

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.06.025

邓一飞, 张露娜, 吴宜成, 等. 培养基成分和培养时间对匍匐剪股颖植株再生的影响[J]. 广西植物, 2013, 33(6):859-864

Deng YF, Zhang LN, Wu YC, et al. Effects of medium components and subculture period on plantlet regeneration of creeping bentgrass[J]. *Guihaia*, 2013, 33(6):859-864

培养基成分和培养时间对匍匐剪股颖植株再生的影响

邓一飞, 张露娜, 吴宜成, 陈沁, 邓志瑞

(上海大学 生命科学院, 上海 200444)

摘要: 以匍匐剪股颖成熟种子为外植体,研究了培养基 2,4-D 浓度、2,4-D 和 6-BA 组合配比、蔗糖浓度对匍匐剪股颖愈伤组织诱导的影响以及愈伤组织再生过程中继代时间、6-BA 浓度、蔗糖浓度对愈伤组织分化的影响。结果表明:在 MS 培养基上,2 mg · L⁻¹ 2,4-D 和 0.1 mg · L⁻¹ 6-BA 的组合最利于愈伤组织的诱导,诱导率高达 94%。蔗糖浓度为 30 g · L⁻¹ 时愈伤组织诱导率最高,为 82%;在再生过程中,当 6-BA 浓度为 1 mg · L⁻¹ 时分化率最高(62%),蔗糖浓度为 40 g · L⁻¹ 时,愈伤组织分化率最高(52%)。经过 2 次继代培养的愈伤组织(外植体放到培养基后 40 天)的分化率为最高(71%),随着继代次数增多,分化率逐渐降低,在经过 5 次继代后(培养 100 d)分化率仅有 18%。

关键词: 匍匐剪股颖; 愈伤组织; 2,4-D; 6-BA; 继代培养

中图分类号: S688.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2013)06-0859-06

Effects of medium components and subculture period on plantlet regeneration of creeping bentgrass

DENG Yi-Fei, ZHANG Lu-Na, WU Yi-Cheng, CHEN Qin, DENG Zhi-Rui

(School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: Mature seeds of creeping bentgrass were used as explants to study the effects of 2,4-D concentration, combination of 2,4-D and 6-BA, and sucrose concentration on callus induction and the effects of subculture time, 6-BA concentration, sucrose concentration on plantlet regeneration. The results showed that combination of 2 mg · L⁻¹ 2,4-D and 0.1 mg · L⁻¹ 6-BA produced the best result with 94% callus induction rate, and 30 g · L⁻¹ sucrose gave the best result, callus induction rate being 82%. During regeneration process, 1 mg · L⁻¹ 6-BA could bring the best differentiation frequency (62%) and 40 g · L⁻¹ sucrose resulted in the highest plantlet regeneration frequency (52%). The callus after the second time subculture (40 d after explants were laid on medium) gave the highest differentiation frequency (71%) which began to decline as subculture prolonged. After the fifth time subculture (100 d), only 18% differentiation frequency was obtained.

Key words: creeping bentgrass; callus; 2,4-D; 6-BA; subculture

匍匐剪股颖(creeping bentgrass)又名匍茎剪股颖,为多年生禾本科剪股颖属植物,是最抗寒的冷季型草坪草之一。由于它喜冷凉湿润气候、耐潮湿寒

冷能力强、并有出苗均匀、叶片细密等优点,已被世界各国广泛用于建植高档观赏型草坪和运动型草坪,如城市中心广场、高尔夫球场的果岭草坪和保龄

收稿日期: 2013-08-08 修回日期: 2013-09-22

基金项目: 上海市教育委员会科研创新项目暨上海大学创新基金(A.10-0112-10-004)

作者简介: 邓一飞(1988-),男,山东枣庄人,硕士研究生,生物化学与分子生物学专业,(E-mail)woshidengyifei@126.com。

*通讯作者: 邓志瑞,博士,副教授,研究方向为植物生理与分子生物学,(E-mail)dengzhirui@staff.shu.edu.cn。

球场等(安惠惠等,2012)。但由于地理生态条件的差异和环境污染,匍匐翦股颖的生长在我国广大地区表现出许多不尽人意的地方,如抗病虫害能力差、耐旱性差、磨性低、受到重金属离子的毒害,严重时甚至导致草坪建植失败(曾泉等,2006),因此,有必要对匍匐翦股颖品种进行抗性改良。

