

紫花苜蓿下胚轴高频离体再生体系的建立

杨丽辉^a,陈耀锋^b,韩巧玲^b,李春莲^b

(西北农林科技大学 a. 动物科技学院, b. 农学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】以北极星、阿尔刚金、皇后 2000 及国产紫花苜蓿 4 个苜蓿品种下胚轴为外植体,建立其稳定、高效的离体培养再生体系,为基因转化改良苜蓿性状奠定基础。【方法】研究了种子预处理方法、培养基、基因型以及蔗糖质量浓度对苜蓿下胚轴分化特性的影响。【结果】低温 4 ℃ 预处理有利于提高苜蓿下胚轴愈伤组织的出愈率和绿苗分化率;其最佳诱导激素组合为“MS+1.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA+5.5 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖”和“MS+2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA+5.5 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖”;愈伤组织分化的最佳培养基为“MS+0.3 mg/L 6-BA+3.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA+5.5 g/L 琼脂+50 g/L 蔗糖”;最佳蔗糖质量浓度为 50 g/L;4 个紫花苜蓿品种愈伤组织诱导率的差异不大,但分化特性有较大差异,分化率由高到低依次为北极星、阿尔刚金、皇后 2000 和国产紫花。【结论】不同的种子预处理方法对 4 种紫花苜蓿品种的分化率均有一定影响,3 种处理中以 4 ℃ 下浸泡 2 h 处理的分化率最高,与其他处理间的差异达显著水平($P<0.05$)。不同激素组合是影响紫花苜蓿下胚轴愈伤组织诱导率和分化率的主要原因,不同激素组合处理间的差异均达到显著水平($P<0.05$),2,4-D 与 6-BA 配合对紫花苜蓿下胚轴愈伤组织的诱导效果较好,分化培养基中高质量浓度的 NAA,不利于愈伤组织的分化;不同基因型对分化率有显著影响($P<0.05$),而不同蔗糖质量浓度对分化率的影响不显著($P>0.05$)。说明其对离体培养再生体系的影响作用与处理方法、培养基、基因型相比是次要的。

【关键词】 紫花苜蓿;下胚轴;愈伤组织;离体再生体系

【中图分类号】 S551⁺.703.53 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)11-0029-06

Establishment of the system of high frequency regeneration
from hypocotyls of Alfalfa

YANG Li-hui^a, CHEN Yao-feng^b, HAN Qiao-ling^b, LI Chun-lian^b

(a. College of Animal Sciences and Technology, b. College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The system of high frequency and stable regeneration was established from hypocotyls of four kinds of Alfalfa named North Pole Star, Algonquin, Empress 2000 and Alfalfa of China in order to improve some characters by transforming some genes. 【Method】 The research studied the effects of pretreatments, mediums, genotypes and the quality concentration of sucrose on the characters of hypocotyls. 【Result】 The results showed that low temperature pretreatment such as 4 ℃ could improve the rates of calluses inducement and differentiation frequency. The best induction mediums were ‘MS+1.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA+5.5 g/L Agar+30 g/L Sucrose’ and ‘MS+2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA+5.5 g/L Agar+30 g/L Sucrose’. The best differentiation medium was ‘MS+0.3 mg/L 6-BA+3.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA+5.5 g/L Agar+50 g/L Sucrose’. Furthermore, the quality concentration of sucrose at 50 g/L was the best. And the rates of callus inducement of the four kinds of the Alfalfa weren’t

* [收稿日期] 2007-11-22
[基金项目] 陕西省 13115 重大科技专项(2007ZDK-G02)
[作者简介] 杨丽辉(1982—),女,河南洛阳人,在读硕士,主要从事植物遗传学研究。E-mail: huihuiyangyang@163.com
[通讯作者] 陈耀锋(1956—),男,陕西岐山人,教授,博士生导师,主要从事植物遗传育种研究。E-mail: chenyf3828@126.com

different but for the differentiation frequency, from high to low was North Pole Star, Algonquin, Empress 2000 and Alfalfa of China. 【Conclusion】 The different pretreatments had influences on the differentiation frequency of the four kinds of Alfalfa. The correlation analysis between the three different pretreatments showed that there existed a remarkably significant correlation between the pretreatment that the seeds of Alfalfa soaked in 4 °C for two hours and the other two, and the rate of differentiation frequency was higher than those of the other two ($P < 0.05$). The different endocrine combination was the main factors between the rate of calluses inducement and differentiation frequency from hypocotyls of the Alfalfa, in which existed a remarkably significant correlation ($P < 0.05$). 2,4-D added with 6-BA could enhance the inducement and differentiation frequency of hypocotyls from the four kinds of Alfalfa. In the differentiation mediums, the high level of NAA was bad for differentiation. The correlation analysis between genotypes and the quality concentration of sucrose showed that there existed a remarkably significant correlation of genotypes ($P < 0.05$) while no significant correlation existed of the quality concentration of sucrose according to differentiation frequency ($P > 0.05$), which showed that the effects were lower than different pretreatments, mediums and genotypes.

