

草坪草细胞组织培养研究进展

梁雪莲, 陈平, 黄冀, 余伟标, 姚冬梅, 张庚

(仲恺农业技术学院, 广州 510225)

摘要: 现就近年草坪草植株再生体系的建立和体细胞无性系变异及离体诱变育种技术研究进行了综述, 并借鉴其他类似品种方面的发展, 提出了草植株离体诱变方面的研究方向。

关键词: 草坪草; 植株再生; 体细胞无性系; 离体诱变

中图分类号: S688.403.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2006)06-0053-04

草坪草细胞组织培养与体细胞无性系变异及细胞融合研究在我国目前还属于非常薄弱的环节, 没有很好的再生体系, 直接影响了基因转化育种的进展, 没有体细胞无性系变异及细胞融合这样的高技术平台, 也严重制约了草坪草离体诱变育种技术的发展。现就草坪草植株再生体系的建立和体细胞无性系变异及离体诱变育种技术研究进行综述, 并借鉴其他类似品种方面的发展提出了草植株离体诱变方面的研究方向。

1 草坪草植株再生体系的建立

草坪草愈伤组织培养、原生质体培养、茎尖培养和花药培养的研究进展及体细胞变异在草坪草育种上应用很广。植物再生体系是草坪草生物技术的关键, 目前植物基因转化的受体系统主要来源于组织培养途径。作为基因转化的受体系统, 要求具有较强的再生能力、较高的遗传稳定性、稳定的外植体来源、对选择性抗生素敏感、对农杆菌侵染敏感等。所以, 建立高效的组织培养再生体系是植物遗传转化的重要条件。而有关禾本科牧草组织培养的研究较少, 再生体系的建立相对较难, 很大程度上制约了禾本科牧草的遗传转化研究^[1]。再加上许多草坪草是单子叶植物, 其离体的再生系统建立比较困难, 成熟的和已分化的组织难以产生具有再生潜力的细胞团。Vasil(1995)综合前人的研究提出了建立草类再生系统的3个要点: 选择成熟胚的分生组织、叶基分生组织和幼穗分生组织作为外植体来诱导具植株再生潜能的细胞系; 高浓度的生长素类物质; 从胚性愈伤组织制备原生质体或其他再生系统。迄今为止, 这3个要点仍然是草坪草基因改良的重要技术基础。

草坪草的组织培养始于20世纪70年代初, 最初的研究多是诱导愈伤组织, 未能再生植株(Atkin和Barton, 1973; Conger, 1978)。自此以后, 许多学者进行了草坪草组织培养研究, 并相继建立大多数草坪草的再生体系。这些成功的例子中, 多数以成熟种子、成熟或未成熟胚和花序幼穗为外植体。从再生途径看, 经愈伤组织、悬浮细胞和原生质体均可产生, 但多数是经愈伤组织再生, 这是草坪草体外培养的主要方

式。培养基的化学组成对草坪草愈伤组织的形成、细胞培养和植物再生至关重要。一般含高盐的培养基, 如MS、LS、N6、SH等均可用于草坪草愈伤组织的诱导, 其中MS最为常用。加入蛋白水解物有利于促进胚性愈伤组织的启动。有机氮化合物中, L-脯氨酸和谷氨酰胺能促进愈伤组织的诱导。对于植株的再生, 培养基中要减少或不加生长素, 而常加入6-BA、激动素等细胞分裂素。