现代遗传工程技术是当前最有效的育种方法之一,在良好的植物受体系统建立(陈智勇等,2006;柴明良,2002;张振霞等,2007)后,通过外源基因的引入,能够拓展遗传改良的范围,解决一些常规育种难以解决的特殊问题。目前已有许多禾本科草坪草采用不同外植体进行离体再生的研究成果(马彩云等,2010;王培佳等,2009;李红民,2009;邵宏波,1992),但是尚未有对潘娜四号匍匐翦股颖的诱导及再生条件进行全面系统研究的报道。本文拟通过探究2,4-D浓度、2,4-D和6-BA浓度配比、蔗糖浓度对匍匐翦股颖愈伤组织诱导及继代时间、6-BA浓度、蔗糖浓度对愈伤组织分化的影响,建立高效的匍匐翦股颖再生体系,为进一步利用转基因技术培育出优良匍匐翦股颖新品种提供研究基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

组培外植体为匍匐翦股颖 Penn A-4 品种的成熟种子,由上海交通大学王兆龙老师惠赠。

愈伤组织诱导培养基 1: 配制含有不同浓度的2,4-D的MS基本培养基(Murashige *et al.*, 1962), 2,4-D浓度分别为1,2,3,4,5,6,7 mg · L⁻¹,其他成分皆为30 g · L⁻¹蔗糖,10 g · L⁻¹琼脂粉,10 mmol · L⁻¹脯氨酸,500 mg · L⁻¹水解酪蛋白,pH为5.8。

愈伤组织诱导培养基 2: 配制含有不同浓度的2,4-D和不同浓度的6-BA组合的MS基本培养基,2,4-D浓度分别为1.0,2.0,3.0,4.0 mg · L⁻¹,6-BA的浓度分别为0.0,0.1,0.2,0.5 mg · L⁻¹,其他成分与诱导培养基1相同,pH为5.8。

愈伤组织诱导培养基 3: 在确定最佳2,4-D和6-BA浓度组合后,保持其浓度不变,配制蔗糖浓度分别为10,20,30,40,50,60,70,80 g · L⁻¹的愈伤组织诱导培养基。

愈伤组织继代培养基: 在确定最佳蔗糖浓度后,保持蔗糖浓度不变,其他成分与愈伤组织诱导培养基3相同。

分化培养基 1: 配制含有不同浓度6-BA的MS基本培养基,6-BA浓度依次为0,1,2,3 mg · L⁻¹,其他成分皆为200 mg · L⁻¹肌醇,30 g · L⁻¹蔗糖,10 g · L⁻¹琼脂粉,pH为5.8。

分化培养基 2: 在确定最佳6-BA浓度后,保持其浓度不变,配制蔗糖浓度分别为10,20,30,40,50,60 g · L⁻¹的愈伤组织分化培养基。

以上培养基均需121 °C,20 min高温高压灭菌。

1.2 方 法

1.2.1 种子灭菌 参照曾泉等(2006)的方法,种子先用70%乙醇浸泡5 min,无菌水清洗3次,再用10%(V/V)次氯酸钠灭菌20 min,无菌水清洗5次。

1.2.2 2,4-D对愈伤组织诱导的影响 灭菌后的种子接种到含有不同浓度2,4-D的愈伤组织诱导培养基1上,每浓度5个重复,每重复接种40~50粒种子。25 °C暗培养,30 d后统计愈伤组织诱导率和愈伤组织平均重量。

愈伤组织诱导率(%) = 产生愈伤数/接种种子数 × 100%

愈伤组织平均重量(mg) = 愈伤组织总重量(mg)/产生愈伤数

1.2.3 2,4-D和6-BA浓度对比对愈伤组织诱导的影响 灭菌后的种子接种到愈伤组织诱导培养基2上,共有16个浓度组合,每组合5个重复,每重复接种40~50粒种子。25 °C暗培养,30 d后统计愈伤组织诱导率。