Key words: Alfalfa; hypocotyls; callus; regeneration system

苜蓿是世界上分布最广的多年生优质豆科牧草,与其他豆科牧草相比,苜蓿中的蛋白质含量约占干物质总量的 17%~20%,其营养价值丰富,是一种极好的饲料作物,因此有“牧草之王”的美称^[1]。

近年来,随着草场退化和盐碱化程度的加重,草场生态环境受到破坏,现有的苜蓿品种已经不能满足草地畜牧业对牧草产量日益增加的需求,因此迫切需要培育并推广抗逆性强的苜蓿新品种以缓解这些矛盾。

苜蓿具有丰富的遗传资源,传统的育种方法不仅存在周期长、见效慢等弊端,而且还常由于苜蓿的自交不亲和现象而往往得不到种子或杂种不育^[2]。

因此,利用基因工程手段对外源抗逆基因进行遗传转化,已成为苜蓿抗逆特性改良的重要方法之一,在这一改良技术体系中,建立稳定、高效的苜蓿离体培养再生体系至关重要。尽管早在 1972 年, Saunders 等^[3]就通过离体培养得到了苜蓿再生植株,并在之后也有不少相关的研究报道,但苜蓿离体培养存在着体细胞胚分化困难、分化率低、重复性差、基因型依赖性较高^[4-5]等问题,一般很难再生,因而成为制约转基因苜蓿研究的主要限制因素。

本试验以苜蓿品种的下胚轴为外植体,研究不同种子处理方法、培养基、基因型及蔗糖质量浓度对紫花苜蓿下胚轴培养特性的影响,旨在优化紫花苜蓿离体培养因素,克服紫花苜蓿离体培养再生频率低的问题,建立紫花苜蓿下胚轴稳定、高效的离体培养再生体系,为基因转化改良紫花苜蓿性状奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

供试材料为目前常见的紫花苜蓿栽培品种北极星(North Pole Star)、阿尔刚金(Algonquin)、皇后 2000(Empress 2000)和国产紫花苜蓿(Alfalfa of China)。种子来源于陕西杨凌博示蔬菜研究所。

1.2 方 法

1.2.1 种子预处理 对 4 种苜蓿种子共设计了 3 种预处理方法:处理 I. 25 °C 条件下浸泡苜蓿种子 2 h;处理 II. 4 °C 条件下浸泡苜蓿种子 2 h;处理 III. 用体积分数 95%~98% 浓硫酸浸泡苜蓿种子 5 min。

1.2.2 外植体 选取预处理后的紫花苜蓿种子,流水冲洗后在体积分数 75% 的酒精中浸泡 6~8 min,然后在 1 g/L 的升汞中消毒 10 min,再用无菌水冲洗 5~6 次后,接种到 1/2MS+5.5 g/L 琼脂培养基上,于 25 °C、3 000~4 000 lx 光照条件下培养 5~7 d,待子叶完全展开而真叶尚未长出时,切取 2~3 mm 下胚轴为外植体进行接种培养。

1.2.3 培养基 试验设计了 8 种紫花苜蓿愈伤组织诱导培养基、8 种愈伤组织分化培养基及 1 种生根培养基,其中生根培养基为 1/2MS,其余培养基组成成分见表 1。所有培养基均附加 5.5 g/L 的琼脂和 30 g/L 蔗糖,pH 5.8~6.0,121 °C 高压灭菌 20 min。

1.2.4 愈伤组织的诱导、分化及生根 将切取的 2~3 mm 的下胚轴外植体,接种到愈伤组织诱导培养基上,于 25 °C、3 000~4 000 lx、16 h/d 光照条件

下培养,20 d 后统计计算愈伤组织诱导率(愈伤组织诱导率/%=诱导出愈伤组织的外植体数/接种外植体总数×100%)。将诱导出的愈伤组织转入分化培养基,于相同条件下诱导分化并计算绿苗分化率(绿

