

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2008.00534



柱花草子叶组织培养多因素组合数学模型的研究

钟 军^{1,2} 郑 卓³ 智旭丹²

(¹湖南农业大学农学院, 湖南长沙 410128; ²湖南农业大学细胞工程实验室, 湖南长沙 410128; ³井冈山大学生命科学学院, 江西吉安 343009)

摘 要: 采用正交试验研究了影响柱花草子叶组织培养的可控因子, 并建立了柱花草子叶培养对可控因子反应的数学模型。结果表明, 可控因子与柱花草愈伤组织诱导率、芽分化系数和生根率之间存在真实的回归关系, 最佳回归模型分别为 $Y = 86.90 + 3.34X_1 + 1.36X_3 + 2.86X_1X_3$ 、 $Y = 7.70 + 1.52X_2$ 和 $Y = 299.30 + 6.39X_1 + 4.32X_1X_2$ 。从模型的解析可看出, 对愈伤组织诱导率影响最大的是 NAA, 其次是 NAA 与蔗糖之间的互动, 最后是蔗糖; 对芽分化有影响的是 KT; 对生根率影响最大的是 NAA, 其次是 NAA/IAA 的比值。

关键词: 柱花草; 子叶培养; 多因素组合; 数学模型; 正交设计

Mathematical Model of Multifactor Combination on Tissue Culture for *Stylosanthes* Cotyledon

ZHONG Jun^{1,2}, ZHENG Zhuo³, and ZHI Xu-Dan²

(¹College of Agriculture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan; ²Cell Engineering Laboratory, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan; ³School of life Sciences, Jinggangshan University, Ji'an 343009, Jiangxi, China)

Abstract: *Stylosanthes guianensis* is regarded as one of the newest green leguminous forage in tropical and subtropical regions of China. It is a species of *stylosanthes* (*Stylosanthes* spp.), which has good traits including high dry matter yield, cold tolerance, anthracnose resistance and late maturity. But there were few reports on optimal media recipes for tissue culture in *Stylosanthes guianensis*. To investigate the main factors affecting tissue culture, callus was induced with a cultivar Reyan 10 (*Stylosanthes guianensis* cv.), surviving callus was cultured on different media after 2 weeks, then, the buds with 2-3 cm in length were regenerated on root induction medium after 3 weeks, finally they were transplanted into soil as the roots had formed after 2-3 weeks. Meanwhile the main medium components affecting the tissue culture were determined with orthogonal design, and mathematical model between the medium components and traits was established. The results showed that there was a real regression relation between regulated factors and rate of callus induction, coefficient of bud differentiation, rate of root induction, with the equations of $Y = 86.90 + 3.34X_1 + 1.36X_3 + 2.86X_1X_3$, $Y = 7.70 + 1.52X_2$, and $Y = 299.30 + 6.39X_1 + 4.32X_1X_2$, respectively. For callus induction, NAA was the most efficient factor, interaction between NAA and sucrose was the second factor, and sucrose was the last one. Also, the important factors were KT for bud induction as well as NAA and NAA/IAA for root induction.

Keywords: *Stylosanthes*; Cotyledon culture; Multifactor Combination; Mathematical model; Orthogonal design

柱花草(*Stylosanthes* spp.)是一种优良的热带豆科牧草, 原产中南美洲, *Stylosanthes* 有种或亚种 44 个以上^[1]。通过遗传工程获得转基因柱花草具有广阔的前景, 但成功的关键在于组织培养技术。国外自 20 世纪 60 年代就开展柱花草组织培养的研究^[2-6], 然而使用的材料比较单一, 大多是有钩柱花草种; 国内的研究起步较晚, 且多集中于抗病育种和分子标记上。蒋昌顺等^[7]通过盆栽植株和离体叶片接种试验, 研究了 45 份柱花草种质对中国 2 种类型

炭疽病原菌生理小种 CATAS292(A 型)和 CATAS100(B 型)的反应。梁英彩等^[8]对柱花草 907 品种的选育过程进行了研究, 并认为抗病性是选种必须考虑的因素之一。易克贤等^[9]认为, 柱花草在传统抗病育种方面进展缓慢, 但利用分子育种, 从表型选择到基因型选择可使育种具有更强的操作性并可提高育种的预见性。王冬梅等^[10]对热研 2 号柱花草转化体系进行了研究, 试图通过基因工程的手段达到柱花草抗病的目的。蒋昌顺等^[11]采用 AFLP 技术分

基金项目: 湖南省湖南农业大学人才引进资助项目(2003YJ007)

作者简介: 钟军(1973-), 女, 湖南沅江人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向为遗传育种。Tel: 0731-4617641; E-mail: zhj2005@yahoo.com.cn

Received(收稿日期): 2007-06-05; Accepted(接受日期): 2007-09-18.

