟禾愈伤组织分化的影响

实验设计了 2 个浓度梯度, 分别为 2 mg/L 和 3 mg/L。由图 2 可以看出, 不同品种草坪草品种的愈伤组织分化对 6-BA 比较敏感, 其中, “盛宴”和“布鲁克”在单独使用 6-BA 时愈伤组织不能分化, “帝王”和“蓝鸟”愈伤组织的分化率随着 6-BA 浓度升高而增加, “超级伊克利”和“克尼尔沃特”则随着 6-BA 浓度升高而降低。

1.3 1 mg/L 6-BA 基础上添加 2,4-D 对草地早熟禾愈伤组织分化的影响

1 mg/L 6-BA 的基础上分别添加 0.05 mg/L 和 0.1 mg/L 2,4-D, 结果发现, 补加较高浓度 2,4-D 会抑制“帝王”、“超级伊克利”的分化率, 而在“克尼尔沃特”和“蓝鸟”中分化率稍有提高, 对“盛宴”和“布鲁克”没有影响(图 3)。

1.4 2 mg/L 6-BA 基础上添加 2,4-D 对草地早熟禾愈伤组织分化的影响

于 2 mg/L 6-BA 下加不同浓度 2,4-D (0, 0.1 mg/L 和 0.2 mg/L), 发现不同品种品种的反应不同: 较高

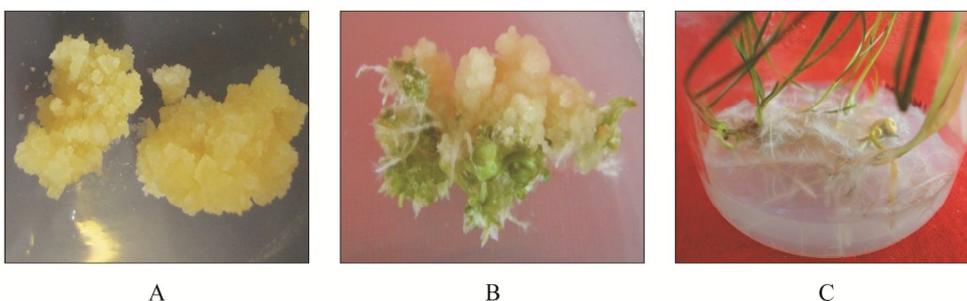


图 1 草地早熟禾品种“蓝鸟”愈伤组织分化和再生过程

注: A: 愈伤组织; B: 分化的愈伤组织; C: 长成植株的幼苗

Figure 1 Callus differentiation and plant regeneration of variety “Bluebird”

Note: A: Callus; B: Differentiated callus; C: Regenerated plant

表 1 不同草地早熟禾品种的愈伤组织分化率(%)

Table 1 Callus differentiation rate (%) in different varieties of Kentucky Bluegrass

处理	帝王	盛宴	超级伊克利	布鲁克	克尼尔沃特	蓝鸟
Treatment	Diva	Feastbrand	Total Eclipse	Brooklawn	Clear water	Blue bird
I	6.67	0	7.14	0	0	6.67
II	20.00	0	35.70	0	6.67	3.33
III	6.67	0	14.30	0	10.00	6.67
IV	26.70	0	32.10	0	33.30	36.70
V	20.00	16.00	21.40	3.33	13.30	26.70
VI	46.70	0	21.40	0	13.30	60.00
VII	16.70	4.17	14.30	0	0	20.00

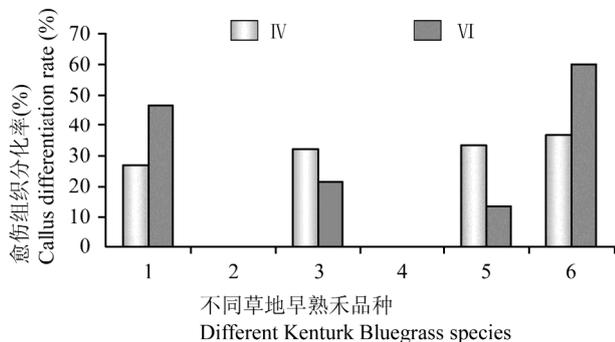


图 2 6-BA 对草地早熟禾愈伤组织分化的影响

注: 1: 帝王; 2: 盛宴; 3: 超级伊克利; 4: 布鲁克; 5: 克尼尔沃特; 6: 蓝鸟; IV: 2 mg/L 6-BA; VI: 3 mg/L 6-BA