胚性愈伤组织培养的方法与步骤是需经过外植体(种子、根尖、茎尖和未成熟的花序等)→愈伤组织诱导→愈伤组织的分化→绿色小苗再生→生根培养→再生成完整植株等几个过程。相比而言, 对剪股颖属、早熟禾属、狗牙根属的愈伤组织研究较少, Wu(1978)建立了匍匐剪股颖的再生体系后, Krans(1982)建立了剪股颖的植株再生体系, 并分析了愈伤组织诱导、增殖、绿苗形成对激素和培养环境的要求^[3]。付玲玲^[4]通过比较N6、MS和B5这三种植物组织培养常用基本培养基的效果, 认为在高茅草成熟种子愈伤组织诱导宜采用MS培养基。唐靖(2003)对日本结缕草成熟胚愈伤诱导及植株再生作了详细的研究。Krans(1981)也报道把匍匐剪股颖种子分别于1.0 mg/L 2, 4-D的MS培养基中光培养, 1.0或10 mg/L 2, 4-D的MS培养基中暗培养, 均有大量愈伤发生。诱导愈伤培养基中是否有必要添加分裂素还不确定, 然而暗培养中, 在1.0 mg/L 2, 4-D的培养基中添加0.01 mg/L的分裂素比没添加分裂素的能产生更多的愈伤。暗培养比光培养的愈伤产量更高, 形成的时间更短, 更容易。在1.0 mg/L 2, 4-D中继代的愈伤比10 mg/L 2, 4-D的保持了更高的再生能力。只含0.10 mg/L KT或1.0 mg/L KT的培养基最有利于茎和根发生。不过易自力^[5]报道了对9个不同品种冷季型草坪草进行了愈伤组织诱导及植株再生实验, 结果表明: 选用CC或NB培养基都能使其愈伤组织出愈率与植株再生率得以提高; 2, 4-D诱导浓度(2 mg/L)均高于水稻等其它禾本科植物; 在分化过程中, 6-BA的浓度以2 mg/L为最佳。杨爱芳^[6]以多年生黑麦草和一年生黑麦草的适宜发育期(1~3 mm)的幼穗为外植体, 在附加适宜浓度2, 4-D(1 mg/L)的改良M5培养基上诱导愈伤组织发生, 诱导率可达95%。此愈伤组织在诱导培养基上能多次继代培养并保持高分化能力。幼穗发育时期、培养基的激素组成明显影响愈伤组织的继代培养和植株再生能力, 基因型对愈伤组织诱导率和植株再生能力也有影响。霍秀文^[7]也以幼穗为外植体建

*基金项目: 广东省科技攻关项目(2005B20901018), 广州市科技攻关重点项目(2005Z2-E0201), 广东省良种培育与引进项目(粤财农[2004]295号), 仲恺农学院大学生创新基金项目(200508B)。

收稿日期: 2006-07-02

立了冰草组织培养再生体系,认为在组织培养中,外植体的生理状态和发育程度也是不容忽略的影响因素。在愈伤组织诱导过程中,不同长度的幼穗产生愈伤组织的部位不同,小于1.0 cm的幼穗虽然不受穗轴和小花器官的限制均能诱导出愈伤组织,但其形成的愈伤组织增殖缓慢,转入分化培养基后大部分愈伤组织衰亡,只有极少数可分化出芽。对1.0~3.0 cm幼穗培养时,从穗轴和颖基部及其他各部位均可产生愈伤组织,且增殖速度快,分化出芽的频率高。发育程度不同的幼穗,形成愈伤组织的部位和分化能力之间的差异,很可能与不同发育时期各种器官内细胞的内源激素及细胞的全能性有关。多数植物不同基因型表现出显著的组织培养再生能力的差异,如小麦、水稻等作物。另外一些草属已在研究建立再生体系的有猪笼草^[8]和杂交狼尾草^[9],茎节和心叶的愈伤组织诱导率明显高于茎段;茎段和嫩叶的愈伤组织诱导率无明显差异。茎节的植株再生率最高,为最佳的杂交狼尾草组培外植体材料,韩露^[10]也认为茎段是香根草组培快繁的理想外植体,余朝秀^[11]采用紫叶醉浆草(*Oxalis violalea*)鳞茎作外植体源,进行离体培养及快速繁殖研究,并筛选出最佳组培成分。莫肖蓉^[12]研究了热带水草红椒(*Cryptocoryne wendlanditopica*)的组培快速繁殖及其色彩显现结果表明,适宜的芽增殖培养基为MS+BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L,适宜的生根培养基为1/2MS的无激素培养基,在此生根培养基中,植株上部叶能显现出其独特的红褐色彩,其显现的颜色主要取决于花青素含量,类胡萝卜素含量和Chl_b/Chl_a比值的提高有利于其色彩的显现,添加1 mg/L的GA₃可促进植株的生长。