苗分化率/%=分化出芽的材料数/接种的材料数×100%);待分化芽长到 1 cm 左右时,切下小芽移入生根培养基中,约 30 d 后长成完整的再生植株。

表 1 培养基的种类和成分
Table 1 Types and components of the mediums

种类 Type	编号 Number	成分 Component	种类 Type	编号 Number	成分 Component
诱导培养基 Induction medium	1	MS+1.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA	分化培养基 Differentiation mediums	A	MS+0.3 mg/L 6-BA+2.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA
	2	MS+1.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA		B	MS+ 0.3 mg/L 6-BA+3.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA
	3	MS+2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA		C	MS+0.3 mg/L 6-BA+2.0 mg/L KT+0.15 mg/L NAA
	4	MS+2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA		D	MS+0.3 mg/L 6-BA+3.0 mg/L KT+0.15 mg/L NAA
	5	MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.05 mg/L KT		E	MS+1.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA
	6	MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L KT		F	MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA
	7	MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.25 mg/L KT		G	MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA
	8	MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT		H	MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA

2 结果与分析

2.1 预处理对紫花苜蓿下胚轴培养特性的影响

4 种紫花苜蓿品种经预处理后培养萌发,切取下胚轴接种到 MS+2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA+5.5 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖的诱导培养基上诱导愈伤组织,将诱导出的愈伤组织转接到 MS+0.3 mg/L 6-BA+3.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA+5.5 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖的分化培养基上,研究了 3 种种子预处理方法对 4 种紫花苜蓿品种下胚轴愈伤组织诱导率和分化率的影响,其结果

如图 1、图 2 所示。采用完全随机区组设计,分别以 4 种紫花苜蓿下胚轴诱导率和分化率为考察指标,经 SPSS13.0 统计软件的 SSR 分析,由图 1,2 可见,处理 I 和处理 II 的 4 种紫花苜蓿下胚轴愈伤组织的诱导率均达到 100%,但其分化率差异较大,其中以处理 II 的分化率最高,处理 III 的愈伤组织诱导率和分化率均较低。处理 II 与处理 I、III 对 4 种紫花苜蓿分化率的影响达到显著差异水平($P<0.05$),但 4 种紫花苜蓿品种间无显著差异($P>0.05$)。因此,紫花苜蓿种子在 4 ℃条件下浸泡 2 h 的预处理效果最好。

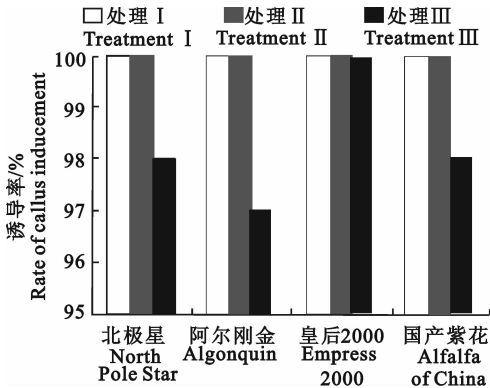


图 1 3 种种子预处理方法对 4 种紫花苜蓿下胚轴诱导率的影响

Fig. 1 Effect of the three pretreatments on the rate of callus inducement of the hypocotyls of four varieties of Alfalfa

2.2 诱导培养基组成对紫花苜蓿下胚轴愈伤组织诱导特性的影响

将由预处理 II 处理的紫花苜蓿种子获得的下胚

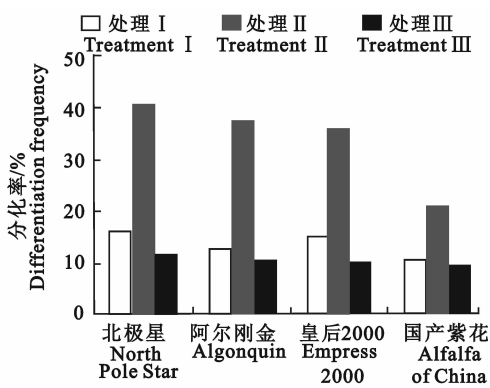


图 2 3 种种子预处理方法对 4 种紫花苜蓿下胚轴分化率的影响

Fig. 2 Effect of the three pretreatments on the differentiation frequency of the hypocotyls of four varieties of Alfalfa
轴外植体,接种于 8 种不同的愈伤组织诱导培养基上,诱导结果(图 3)表明,8 种诱导培养基均能诱导 4 个紫花苜蓿品种的下胚轴产生愈伤组织,且诱导