1.2.4 蔗糖浓度对愈伤组织诱导的影响 灭菌后的种子接种到含有不同浓度蔗糖的愈伤组织诱导培养基3上,每浓度5个重复,每重复接种40~50粒种子。25 °C暗培养,30 d后统计愈伤组织诱导率。

1.2.5 诱导时间对愈伤组织分化的影响 自接种日起,每20天继代1次,每次同一愈伤组织一分为二,分别接入继代培养基和分化培养基,共继代5次,每次30 d后统计愈伤组织分化率。

愈伤组织分化率(%) = 有芽形成的愈伤数/接种愈伤数 × 100%

1.2.6 6-BA浓度对愈伤组织分化的影响 愈伤组织转接到含有不同浓度6-BA的分化培养基1上,每浓度5个重复,光照培养,诱导愈伤分化,30 d后统计愈伤组织分化率。

1.2.7 蔗糖浓度对愈伤组织分化的影响 愈伤组织转接到含不同浓度蔗糖的分化培养基2上,每浓度5个重复,光照培养,30 d后统计愈伤组织分化率。

1.3 数据差异显著性分析

实验数据分析采用 SPSS 分析软件, Duncan 多重比较法, 5% 水平差异。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响

种子接种于含有不同浓度 2,4-D 的诱导培养基上, 30 d 后统计愈伤组织诱导率, 愈伤组织平均重

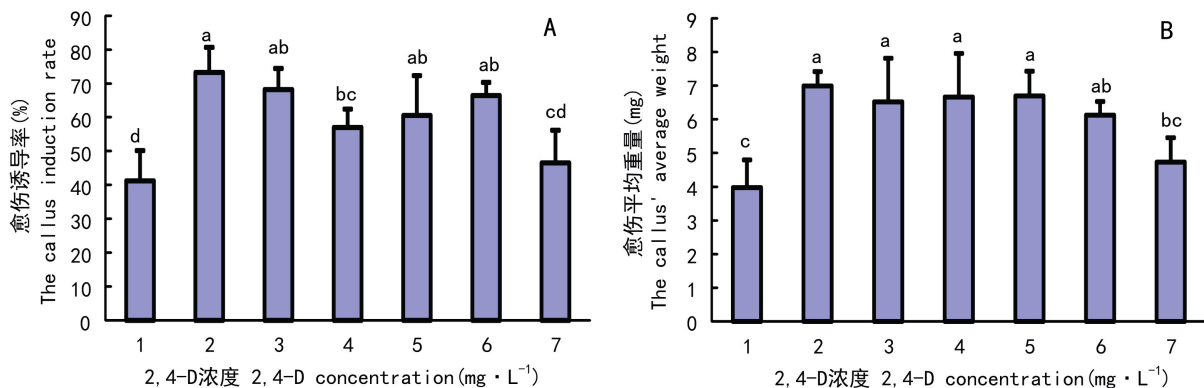


图 1 不同 2,4-D 浓度下匍匐剪股颖愈伤组织 A. 诱导率; B. 平均重量。不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。下同。

Fig. 1 Creeping bentgrass at different 2,4-D concentrations A. Callus induction rate; B. Callus' average weight. The normal letters mean significant differences at $P=0.05$. The same below.

2.2 2,4-D 和 6-BA 浓度对比对愈伤组织诱导的影响

由 2,4-D 和 6-BA 配成的 16 种浓度组合(表 1)显示, 2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D 和 0.1 mg · L⁻¹ 6-BA 组合处理后愈伤组织诱导率最高, 为 94%; 其次是 3.0 mg · L⁻¹ 2,4-D 和 0.1 mg · L⁻¹ 6-BA 组合, 该处理下的愈伤组织诱导率为 88%; 再次是 4.0 mg · L⁻¹ 2,4-D 和 0.1 mg · L⁻¹ 6-BA 组合, 愈伤组织诱导率为 82%。这一现象和 2.1 结论一致, 2.0 mg · L⁻¹ 的 2,4-D 浓度可以作为愈伤组织诱导的适宜浓度。从表 1 中还可看出当 2,4-D 浓度不变时, 诱导率随 6-BA 浓度的变化而呈“抛物线”变化, 并在浓度为 0.1 mg · L⁻¹ 时达到最高; 另外还可看出当 2,4-D 和 6-BA 浓度较高时均不利于愈伤组织诱导。