通过对国内外草坪草的组织培养、遗传转化现状的了解,我们可以清楚得到这样一个结论:要利用体细胞无性变异系筛选新品种,利用体细胞融合或外源基因转化改造草坪草性状,关键在于优化其离体再生系统,否则,极低的再生能力将直接影响到变异系筛选,融合原生质体的再生和外源基因转化的频率。而纵观以往的研究,草坪草离体再生体系的再生能力大部分不大理想,所以,在这一领域,我们还有大量的工作要做。

2 体细胞无性系变异及离体诱变育种技术研究

上世纪80年代开始,越来越多的资料表明,即使不加诱变剂,由组织培养物再生的植株中也存在广泛的变异。在甘蔗、马铃薯、菠萝、水稻、小麦、玉米、燕麦、大麦、大豆、番茄、大蒜和油菜等许多重要经济作物中都观察到这种现象,有时变异的频率可以达到30%~70%,特别是经过较长期培养的愈伤组织常常会分化出变异植物,这种现象称为体细胞无性系变异(somaclonal variation 后边简称SV)。创造体细胞无性系变异的主要程序为:愈伤组织或细胞悬浮物培养若干个周期;从这些长期培养的材料中再生大量的植株;在再生植株及其后代中筛选具有目标性状的个体;在随后的世代中对变异株系的这些性状进行测定;对稳定的变异株进行繁殖,选出新的育种系。参照这一程序,通过离体条件下添加不同浓度盐的选择,在很多植物上已经获得了耐盐性提高的体细胞无性系

变异网,但是在草坪草上还没有相关的成功报道。根据作者的研究,认为可能是以下几个方面的原因:首先是单子叶植物草坪草诱导高再生能力的胚性愈伤组织有相当的难度;其次,要长期维持愈伤组织的胚性能力更加困难,所以从长时间培养的愈伤组织中再生植株概率非常低;再次,愈伤组织很少在含盐的培养基上进行长期的定向选择。在本试验期间,作者花费大量的时间尝试对上述愈伤组织系进行多代定向选择,即将愈伤组织增殖培养基中盐的浓度按0.2%,0.5%,1.0%,1.5%,2.0%,2.5%逐步提高,每4周继代1次,盐浓度提高一个档次,并在相同的含盐再生培养基中测定再生率。发现继代培养情况下,经过长时间的多代选择后,愈伤组织的生长率虽然没有明显的下降,但愈伤组织的质量明显下降,即大多转变成非胚性愈伤组织,随之而来的是再生率明显下降,即使再生的,也绝大多数为非正常苗,最常见的是绿点,无法伸长。所以,通过在含盐培养基上多代定向选择愈伤组织,最后再生耐盐植株的途径在结缕草上难于奏效,而只有通过在不含盐的培养基上长期的继代,非定向地促进其变异,再在再生期间对植株进行选择,才有可能适用于结缕草等胚性愈伤组织难于诱导和继代维持的植物种类的体细胞无性系筛选。此外,在离体条件下,再生植株的盐害表现是个渐变的生理过程,逐渐地反映在生长势下降、叶片和根系的变色和枯萎等,因此要通过进一步的形态结构的解剖分析和生理测定来判断耐盐的再生变异株是否属稳定的变异还是短期的生理适应;对于种子繁殖的品种,尚需测定其有性后代是否稳定地遗传其耐盐性^[13]。以下内容全是关于不同品种耐盐性筛选的研究:杜永芹等^[14]采用固培法对上海建坪常用冷季型草坪草的4个属16个品种进行种子萌发期及幼苗生长早期阶段耐盐能力的比较研究结果表明:草坪草品种的发芽率和幼苗生物量随盐浓度的升高而降低,参试的4个属草坪草种子耐盐性次序为草坪型黑麦草>草坪型高羊茅>剪股颖>草地早熟禾。草坪草品种的耐盐能力存在明显差异,夜影黑麦草(*Dveninnshade*)最强,在1.5%的高盐逆境下,发芽率与相对干物质累积分别达40.4%和44.6%,蒙托克高羊茅(*Montal-1k*)、特拉华黑麦草(*Delaware*)次之。结缕草耐盐变异体的筛选用含有不同浓度NaCl的MS诱导培养基,采用直接筛选和逐级筛选法,对结缕草Zenith品种进行耐盐变异体的选择研究。结果表明:NaCl浓度对Zenith品种愈伤诱导率的影响极显著,在NaCl浓度为1.0%时已很难诱导出愈伤组织;愈伤组织直接在含有不同浓度NaCl培养基上选择表明NaCl浓度对愈伤组织相对生长量影响极显著;通过逐步筛选,愈伤组织的存活率显著增加;两种筛选方法获得的耐盐愈伤组织再生后分别获得耐盐1.0%及1.2%的植株^[15]。李景原等^[16]用组织培养、细胞悬浮培养和单细胞平板培养技术,诱导出冬凌草愈伤组织,并探讨了细胞悬浮培养时间、培养方法和接种密度对冬凌草单细胞平板培养植板率的影响。结果表明:从冬凌草叶和嫩茎诱导愈伤组织,以MS+2.4-D 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L培养基较好,愈伤组织诱导率高达96.8%。用普通单细胞平板培养法培养冬凌草单细胞的植板率很低,而以