率均较高。相比较而言,生长素 2,4-D 与较高质量浓度 6-BA 配合(处理 1~4)时的愈伤组织诱导率,明显高于 2,4-D 与较低质量浓度的 KT 配合(处理 5~8),其中在不同诱导培养基的处理 2 与处理 4 中,4 种紫花苜蓿品种下胚轴愈伤组织的诱导率均达到 100%。在所有处理中,随着细胞分裂素(KT)质量浓度的增加,愈伤组织诱导率逐步下降。采用完全随机区组设计的 SSR 统计分析表明,对 4 种紫花苜蓿下胚轴诱导率的影响而言,处理 1~4 之间的差异均未达到显著水平($P>0.05$),但与处理 5~8

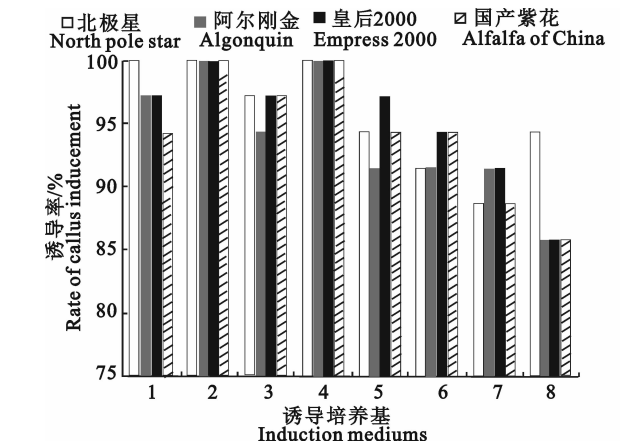


图 3 8 种诱导培养基对 4 种紫花苜蓿品种下胚轴愈伤组织诱导率的影响

Fig. 3 Effects of eight kinds of induction mediums on callus induction of hypocotyls of four varieties of Alfalfa

2.3 分化培养基组成对紫花苜蓿下胚轴愈伤组织分化特性的影响

将诱导培养后获得的愈伤组织接种到 8 种不同的分化培养基上,研究 4 种紫花苜蓿品种下胚轴愈伤组织在 8 种分化培养基上的分化特性。由图 4 可见,8 种分化培养基均可使紫花苜蓿下胚轴愈伤组织分化出芽。在较高质量浓度 KT 与较低质量浓度 6-BA 及较低质量浓度 NAA 组合的分化培养基(处理 A~D)上,芽的分化率高于较高质量浓度 6-BA 与较低质量浓度 NAA 的组合(处理 E~F)。且在所有处理中,随着分化培养基中 NAA 质量浓度的提高,愈伤组织芽分化率逐步下降。采用完全随机区组设计的 SSR 统计分析表明,处理 A~E 对 4 种紫花苜蓿下胚轴分化率的影响不显著($P>0.05$),但与处理 F~H 均达到显著差异水平($P<0.05$),这说明不同的激素组合同样也是紫花苜蓿下胚轴愈伤组织分化的影响因素。对品种间的统计分析表明,北极星、阿尔刚金、皇后 2000 间差异不显著($P>0.05$),但均与国产紫花苜蓿达到显著差异水

间差异显著($P<0.05$);相同处理条件下,4 种紫花苜蓿品种间诱导率的差异未达到显著水平($P>0.05$),反映出不同激素配合是影响紫花苜蓿下胚轴愈伤组织诱导率的主要因素。综合比较分析认为,4 种紫花苜蓿品种的最佳愈伤组织诱导培养基为“MS+1.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA+5.5 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖”和“MS+2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA+5.5 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖”。

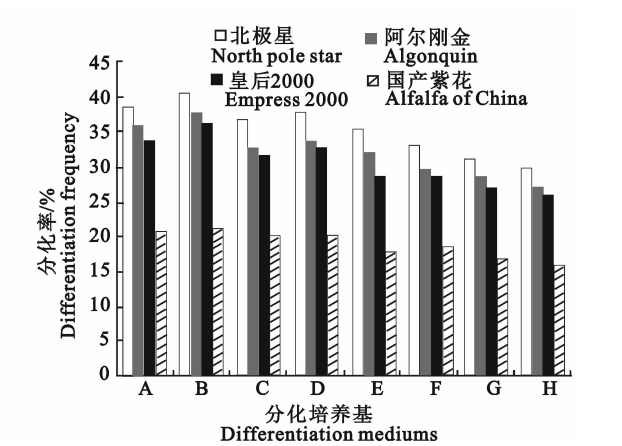


图 4 8 种分化培养基对 4 种紫花苜蓿品种下胚轴愈伤组织分化率的影响

Fig. 4 Effects of eight kinds of differentiation mediums on callus induction of hypocotyls of four varieties of Alfalfa