2.3 蔗糖浓度对愈伤组织诱导及分化的影响

由图 2:A 可见, 随着蔗糖浓度的升高, 愈伤组织的诱导率也逐渐升高, 当蔗糖浓度在 30~50 g · L⁻¹ 范围内, 诱导率较高, 其中 30 g · L⁻¹ 最为显著, 高达 82%; 之后随着浓度的升高, 从变化总趋势来看, 诱导率开始缓慢下降。在分化过程中, 愈伤组织对蔗糖浓度的要求较为苛刻, 40 g · L⁻¹ 的蔗糖效果最

量, 如图 1:A, B 所示。

由图 1:A 可以看出, 2,4-D 浓度为 2 mg · L⁻¹ 时, 愈伤组织诱导率最高, 为 73%。随着 2,4-D 浓度的增加, 诱导率有所下降。浓度为 6 mg · L⁻¹ 时, 也能得到较高的愈伤组织诱导率, 为 66%, 但是与 2,4-D 浓度为 2 mg · L⁻¹ 时相比, 下降了 7%, 并且愈伤平均重量为 6.13 mg, 也低于 2 mg · L⁻¹ 时的 6.99 mg, 因此选择 2 mg · L⁻¹ 的 2,4-D 浓度作为愈伤组织诱导的适宜浓度。

表 1 2,4-D 和 6-BA 浓度对比对匍匐剪股颖愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of combinations of 2,4-D and 6-BA on callus induction of creeping bentgrass

2,4-D+6-BA (mg · L ⁻¹)	接种种子数 (个) Seed number	愈伤组织数 (个) Callus number	诱导率 (%) Callus induction rate	标准差 Standard deviation
1.0+0.0	240	171	71	8
1.0+0.1	194	148	76	12
1.0+0.2	281	181	64	6
1.0+0.5	291	137	47	12
2.0+0.0	330	249	75	1
2.0+0.1	211	199	94	2
2.0+0.2	169	124	73	5
2.0+0.5	283	160	57	12
3.0+0.0	408	319	78	5
3.0+0.1	280	245	88	2
3.0+0.2	525	352	67	2
3.0+0.5	296	187	63	9
4.0+0.0	684	511	75	12
4.0+0.1	494	407	82	5
4.0+0.2	439	290	66	10
4.0+0.5	363	213	59	7