悬浮培养 15~18 d 的单细胞为材料, 接种密度为 5×10^3 个/mL 时, 进行条件培养和看护培养, 植板率达 21.63%。大花萱草是较耐盐的百合科植物, 为满足盐碱地区绿化的需要, 王汉等^[17] 利用大花萱草无性系, 在不同盐浓度梯度下进行了筛选试验, 获得了较满意的抗性植株并初步确定了其适宜的耐盐浓度。

3 展望

综上所述, 体细胞无性系变异方面的研究主要集中在耐盐, 其次是耐热, 但在急待提高耐热性的匍匐剪股颖品种上未见专门的研究。我们可以借鉴其他相似品种的研究在草坪草体细胞无性系变异上进行以下方面的研究。

3.1 激素对体细胞无性系变异的影响

如郑平生等^[18] 则专门研究了在组培条件下外源 GA_3 、6BA、IAA、IBA 和 NAA 对盐胁迫下草葛试管苗生长的影响。结果表明: 5 种激素均可明显促进一定浓度盐胁迫下草葛试管苗的生长, 使其株高增加, 叶片数增多, 芽分生率提高。其中 0.5 mg/L GA_3 、1.0 mg/L 6BA、1.0 mg/L IAA、0.5 mg/L IBA 和 0.5 mg/L NAA 在各激素处理中效果最佳, GA_3 在 5 种激素处理中效果最明显。

3.2 研究体细胞无性系变异发生的规律或机理

大蒜尽管不是草属, 但对它的研究可以给我们一些启示, 如张恩让^[19] 的研究表明: (1) 以染色体变异作为鉴定指标, 首次明确了大蒜的 SV 发生在愈伤组织阶段, 在愈伤组织培养前期, SV 频率较低, 随着愈伤组织培养时间的延长, SV 不断发生并累加; SV 是大蒜品种在利用愈伤组织途径再生植株过程中普遍发生的现象, 而且, 不同的大蒜品种、不同的外植体类型, SV 发生频率是不同的, 变异形式是多样的。(2) 首次明确了 SV 的发生受愈伤组织培养环境的影响, 培养基种类、激素的种类和浓度、培养时的温度以及继代次数都会影响到 SV 的发生频率。(3) 建立了大蒜耐盐细胞变异系的逐步筛选体系, 并且获得了 5 个品种的耐盐细胞变异系。(4) 建立了大蒜耐盐突变系的一步筛选诱导体系, 筛选出了 2 个品种的耐盐细胞变异系。(5) 获得了能忍耐 1.0% NaCl 胁迫的大蒜无性变异系。(6) 建立了大蒜耐草甘磷细胞系的筛选体系。并利用此方法获得了 5 个品种的能耐 0.06% 草甘磷胁迫的细胞系。(7) 建立了大蒜细胞变异系耐性稳定性的鉴定方法。