Figure 2 Effect of 6-BA on callus differentiation in different varieties of Kentucky Bluegrass

Note: 1: Diva; 2: Feastbrand; 3: Total eclipse; 4: Brooklawn; 5: Clear water; 6: Blue bird; IV: 2 mg/L 6-BA; VI: 3 mg/L 6-BA

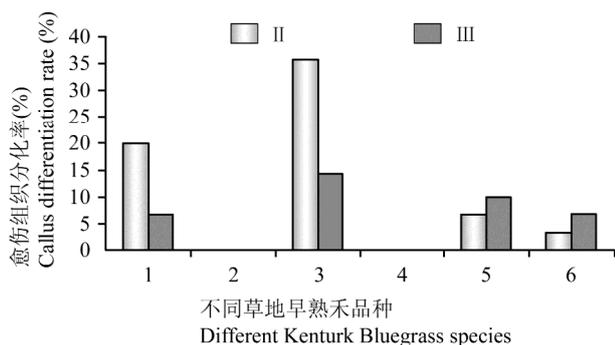


图 3 1 mg/L 6-BA 与 2,4-D 的组合对草地早熟禾愈伤组织分化的影响

注: 1: 帝王; 2: 盛宴; 3: 超级伊克利; 4: 布鲁克; 5: 克尼尔沃特; 6: 蓝鸟; II: 1 mg/L 6-BA+0.05 mg/L 2,4-D; III: 1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D

Figure 3 Effect of 6-BA (1 mg/L) and 2,4-D combination on callus differentiation in different varieties of Kentucky Bluegrass

Note: 1: Diva; 2: Feastbrand; 3: Total eclipse; 4: Brooklawn; 5: Clear water; 6: Blue bird; II: 1 mg/L 6-BA+0.05 mg/L 2,4-D; III: 1 mg/L 6-BA +0.1 mg/L 2,4-D

浓度 2,4-D 时(0.2 mg/L)能促进“帝王”和“蓝鸟”的分化, 无 2,4-D 时能促进“超级伊克利”和“克尼尔沃特”的分化, 而补加 0.1 mg/L 2,4-D 则使得分化难度较大的“盛宴”和“布鲁克”出现了分化(图 4)。

1.5 0.1 mg/L 2,4-D 与 6-BA 组合对草地早熟禾愈伤组织分化的影响

于不同浓度 6-BA 下添加 0.1 mg/L 2,4-D, 分析对不同品种草地早熟禾愈伤分化的影响。结果表明(图 5), 所有测试品种在最高 6-BA 浓度时表现最好, 如“蓝鸟”使用 2 mg/L 的 6-BA 比使用 0.1 mg/L 和 1 mg/L 的 6-BA, 分化率均值都提高了近 4 倍; 并且 6-BA 浓度低时, 一些品种如“盛宴”、“布鲁克”等甚至不能有效分化。

2 讨论

本研究通过 6-BA 和 2,4-D 的配比组合实验, 建立了 6 个草地早熟禾品种愈伤组织细胞分化和植株再生体系。结果表明, 6 个品种的植株再生率存在较大差异, 介于 3.33%~60%之间, “帝王”、“超级伊克利”和“蓝鸟”等品种较易分化和再生, 在所有处理组合中都有一定程度的分化和再生几率。而品种“盛宴”、“布鲁克”等则只在特定条件下分化和再生, 二者在 7 种处理组合中分别只有 2 种和 1 种处理下能够分化和再生。显示出基因型在植株再生中的重要性, 类似的结论在水稻品种组培体系中也发现(郭蕾等, 2006)。

影响组织培养再生体系的最重要因素是激素的种类、浓度和配比, 主要是细胞分裂素和生长素。6-BA 是一类人工合成的细胞分裂素, 具有促进细胞分裂、组织分化、芽体生成等作用, 因其高效、稳