好(52%), 比两侧浓度(10~30, 50~60 g · L⁻¹)分别高出 14, 19 个百分点。其原因可能是蔗糖除了提

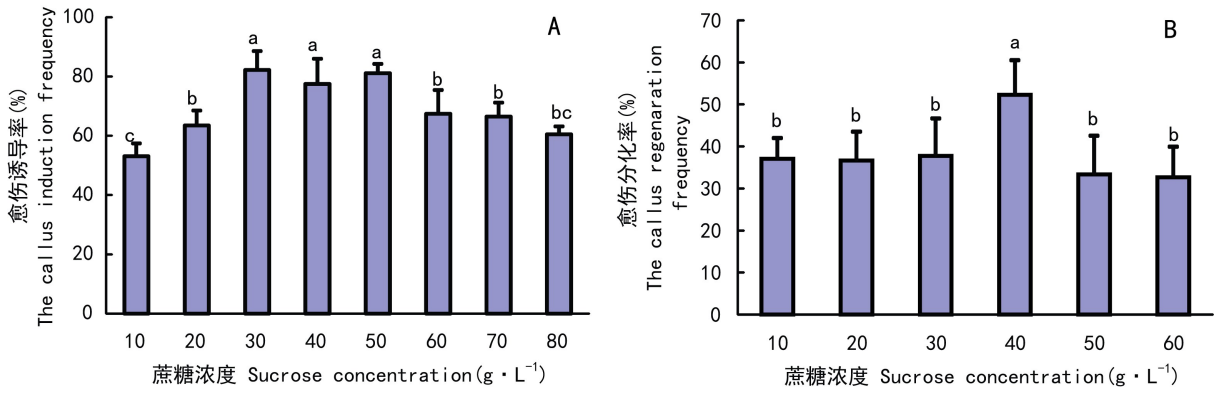


图2 不同蔗糖浓度下匍匐翦股颖愈伤组织 A. 诱导率; B. 分化率。

Fig. 2 Frequencies of creeping bentgrass at different sucrose concentrations

A. Callus induction rate; B. Callus regeneration frequency.

供愈伤生长的碳源外,还影响到培养基的渗透压,从而对愈伤组织的生长产生了综合影响。

2.4 继代时间对愈伤组织分化的影响

本实验测定了不同诱导时间下愈伤组织的分化率,结果如图3所示:随着继代培养时间的延长,匍匐翦股颖愈伤组织分化率先升后降,诱导40 d的愈伤,分化率最高,可达71%;诱导生长100 d的愈伤,分化率下降显著,为18%,仅为40 d时的1/4。

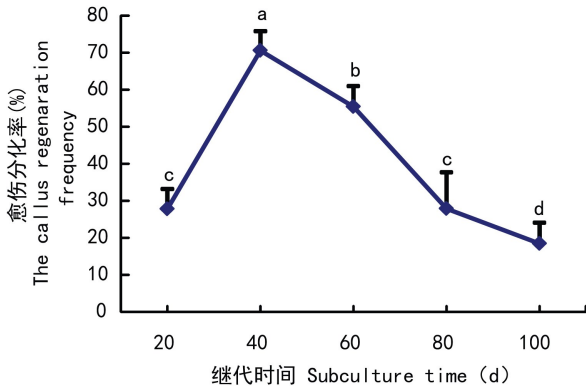


图3 继代培养不同时间后的匍匐翦股颖愈伤组织分化率
Fig. 3 Embryonic callus regeneration frequencies of creeping bentgrass after subculture for different times

2.5 6-BA 浓度对愈伤组织分化的影响

愈伤组织在含有不同浓度的6-BA的分化培养基上生长30 d后,分化率统计结果如图4。从图4看出,当6-BA浓度为1 mg · L⁻¹时,愈伤组织分化率最高,可达62%;浓度为2 mg · L⁻¹、3 mg · L⁻¹时的分化率与无6-BA时并无明显区别,甚至略有降低。因此选择1 mg · L⁻¹的6-BA浓度作为分化适宜的浓度。

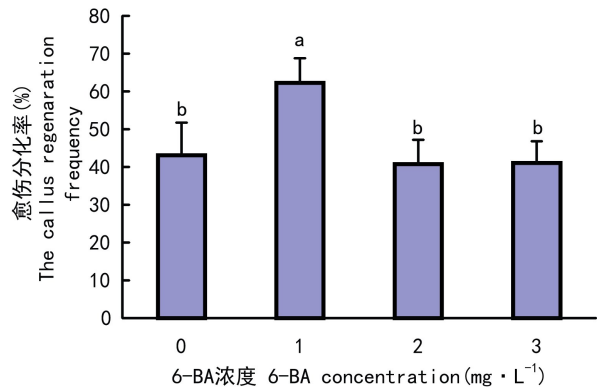


图4 不同6-BA浓度下匍匐翦股颖愈伤组织分化率
Fig. 4 Embryonic callus regeneration frequencies of creeping bentgrass at different 6-BA concentrations

3 结论与讨论

不同植物种子对不同消毒剂有不同的耐受能力。灭菌时间短,灭菌不完全,种子极易染菌;灭菌时间过长,虽然灭菌效果好,但外植体生长发育潜力会受到抑制,不利于愈伤组织的诱导。一般来说,能发芽的种子,在牙尖基部都能产生愈伤组织,可能是因为出芽使种子产生伤口,从而有利于愈伤组织的诱导;再者,种子能发芽,说明本身具有较大的生长发育潜力。因此在组培实验中,选择合适的灭菌时间和强度十分重要。我们参照曾泉等(2006)的方法,种子用10%(V/V)次氯酸钠进行表面消毒,时间分别为10、20、30、40、50 min,把种子发芽率高低作为外植体组织发育潜力保留多少的一个指标。结果表明,种子发芽率随灭菌时间的延长先升后降,20