3.3 草属品种耐热无性系的筛选

尽管目前在国内未查到有关资料, 但我们可以参考以下研究结果进行: 陈静娴等^[20] 以安徽地方品种“合肥黄心鸟”的下胚轴、子叶、茎尖组织为外植体, 在无菌条件下接种在不同植物激素的 M5 培养基上。在适宜的温度和光照培养条件下, 获得大量的下胚轴组织形成的愈伤组织, 其出愈率为 75.5%。愈伤组织转入 MS+8 mg/L 6BA 的培养基上, 分化出不定芽, 但分化率很低, 仅为 0.5%, 茎尖组织在适宜的培养基上, 直接产生芽簇。这些不定芽和芽簇经切割继代培养, 形成正常植株。在乌莱组织培养快速繁殖中, 进行耐热诱导和定向筛选。经不同温度 and 不同时间的处理, 有 10.6% 的小苗再生植株, 这些植株移入大田后, 在延后栽培的高温下能正

常生长, 但影响结实率, 仅有 30% 左右的植株正常结实。再生植株后代的耐热稳定性及品质在进一步试验之中。非洲菊 (*Gerbera hybrida*) 为世界十大切花之一, 属半耐寒性花卉, 忌高温, 生产上急需培育耐高温的非洲菊新品种。黄志刚^[21] 的试验以 6 个非洲菊品种为材料, 建立了非洲菊耐热变异的离体筛选体系; 探讨了 ^{60}Co γ 射线与 EMS、PYM 化学诱变处理对离体培养的影响和筛选耐热变异的可能性; 确定了再生植株诱导与增殖过程中轻脯氨酸适宜的筛选剂量, 并在此基础上开展了非洲菊抗轻脯氨酸变异系的筛选; 初步分析了耐热和耐轻脯氨酸筛选获得的三个初选系在高温下耐热表现。主要研究结果如下: 1、45℃ 热激处理 2 h 能较为稳定提高组培苗的增殖率。细胞膜相对电解质渗透率与存活率在大多数情况下具有良好的相关性, 在很大程度上反应了植物的耐热性, 可用于确定筛选的压力和鉴定非洲菊不同品种的耐热性。同一非洲菊品种在 35℃ 与 45℃ 胁迫下的热害表现不同, 耐热性也不一致。耐热性不同的非洲菊需选取不同的胁迫压力, 35℃ 下 10 到 25 d, 45℃ 下 20 h 左右为各品种适宜的筛选压范围。2、5 000 rad 适宜作为 ^{60}Co γ 辐射诱变花托的处理剂量, 对于组培苗来说, 除了品种 F_3 外, 仍可适当提高诱变的剂量。EMS 诱变处理中, 非洲菊花托对诱变处理时间的变化比对 EMS 浓度的变化更为敏感, 4 h 适宜作为 0.4% EMS 的处理时间。PYM 作为一种新型诱变剂, 40 g/mL 浸泡处理 1.5 h 是预培养花托的适宜处理方法。诱变苗在进行高温筛选时, 存活率出现变化、叶色叶型发生变异, 表明诱变与筛选是有效的。经 6 至 9 次高温定向筛选后, 获得了多个 S5、F25、F32 的耐热初选变异系。3、不同浓度 HYP 对花托和组培苗增殖培养影响的研究表明, 0.4 mg/mL 的 HYP 是适宜的筛选剂量, 对于预培养 25 d 的花托来说, HYP 浓度增加到 0.6 mg/mL 比较合适。对花托和组培苗多次 HYP 间隔胁迫筛选, 获得了经 5 次和 6 次筛选的初选变异系各 1 个。4、SR7、SHPS 5E6 初选系组培苗在模拟高温下与对照的耐热性进行了比较, 发现它们在 45℃ 和 35℃ 两种高温处理下的存活率都有所提高。其中, SR7 与对照在 35℃ 处理 15 d 时的存活率具差异显著, 是一个耐热变异新材料。SR7 的 Pro 含量、POD 和 SOD 活性等指标在 35℃ 处理后与对照 S5 具有显著的差异, 可能与非洲菊耐热性的提高有关。研究结果表明, 通过体细胞无性系变异离体筛选技术获得目的变异是切实可行的, 但需建立在大规模筛选的基础之上。