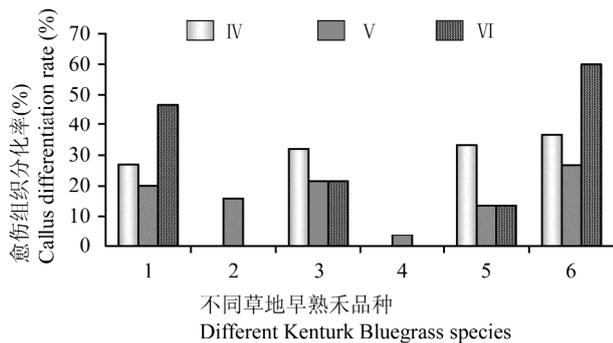


图4 2 mg/L 6-BA 与 2,4-D 的组合对草地早熟禾愈伤组织分化的影响

注: 1: 帝王; 2: 盛宴; 3: 超级伊克利; 4: 布鲁克; 5: 克尼尔沃特; 6: 蓝鸟; IV: 2 mg/L 6-BA; V: 2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D; VI: 2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D

Figure 4 Effect of 6-BA (2 mg/L) and 2,4-D combination on callus differentiation in different varieties of Kentucky Bluegrass
Note: 1: Diva; 2: Feastbrand; 3: Total eclipse; 4: Brooklawn; 5: Clear water; 6: Blue bird; IV: 2 mg/L 6-BA; V: 2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D; VI: 2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D

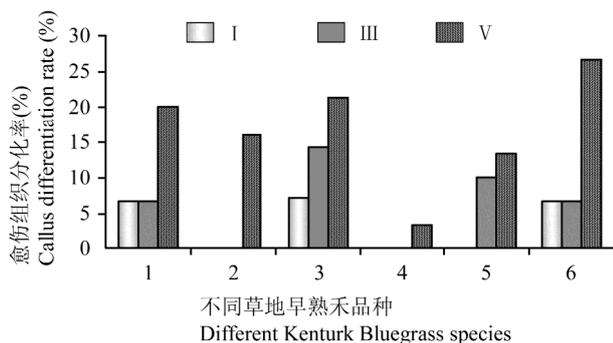


图5 0.1 mg/L 2,4-D 与 6-BA 的组合对草地早熟禾愈伤组织分化的影响

注: 1: 帝王; 2: 盛宴; 3: 超级伊克利; 4: 布鲁克; 5: 克尼尔沃特; 6: 蓝鸟 I: 0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D; III: 1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D; V: 2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D

Figure 5 Effect of 2,4-D (0.1 mg/L) and 6-BA combination on callus differentiation in different varieties of Kentucky Bluegrass
Note: 1: Diva; 2: Feastbrand; 3: Total Eclipse; 4: Brooklawn; 5: Clear water; 6: Blue bird; I: 0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D; III: 1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D; V: 2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D

定、廉价等特点, 在组培研究中被广泛采用。2,4-D 是植物组培过程中常用的生长素, 稳定性高、耐热性强, 具有较强的组培启动能力, 有促进细胞生长、分裂、生根的作用。与细胞分裂素横向扩大增粗细胞不同, 生长素促进细胞纵向伸长以增大细胞体积。因此, 两者合适的比例会有助于愈伤组织细胞

的分化和植株再生。本研究发现, 2 mg/L 6-BA 对大多数草地早熟禾的愈伤组织的分化促进效果最佳; 在 2 mg/L 6-BA 上添加少量 2,4-D 对部分品种的草地早熟禾愈伤组织分化亦有促进作用, 如“帝王”与“蓝鸟”在添加 0.2 mg/L 2,4-D 使分化率分别提高了 20% 和 23.3%; 反之, 在 0.1 mg/L 2,4-D 上添加 6-BA 时, 6-BA 浓度越高, 品种分化的几率越大, 如“蓝鸟”在添加 2 mg/L 6-BA 后, 分化率比添加 0.1 mg/L 和 1 mg/L 的 6-BA 分别提高了 4 倍左右。从另外一个角度分析, 不同的品种对激素的敏感性存在很大不同, 如“克尼尔沃特”对 2,4-D 比较敏感, “蓝鸟”需要一定浓度的 6-BA (2 mg/L), “超级伊克利”需要一定的 6-BA/2,4-D 比例(20 X), 而“帝王”需要较高浓度的 6-BA 和 2,4-D, “布鲁克”只能在特定 6-BA 和 2,4-D 浓度下(2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D)才能分化和再生。这一现象在另外一些草地早熟禾品种的研究中也得到了验证(高丽美, 2007; 马忠华等, 1999; 麻冬梅等, 2008; Valk et al., 1995), 并且, 在苜蓿、玉米、水稻的愈伤组织分化研究中有类似的报道(王晓玲和彭定祥, 2005; 夏燕莉, 2002; 郭蕾等, 2006)。