min 就可以达到较好地灭菌效果,同时保证种子较高的发芽率(81%,未发表资料)。

诱导外植体产生愈伤组织时最常用的植物生长物质为 2,4-D,利用 2,4-D 对其体内生长素水平的调整和平衡,启动细胞分裂和胚早期发育(孙在红等,2004),因此,大多情况下,只用 2,4-D 就可成功诱导外植体产生愈伤组织,如高羊茅(梁蕊芳等,2005)、早熟禾(张文君等,2010)、黑麦草(刘文真等,2004)、结缕草(马彩云等,2010)、冰草(解继红等,2006)、羊草(邹吉祥,2012;刘公社等,2004)、小麦(王辉等,2011)等。但当 2,4-D 浓度达到一定水平时,愈伤组织诱导率开始下降(梁蕊芳等,2005;刘公社等,2004),且培养细胞和组织发生突变的几率也增大(刘文真等,2004)。本实验结果也表明,当 2,4-D 浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,诱导效果较好。随着 2,4-D 浓度的增加,愈伤诱导率开始降低,与已发表的结果一致。本实验中 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-D 也能得到较好的诱导效果,这可能与生物组织差异或者个体差异有关。这一点与吴翔等(2009)报道的一致,但他们研究发现,在 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-D 浓度下,愈伤组织会出现水渍化现象。2,4-D 与其他植物生长物质配合使用,更有利于愈伤组织的诱导(解继红等,2006;Bai *et al.*,2001;王培佳等,2009)。本实验发现, $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-D 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 组合的培养基愈伤组织诱导率最高,可达 94%,比不含 6-BA 时(75%)高出近 20%,表明生长素与细胞分裂素的绝对浓度及其比例影响着愈伤组织的诱导(王培佳等,2009)。

作为外源植物生长物质,6-BA 能改善细胞内源生长素和细胞分裂素的比例,调节细胞生理生化状态,使得细胞处于一个良好的状态,有利于胚性愈伤组织的发生,从而增加分化频率(李红民,2009;钟华鑫等,1991)。本实验中当 6-BA 浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,分化率最高,为 62%。

蔗糖是组织培养中最常用的糖类(王刚等,2007;赵永英等,2007)。Dalton & Thomas(1992)的实验表明,在培养基中加入凝胶和碳水化合物,能明显提高多花黑麦草胚性愈伤组织的形成。Zaghmout & Torello(1992)发现紫羊茅植株再生能力随着培养基中蔗糖浓度的增加逐渐增强,在不含植物生长物质的 1/2MS 和 B5 继代培养基中加入高浓度的蔗糖,有利于获得再生植株。糖类不仅为外植体提供能量,而且是外植体渗透环境的主要调节者。

本实验发现,蔗糖浓度为 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时愈伤组织效果诱导最好,而在分化培养基中 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖愈伤分化率最高,同一种材料在不同的培养时期对蔗糖浓度要求也是不同的。

继代培养时间对愈伤组织的生长状态和分化能力有极大影响。随着继代时间的延长,愈伤组织质地明显变差,出现水渍化、褐化、老化现象,发生变异的几率也增大;同时对愈伤的分化能力产生显著影响。继代初期愈伤组织分化能力较低是诱导的愈伤组织由于刚经历去分化状态,细胞的内源激素尚处于调整阶段,细胞生长还不是很旺盛,易受到伤害,因而不宜立即使用,需继代培养。经过 2 次的继代培养,愈伤组织的质量得到提高,分化率也随之增加。但长时期的继代培养,又会导致愈伤组织的分化能力下降。合适的继代时间是非常必要的,因为转化后的受体细胞需要较长时间的继代筛选(通常为 6~8 周)才能转入分化培养基上进行分化培养,若在这段时期内受体细胞的分化能力明显下降,则会严重影响其转化效果(李红民,2009)。因此,作为植物遗传转化的受体细胞,应能在离体培养条件下,在较长时间内保持较高的分化能力,越长越好。

本文有关结果为匍匐翦股颖高效离体再生体系的建立提供了依据,同时也为将来利用现代遗传工程技术培育优良的匍匐翦股颖新种质奠定了基础。

参考文献:

- 邹吉祥. 2012. 羊草高频再生体系建立及转 CodA 基因的初步探索[C]. 吉林:延边大学:17-19
- 李红民. 2009. 匍匐翦股颖离体再生体系的建立及玻璃花超低温保存技术研究[C]. 兰州:甘肃农业大学:28-29
- An HH(安惠惠),Ma HL(马晖玲),Bai SJ(白生军),*et al.* 2012. Effect of 2,4-D on callus induction and differentiation of different creeping bentgrass cultivars(2,4-D 对匍匐翦股颖不同品种愈伤组织诱导和分化的影响)[J]. *Grassl Turf* (草原与草坪), **32**(2):15-19
- Bai Y,Qu R. 2001. Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall rescue[J]. *Plant Breed*, **120**:239-242
- Chai ML(柴明良). 2002. Advances in genetic transformation of turf grasses(草坪草转基因研究进展)[J]. *Bull Sci Tech* (科技通报), **18**(1):67-72
- Chen ZY(陈智勇),Yi ZL(易自力),Jiang JX(蒋建雄),*et al.* 2006. Establishment of a transformation receptor system for *Agrostis stolonifera* (匍匐翦股颖转化受体系统的建立)[J]. *Acta Pratac Sin*(草业学报), **15**(6):112-114
- Dalton SJ,Thomas ID. 1992. A statistical comparison of various factors on embryogenic proliferation, morphogenesis and regeneration in *Lolium temulentum* cell suspension colonies[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, **30**:15-29