3.4 细胞融合研究

在进行细胞融合研究方面可以借鉴孙学永等^[22] 的方法, 他为了选育抗花叶病的烟草新品种, 用 G 140 与抗花叶病的野生波叶烟草 (*N. undulata*) 进行了体细胞杂交 (即两种烟草的体细胞原生质体融合), 其后代经过形态学鉴定。过氧化物酶同工酶谱鉴定、细胞学染色体数目检测, 确定为体细胞杂种植株。采用定向筛选和回交手段选育体细胞杂种植株, 经过 3 年的田间筛选鉴定, 得到了体细胞杂交中一株自交系, 从中再经筛选和攻毒试验获得了几个综合农艺性状好, 抗或耐花叶病的优良植株和株系。

西瓜炭疽病的发生与防治

张 焕 柱

(黑龙江省鸡西市农业科学研究所, 158100)

1 症状

西瓜的叶、蔓、果均可发病。

1.1 叶部病斑初为圆形淡黄色水渍状小斑, 后变褐色, 有同心轮纹和小点, 病斑易穿孔, 病斑直径约 0.5 cm, 外圈常有黄色晕圈, 病斑颜色较均匀。

1.2 叶柄和蔓上病斑呈梭形长椭圆形初为水浸状黄褐色, 后变黑褐色。

1.3 果实受害后初为暗绿色油渍状小斑点, 后扩大成圆形暗褐色稍凹陷, 空气湿度大时, 病斑上长桔色粘状物, 严重时, 病斑连片, 西瓜腐烂。

1.4 未成熟的西瓜染病呈水渍状淡绿色圆形病斑, 致幼瓜畸形或脱落。

2 病原

2.1 病原为 *Colletotrichum orbiculare* (Berk & Mont) Arx 由刺盘孢层的葫芦科刺盘孢菌侵染引起, 病斑上小黑点为分生孢子盘。

2.2 分生孢子椭圆形长圆形, 无色单孢内含物颗粒状, 刚毛分散于分生孢子盘中, 褐色, 顶端色淡, 有分隔。

3 传播途径及发病条件

3.1 以菌丝体式拟菌核在土中的病残体上越冬, 翌年遇到适宜条件, 产生分生孢子梗和分生孢子落到植株果实上发病。

3.2 种子带的菌可存活 2 年, 播种带菌种子, 出苗后由子叶开始侵染。

3.3 西瓜染病后, 病部又产生大量分生孢子, 借风雨及灌溉水传播进行重复侵染。

3.4 在气温 10~30℃均可发病, 气温 20~24℃, 相对湿度 90%~95%适宜发病, 气温高于 28℃, 温度低于 34℃发病轻或不发病。

3.5 地势低洼, 排水不良或氮肥过多, 通风不良, 重茬地发病严重。

3.6 重病田在雨后收获的西瓜在贮运过程中易发病。

4 防治方法

4.1 选用抗病品种。

4.2 选用无病种子或进行种子消毒, 如温汤浸种, 55℃的温水浸种 15 min, 或用药剂浸种, 如 0.1% 的升汞浸泡 3 min 等。

4.3 施用充分腐熟的有机肥, 重施磷钾肥。

4.4 选择沙质土, 注意平整土地, 设置排水沟, 防止积水, 雨后及时排水, 合理密植, 及时清除田间杂草。

4.5 保护地栽培西瓜的, 可用烟雾法或粉尘法施药。

4.6 药剂防治: 保护地和露地在发病初期, 喷洒 50% 甲基硫菌灵可湿性粉剂 800 倍液, 加 75% 百菌清可湿性粉剂 800 倍液混合喷洒, 隔 7~10 d 1 次, 连续防治 2~3 次。