平($P<0.05$),说明不同的基因型对分化率也有一定影响。综合比较分析认为,4 种紫花苜蓿品种的最佳诱导愈伤组织分化的培养基为“MS+0.3 mg/L 6-BA+3.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA+5.5 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖”。

2.4 基因型对紫花苜蓿下胚轴愈伤组织诱导和分化特性的影响

由于苜蓿品种存在遗传差异,其再生能力也有所不同^[6-7]。本试验选取的 4 种紫花苜蓿品种愈伤组织的诱导频率差异不大(图 3),相互间未达到显著水平($P>0.05$),但分化特性差异较大,均达到了显著水平($P<0.05$),分化频率由高到低依次为北极星、阿尔刚金、皇后 2000 和国产紫花(图 4)。

2.5 蔗糖质量浓度对紫花苜蓿下胚轴分化特性的影响

将北极星下胚轴外植体接种到培养基“MS+2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA+5.5 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖”诱导愈伤组织,将获得的愈伤组织接种到含不同质量浓度蔗糖的“MS+0.3 mg/L 6-

BA+3.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA+5.5 g/L 琼脂”分化培养基上进行诱导分化,其结果(表 2)表明,含 50 g/L 蔗糖的分化培养基有利于紫花苜蓿下胚轴愈伤组织的分化,蔗糖质量浓度过高或过低均

不利于分化。但经过统计分析发现,不同质量浓度蔗糖对北极星下胚轴愈伤组织分化率的影响未达到显著差异水平($P>0.05$),说明蔗糖质量浓度对分化率的影响没有激素组合及基因型显著。

表 2 蔗糖质量浓度对北极星下胚轴愈伤组织分化的影响

Table 2 Effects of differentiation frequency of hypocotyls of North Pole Star with different quality concentration of Sucrose

蔗糖质量浓度/(g·L ⁻¹) Quality concentration of sucrose	接种愈伤组织数 No. of callus inoculated	分化愈伤组织数 No. of callus differentiation	分化率/% Differentiation frequency
30	93	36	38.7
50	97	39	40.2
70	102	33	32.4