除了激素的影响作用, 草地早熟禾的愈伤组织分化和再生也受其它因素的影响, 如陈智勇等(2007)利用三种培养基 MS、CC、NB 研究了“优异”、“巴林”、“肯塔基”的分化再生, 发现在三种培养基上的平均分化率分别为 22.61%、35.22% 和 79.31%。因此, 在建立草地早熟禾再生体系时, 要综合考虑各种因素的影响, 最大限度地挖掘最适条件, 以提高愈伤组织细胞分化和植株再生的几率, 促进草坪草品种改良的基因工程研究。

3 材料与方法

3.1 试验材料

选取生产上常用的 6 个草地早熟禾品种: 帝王(Diva)、盛宴(Feast brand)、超级伊克利(Total Eclipse)、布鲁克(Brook lawn)、克尼尔沃特(Clearwater)、蓝鸟(Bluebird), 以成熟种子(购自中种公司)作为外植体诱导愈伤组织。

3.2 愈伤组织分化优化实验

选取较为干燥、致密、淡黄色、大小均匀一致且生长状态良好的愈伤组织细胞, 放置于分化培养基上进行分化和再生研究。分化培养基设置 7 种处理组合, 分别由 MS 培养基与不同激素组合而成(表 2)。每个培养皿接 10 块愈伤组织, 每 3 周继代一

次。观察愈伤组织的分化情况,记录分化的绿芽数,计算每一处理组合下品种愈伤组织的分化率(愈伤组织分化率=分化的愈伤组织总数/愈伤组织接种总数×100%)。

表 2 愈伤组织分化处理
Table 2 Treatments in callus differentiation

处理 Treatment	I	II	III	IV	V	VI	VII
6-BA (mg/L)	0.5	1.00	1.0	2	2.0	2.0	3
2,4-D (mg/L)	0.1	0.05	0.1	0	0.1	0.2	0

分化出的小芽长到 2~3 cm 长度时,将小芽转移到生根培养基中,生根培养基为 1/2MS+与愈伤组织分化同等浓度配比的激素处理。

作者贡献

雷炳琪、代亮是本研究的实验设计和实验研究的执行人,并完成论文初稿的写作;柳玉霞、刘洁完成数据分析;徐筱、徐倩参与实验设计,试验结果分析;徐吉臣是项目的构思者及负责人,指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(J1103516, 31128016)及北京市自然科学基金项目(5112015)共同资助。

参考文献

Chai B.F., Liang A.H., Wang W., and Hu W., 2003, Agrobacterium-mediated transformation of Kentucky Bluegrass, *Acta Botanica Sinica*, 45(8): 966-973

Chen Z.Y., Yi Z.L., Jiang J.X., Qin J.P., Liu Q.B., Cai N., Tang X.Y., and Sun A., 2007, Establishment of the transformation receptor system for *Poa pratensis*, *Zhongguo Caodi Xuebao (Chinese Journal of Grassland)*, 29(2): 54-58 (陈智勇, 易自力, 蒋建雄, 覃静萍, 刘清波, 蔡能, 唐小艳, 孙麇, 2007, 草地早熟禾愈伤组织遗传转化受体系统的建立, *中国草地学报*, 29(2): 54-58)

Gao C., Jiang L., Folling M., Han L., and Nielsen K.K., 2006, Generation of large numbers of transgenic Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) plants following biolistic gene transfer, *Plant Cell Reports*, 25(1): 19-25 <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-005-0005-5> PMID:16328388

Guo L., Cheng Y.H., Wang Z., He B., Zhang J.J., Liu S.Q., Liu M.H., Chen Z.L., Qu L.J., and Gu H.Y., 2006, Primary study on gene expression during root differentiation from rice calli, *Beijing Daxue Xuebao (Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis)*, 42(2): 175-179 (郭