- Liu WZ(刘文真), Xuan SN(玄松南), Chen HZ(陈惠哲), *et al.* 2004. Factors effecting on tissue culture of perennial ryegrass(几种作用因子对多年生黑麦草组织培养影响的研究)[J]. *For Res*(林业科学研究), **17**(1):95-101
- Liang RF(梁蕊芳), Huang CL(黄丛林), Yu R(于荣), *et al.* 2005. Study and establishment of the plant regeneration system of tall fescue(高羊茅植株再生体系的研究与建立)[J]. *Biotech Bull*(生物技术通报), **3**:37-46
- Liu GS(刘公社), Qi DM(齐冬梅). 2004. Study of immature embryos of several species of *Leymus* via *in vitro* culture(赖草属几种植物幼胚离体培养研究)[J]. *Acta Pratac Sin*(草业学报), **13**(1):70-73
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiol Plant*, **15**:473-497
- Ma CY(马彩云), Wang D(王栋), Ma JP(马金萍), *et al.* 2010. Study on induction of callus from mature embryo and plant regeneration of *Zoysia japonica*(野生结缕草成熟胚愈伤组织诱导及再生体系的研究)[J]. *Pratac Sci*(草业科学), **27**(9):104-108
- Sun ZH(孙在红), Liu RT(刘荣堂), Liang HM(梁慧敏), *et al.* 2004. Progress of plant hormone application in tissue culture and plant regeneration of turfgrass(植物激素在草坪草组织培养及植株再生中的应用与进展)[J]. *Grassl Turf*(草原与草坪), **2**:13-16
- Shao HB(邵宏波). 1992. The research and application of gramineae tissue culture(禾本科植物的组织培养研究及其应用)[J]. *Guihaia*(广西植物), **12**(1):41-58
- Wu X(吴翔), Ma HL(马晖玲), Zhao XQ(赵小强), *et al.* 2009. Study on the plant regeneration of creeping bentgrass(几种匍匐翦股颖品种植株再生的研究)[J]. *Pratac Sci*(草业科学), **26**(4):134-138
- Wang H(王辉), Xiao XJ(肖小君), Qi ZM(齐泽民), *et al.* 2011. Studies on anther callus induction of rice by orthogonal test(水稻花药愈伤组织诱导的多因子正交试验研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **31**(4):545-549
- Wang G(王刚), Chen BG(陈宝刚), Liu DS(刘东升). 2007. Study on the effect of sucrose during plant tissue culture(蔗糖在植物组织培养中的效应)[J]. *For Pros Des*(林业勘查设计), **1**:53-55
- Wang PJ(王培佳), Jia YF(贾玉芳), Chen YF(陈逸锋), *et al.* 2009. Callus induction from stolons of creeping bentgrass(匍匐翦股颖匍匐茎愈伤组织的诱导)[J]. *J Nucl Agric Sci*(核农学报), **23**(4):621-625
- Xie JH(解继红), Yun JF(云锦凤), Yang B(杨斌), *et al.* 2006. Influence of 2,4-D and BAP on callus induction and growth of immature embryo of wheatgrass(2,4-D和BAP对蒙古冰草幼胚愈伤组织诱导及生长的影响)[J]. *Chin J Grassl*(中国草地学报), **28**(2):44-47
- Zhang ZX(张振霞), Liu P(刘萍), Du XL(杜雪玲), *et al.* 2007. Study on agrobacterium-mediated *GUS* transformation for *Lolium perenne* L.(农杆菌介导*GUS*基因对多年生黑麦草转化的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **27**(1):121-126
- Zhang WJ(张万军), Wang T(王涛). 2003. A study on the tissue culture and plant regeneration of perennial ryegrass(多年生黑麦草组织培养与植株再生研究)[J]. *Acta Agr Sin*(草地学报), **11**(3):219-222
- Zhang WJ(张文君), Yang CH(杨春华), Liu F(刘帆), *et al.* 2010. The effects of different phytohormone combinations on callus induction of *poa pratensis* L.(不同激素配比对草地早熟禾愈伤组织形成的影响)[J]. *J Sichuan Agric Univ*(四川农业大学学报), **28**(2):187-190
- Zhong HX(钟华鑫), Zhou JH(周菊华), Zhang FL(张飞联), *et al.* 1991. Effect of benzyladenine(BA) on the degeneration of the anther wall tissue and the frequency of shoot regeneration from cultured anthers of *Hordeum vulgare* L.(BA对大麦花药培养中药壁的衰退和植株再生频率的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), **11**(2):186-188
- Zhao YY(赵永英), Li CX(李翠香), Miao HM(苗红梅). 2007. Important factors affecting wheat tissue culture efficiency(影响小麦组织培养效率的重要因素研究)[J]. *J Henan Agric Sci*(河南农业科学), **1**:23-26
- Zeng Q(曾泉), Xu ZQ(徐子勤). 2006. Callus induction and plantlet regeneration from mature embryos of several creeping bentgrasses(几种匍匐翦股颖成熟胚愈伤组织诱导及植株再生)[J]. *Acta Bot Bor-Occ Sin*(西北植物学报), **26**(10):2 033-2 038
- Zaghmout OMF, Torello WA. 1992. Restoration of regeneration potential of long-term cultures of red fescue (*Festuca rubra* L) by elevated sucrose levels[J]. *Plant Cell Rep*, **11**:142-145
- (上接第755页 Continue from page 755)
2003. Dynamic of environmental humidity and moisture content of tobacco leaves and metabolism of starch during curing(烘烤过程中环境湿度和烟叶水分与淀粉代谢动态)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学) **36**(2): 155-158
- Gong CR(宫长荣), Yuan HT(袁红涛), Zhou YH(周义和), *et al.* 2001. Studies on degradation of starch and change of activity of amylase of tobacco leaf during process of curing(烟叶在烘烤过程中淀粉降解与淀粉酶活性的研究)[J]. *Chin Tobac Sci*(中国烟草科学), (2): 9, 11
- Gong CR(宫长荣), Sun FS(孙福山), Wang YF(汪耀富), *et al.* 1998. Effects of yellowing temperature on physiological and biochemical traits of tobacco leaf in process of curing(烟叶烘烤中不同变黄温度对某些生理生化特性的影响)[J]. *Chin tobac Sci*(中国烟草科学), (2): 6-7
- Song CP(宋朝鹏), Sun FS(孙福山), Xu ZC(许自成). 2010. Research advance in fine structure of tobacco starch during curing(烤烟调制过程中淀粉精细结构的研究进展)[J]. *Chin Tobac Sci*(中国烟草科学), **31**(1): 70-73, 78
- Weeks WW. 1985. Chemistry of tobacco constituents influence flavor and aroma [J]. *Recent Adv Tobac Sci*, **11**: 175-200