2.6 紫花苜蓿下胚轴愈伤组织的分化及成苗

将预处理后的紫花苜蓿种子下胚轴接入诱导培养基,20 d 左右下胚轴产生愈伤组织(图 5-A);继代

2 次后,胚性愈伤组织分化出绿苗(图 5-B);30 d 后分化出的绿苗在生根培养基上生根(图 5-C);生根后的苜蓿苗可以进行移栽(图 5-D)。

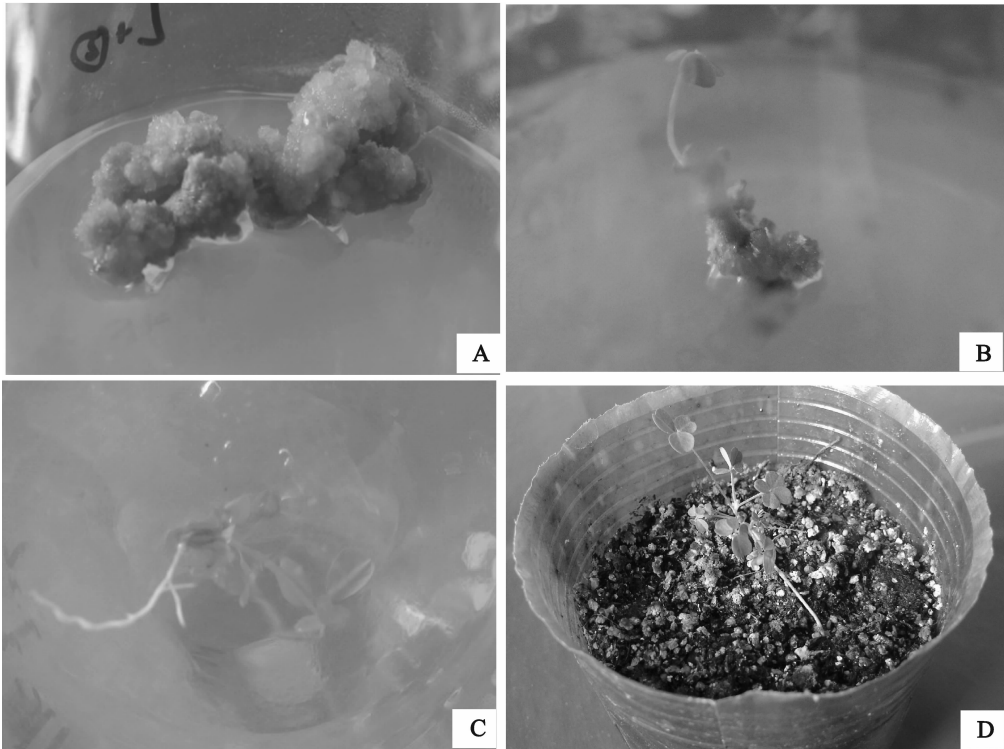


图 5 紫花苜蓿愈伤组织的分化及成苗

A. 诱导 20 d 后下胚轴产生的愈伤组织;B. 愈伤组织分化出的绿苗;C. 分化出的绿苗生根;D. 移栽后的苜蓿苗

Fig. 5 Differentiation from calluses and green shoots

A. Calluses of hypocotyls induced after 20 days;B. Green plant differentiating from calluses;

C. Green plant rooting;D. Green plant after transplanting

3 讨论

作为豆科牧草,紫花苜蓿休眠性的破除对其种子的萌发具有关键作用。本试验表明,在 4 ℃低温处理时,紫花苜蓿下胚轴愈伤组织的诱导率和分化率较 25 ℃浸泡和浓硫酸处理高,这与曹新有等^[8]的研究结果一致。

有研究表明,2,4-D 在紫花苜蓿愈伤组织诱导过程中起关键作用^[3,9-12]。本试验表明,2,4-D 与 6-BA 的激素组合,对紫花苜蓿下胚轴愈伤组织的诱导效果更好,其最佳的诱导激素组合为“MS+1.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA+5.5 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖”和“MS+2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA+5.5 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖”。

Saunders 等^[3]指出,2,4-D 会对体细胞胚的形成产生抑制作用,可使体细胞胚进入脱分化状态,需不断产生愈伤组织但却不能分化形成再生植株。本试验证实,细胞分裂素 KT、6-BA 与 NAA 配合时的诱导分化效果最好,4 种紫花苜蓿品种的最佳愈伤组织诱导分化培养基为“MS+0.3 mg/L 6-BA+3.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA+5.5 g/L 琼脂+50 g/L 蔗糖”。另外,在研究中还发现,分化培养基中高质量浓度的 NAA 并不利于愈伤组织的分化。

不同基因型植物对愈伤组织的诱导和分化有一定影响^[13-14]。本试验研究表明,不同紫花苜蓿品种的愈伤组织形成的差异不大,但其分化特性有较大差异,4 种紫花苜蓿分化频率由高到低依次为北极星、阿尔刚金、皇后 2000 和国产紫花。

蔗糖作为培养基中的主要碳源,而影响着培养基中的渗透压,从而影响愈伤组织的分化。本试验研究了不同质量浓度蔗糖对紫花苜蓿下胚轴分化特性的影响,结果表明,蔗糖质量浓度为 50 g/L 时有利于愈伤组织的分化,这和王强龙等^[15]在紫花苜蓿体细胞胚诱导中所需的蔗糖浓度低于愈伤组织诱导的结果并不一致,这可能与试验选取的紫花苜蓿品种的不同有关。

[参考文献]