参考文献:

- [1] 吴光庭. 农杆菌介导高羊茅遗传转化体系的建立及 CBF 耐逆相关基因的导入[D]. 博士论文, 2004.
- [2] 卢少云. 细胞工程技术在草坪草育种上的应用[J]. 草原与草坪, 2002, 3: 6—8.
- [3] 胡繁荣. 狗牙根农杆菌介导转化体系的优化及除草剂抗性基因 bar 的导入与应用[D]. 浙江大学博士论文, 2004.
- [4] 付玲玲. 狗牙根种质资源的 RAPD 分析[D]. 甘肃农业大学硕士论文, 2003.
- [5] 易自力, 陈智勇, 蒋建雄, 等. 三种冷季型草坪草愈伤组织再生体系的建立[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(1): 25—28.
- [6] 杨爱芳, 何春梅, 王贤丽, 等. 黑麦草幼穗离体培养及植株再生[J]. 草业学报, 2004, 13(5): 84—90.
- [7] 霍秀文. 以幼穗为外植体的冰草组织培养再生体系建立[D]. 博士论文, 2004.
- [8] 丰锋, 李洪波, 谢建英. 猪笼草的组织培养[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(3): 268—270.
- [9] 王凭青, 段传人, 王伯初, 等. 杂交狼尾草不同外植体材料组织培养实验[J]. 重庆大学学报(自然科学版), 2005, 28(6): 130—133.
- [10] 韩露, 刘必融, 潘圳, 等. 香根草愈伤组织的诱导和快速繁殖[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版), 2004, 27(4): 237—239.
- [11] 余朝秀, 李枝林, 王玉英. 紫叶醉浆草鳞茎离体培养及快速繁殖

研究[J]. 西南农业大学学报, 2004, 19(4).

[12] 莫肖蓉, 蒋琴素. 热带水草红椒的组培快速繁殖及色彩显现研究[J]. 浙江农业学报, 2003, 15(2): 91—94.

[13] 柴明良, 王贺飞. 试管筛选耐盐的结缕草再生植株[J]. 科技通报, 2005, 21(5): 557—560.

[14] 杜永芹, 陈雪芳, 沈卫平, 等. 应用生物技术筛选耐盐草坪植物品种[J]. 上海农业学报, 2003, 19(1): 37—40.

[15] 梁小红, 韩烈保, 齐春晖. 结缕草耐盐变异体的筛选[J]. 四川草原, 2005, 8: 18—20.

[16] 李景原, 李贺敏, 王太霞, 等. 冬凌草愈伤组织诱导及细胞培养的研究[J]. 中草药, 2000, 31(12): 938—941.

[17] 王汉, 海带, 赵月玲. 高抗盐大花萱草的组培法筛选[J]. 潍坊学院学报, 2003, 3(2): 12—13.

[18] 郑平生, 金芳, 燕丽萍. 几种外源激素对盐胁迫下草葛试管苗生长的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2004, 3: 277—280.

[19] 张恩让. 大蒜(*Allium sativum* L.) 体细胞无性系变异规律和筛选利用研究[D]. 博士论文, 2003.

[20] 陈静娴, 聂凡, 潘美芳. 乌菜组织培养及耐热变异体的诱导和筛选[J]. 安徽农业科学, 1995, 23(3): 201—203.

[21] 黄志刚. 非洲菊耐热变异体的离体筛选与初步鉴定[D]. 博士论文, 2004.

[22] 孙学永, 林国平, 殷凤生, 等. 烟草体细胞杂交优质抗病株系的选育[J]. 烟草科技, 2003, 7: 36—40.