蕾, 程英豪, 王紫, 何斌, 张军军, 柳世庆, 刘美华, 陈章良, 瞿礼嘉, 顾红雅, 2006, 水稻愈伤组织根分化过程相关基因的初步筛选, *北京大学学报(自然科学版)*, 42(2): 175-179)

Gao L.M., 2007, Establishment of embryonic callus induction and plantlet regeneration for bluegrass system, *Shanxi Shifan Daxue Xuebao (Journal of Shanxi Normal University (Natural Science Edition))*, 21(1): 99-102 (高丽美, 2007, 草地早熟禾胚性愈伤组织的诱导和植株再生体系的建立, *山西师范大学学报(自然科学版)*, 21(1): 99-102)

Ma D.M., Yang Y.Y., Yang S.F., and Xu X., 2008, Establishment of the high-efficient plant regeneration system of *Poa pratensis* L., *Beifang Yuanyi (Northern Horticulture)*, 7: 198-200 (麻冬梅, 杨亚亚, 杨赛飞, 许兴, 2008, 草地早熟禾高频再生体系建立, *北方园艺*, 7: 198-200)

Ma H.L., Zhao X.Q., Zhou W.H., and Wu X., 2009, Study on plant regeneration from Midnight II, *Caodi Xuebao (Acta Agristia Sinica)*, 17(2): 193-196 (马晖玲, 赵小强, 周万海, 吴翔, 2009, 草地早熟禾午夜2号植株再生研究, *草地学报*, 17(2): 193-196)

Ma Z.H., Zhang Y.F., Xu C.X., Chen W.J., Yin H.H., and Kuai B.K., 1999, Tissue culture and genetic transformation of Kentucky Bluegrass (*Poa pratensis*) via microprojective bombardment, *Fudan Daxue Xuebao (Journal of Fudan University)*, 38(5): 540-544 (马忠华, 张云芳, 徐传祥, 陈文峻, 尹红华, 蒯本科, 1999, 早熟禾的组织培养和基因枪介导的基因转化体系的初步建立, *复旦大学学报*, 38(5): 540-544)

Pi W., Li M.Y., and Zheng L., 2004., Study on tissue culture of *Poa pratensis* L., *Xinan Nongye Xuebao (Southwest China Journal of Agricultural Sciences)*, 17(2): 267-270 (皮伟, 李名扬, 郑丽, 2004, 草地早熟禾组织培养研究, *西南农业学报*, 17(2): 267-270)

She J.M., Liang L.F., Zhang B.L., He X.L., Chen Z.Y., and Ni W.C., 2005, Acquirement of Bt transgenic plants by *Agrobacterium tumefaciens* in Kentucky Bluegrass (*Poa pratensis* L.), *Jiangsu Nongye Xuebao (Jiangsu Journal of Agricultural Sciences)*, 21(2): 102-105 (余建明, 梁流芳, 张保龙, 何晓兰, 陈志一, 倪万潮, 2005, 农杆菌介导法获得草地早熟禾转Bt基因植株, *江苏农业学报*, 21(2): 102-105)

Valk P., Ruis F., Tettelaar-Schrier A.M., and Velde C.M., 1995, Optimizing plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass, the effect of benzyladenine, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40(1): 101-103 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00041125>

Wang X.L., and Peng D.X., 2005, Effects of genotype on callus induction and differentiation in Ramie, *Changjiang Daxue*

- Xuebao (Journal of Yangtze University), 25(3): 64-66 (王晓玲, 彭定祥, 2005, 不同基因型对苕麻愈伤组织诱导及分化的影响, 长江大学学报, 25(3): 64-66)
- Xia Y.L., 2002, Genetic analysis of embryonic callus induction and plant regeneration from immature embryo culture in maize, Thesis for M.S., Sichuan Agricultural University, Supervisor: Pan G.T., Rong Y.Z., and Liu Y.Z., pp.1-45 (夏燕莉, 2002, 玉米幼胚培养胚性愈伤组织诱导及绿苗再分化的遗传机理研究, 硕士学位论文, 四川农业大学, 导师: 潘光堂, 荣廷昭, 刘玉贞, pp.1-45)