- [1] 李世林,杨 舸,易秀莉,等. 根瘤农杆菌介导的盐生杜氏藻 *DsNRT2* 基因转化紫花苜蓿的初步研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版,2008,45(2):409-412.
- Li S L, Yang G, Yi X L, et al. Transformation of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) by agrobacterium-mediated process with *DsNRT2* gene from *Dunaliella salina* [J]. Journal of Sichuan University: Natural Science Edition, 2008, 45(2): 409-412. (in Chinese)
- [2] 杨起简,周 禾,孙 彦,等. 紫花苜蓿的愈伤组织诱导及组织培养 [J]. 北京农学院学报,2004,19(2):27-30.
- Yang Q J, Zhou H, Sun Y, et al. Study on induction callus of alfalfa and its tissue culture [J]. Journal of Beijing Agricultural College, 2004, 19(2): 27-30. (in Chinese)
- [3] Saunders J W, Bingham E T. Production of alfalfa plants from tissue culture [J]. Crop Sci, 1972, 12: 804-808.
- [4] Somers D A, Samac D A, Olhoft P M. Recent advances in legume transformation [J]. Plant Physiol, 2003, 131: 892-899.
- [5] 梁敏慧,黄 剑,夏 阳,等. 苜蓿外植体再生系统的建立研究 [J]. 中国草地,2003,25(4):8-14.
- Liang M H, Huang J, Xia Y, et al. Establishment of regeneration system for explants of Alfalfa [J]. Grassland of China, 2003, 25(4): 8-14. (in Chinese)

- [6] 杨 宁,李 胜,张永军,等. 扁桃砧木试管苗的生根及移栽 [J]. 甘肃农业大学学报,2005,40(2):119-124.
- Yang N, Li S, Zhang Y J, et al. Rooting and transplantation of test-tube plantlet of almond's rootstock [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2005, 40(2): 119-124. (in Chinese)
- [7] 马海燕,张 博,郝兴明,等. 新疆苜蓿愈伤组织再生体系建立的研究 [J]. 新疆农业科学,2005,42(1):19-23.
- Ma H Y, Zhang B, Hao X M, et al. Study on regeneration of Alfalfa in Xinjiang [J]. Xingjiang Agricultural Sciences, 2005, 42(1): 19-23. (in Chinese)
- [8] 曹新有,李春莲,余 玲,等. 小麦成熟胚愈伤组织诱导及分化研究 [J]. 西北植物学报,2006,26(11):2276-2280.
- Cao X Y, Li C L, Yu L, et al. Callus induction and differentiation of mature embryos of wheat [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(11): 2276-2280. (in Chinese)
- [9] 钱 瑾,刘发央,谢小冬,等. 紫花苜蓿高频再生体系的建立 [J]. 甘肃农业大学学报,2007,42(1):77-81.
- Qian J, Liu F Y, Xie X D, et al. Establishment of high frequency regeneration system in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2007, 42(1): 77-81. (in Chinese)
- [10] 刘振虎,卢欣石,葛 军. 紫花苜蓿愈伤组织及体细胞胚的细胞学观察 [J]. 草业科学,2005,22(2):37-40.
- Liu Z H, Lu X S, Ge J. Cytological observation on the callus and the somatic embryos arising of *Medicago sativa* [J]. Pratacultural Science, 2005, 22(2): 37-40. (in Chinese)
- [11] Tian L, Brown D C W, Waltson E. Continuous long-term somatic embryogenesis in Alfalfa [J]. Vitro Cellular & Developmental Biology, 2002, 38(3): 279-283.
- [12] 黄远新,王永雄,胡 艳. 南方紫花苜蓿不同外植体离体培养的研究 [J]. 中国草地,2003,25(3):42-47.
- Huang Y X, Wang Y H, Hu Y. Tissue culture of different explants of Alfalfa cultivated in southern China in vitro [J]. Grassland of China, 2003, 25(3): 42-47. (in Chinese)
- [13] 余桂红,马鸿翔,周森平,等. 白首乌组织培养快速繁殖的研究 [J]. 甘肃农业大学学报,2005,40(2):23-26.
- Yu G H, Ma H X, Zhou M P, et al. Study on rapid propagation of Bunge Swallowwort by in vitro culture [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2005, 40(2): 23-26. (in Chinese)
- [14] 马晖玲,卢欣石,曹致中,等. 紫花苜蓿不同栽培品种植株再生的研究 [J]. 草业学报,2004,13(6):99-105.
- Ma H L, Lu X S, Cao Z Z, et al. Study on plant regeneration in diverse cultivars of *Medicago sativa* [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2004, 13(6): 99-105. (in Chinese)
- [15] 王强龙,王锁民,张金林,等. 紫花苜蓿体细胞胚再生体系的建立 [J]. 草业科学,2006,23(11):21-27.
- Wang Q L, Wang S M, Zhang J L, et al. The establishment of high frequency regeneration system of Alfalfa somatic embryos [J]. Pratacultural Science, 2006, 23(11): 21-27. (in Chinese)