析了 42 个圭亚那柱花草品系的遗传多样性, 并对其抗病性进行了接种鉴定, 又用 RAPD 技术比较了 45 个柱花草品种的遗传多样性和抗病性^[12]; 同时对柱花草的研究进展进行了评价, 指出了分子标记技术对柱花草尤其在抗病方面起到的作用^[13]。

凭经验来筛选和优化培养基往往比较繁琐费时, 且不一定能取得最佳效果, 因此制定一个科学的实验方案是相当必要的。正交设计是多因素分析的有利工具, 它可以很方便地从众多因素中选出主要影响因素及最佳水平组合, 用较少的试验次数获得较多的信息, 为组织培养进行多因素综合定量模式化研究提供了有效的方法和手段。汤绍虎等^[14]以“雪青”梨为材料, 采用正交设计快速获得了无菌外植体, 为建立其优良的无性系和进行遗传转化打下了基础。孙丽等^[15]采用二次回归正交组合设计, 对西洋参和胡萝卜愈伤组织的生长率进行了研究, 并通过组合试验设计与优化, 得到可同时满足西洋参与胡萝卜愈伤组织生长的理想培养基, 为 2 种植物的原生质体融合奠定了基础。韩秀慧等^[16]以微型月季茎段不定芽分化培养基中 6-BA 和 NAA 浓度的优选为例, 采用二次回归正交设计, 实现了激素浓度和比例的定量优化。本文在前期工作的基础上^[17], 进行柱花草子叶愈伤组织的诱导、芽分化和生根培养, 探讨几个主要性状和可控因子之间的关系以及可控因子的优化技术指标, 以期为

柱花草的定量化和模式化离体培养提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

热研 10 号柱花草由湖南农业大学细胞工程实验室提供。

1.2 外植体的建立及培养条件

去掉种子表面的褐色种衣, 经 80℃热水处理 5 min, 70%酒精灭菌 5 min, 无菌水冲洗 1 次, 10%次氯酸钠灭菌 10 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 接种于无激素的 MS 培养基上进行培养, 待子叶伸展时, 切取 0.5 cm² 子叶, 随机接种在试验设计的培养基上, 每一种外植体各接种 3 瓶, 每瓶接种 10 个外植体。各阶段培养条件均为温度(28±2)℃, 光照时间 12 h/12 h, 光照强度 1 500 μmol m⁻² s⁻¹。

1.3 试验设计

1.3.1 试验各因素各水平及其编码值的确定 以 MS 为基本培养基, 并在愈伤组织的诱导、芽分化和生根培养阶段各设 3 个因素和 2 个水平, 按 L₈(2⁷)正交试验设计。为叙述方便, 将因素 *j* 的水平定义为 Z_{*j*}, 因素的最高浓度(上限)记作 Z_{2*j*}, 编码值为 1; 因素的最低浓度(下限)记为 Z_{1*j*}, 编码值为-1; 因素的零水平记为 Z_{0*j*}(为上限和下限水平的算术平均值), 编码值为 0, 仅在零水平的试验组合设置 3 次重复(表 1)。

表 1 正交设计的 3 个因素和 2 个水平
Table 1 Three factors and two levels of orthogonal design

处理 Treatment		因素 Factor		
		X ₁ (NAA, mg L ⁻¹)	X ₂ (KT, mg L ⁻¹)	X ₃ (sucrose, %)
Z _{2<i>j</i>}	愈伤组织诱导 Callus-inducing	1.5	5.0	4.0
Z _{1<i>j</i>}		0.5	3.0	2.0
Z _{2<i>j</i>}	芽分化 Buds differentiation	0.1	3.0	4.0
Z _{1<i>j</i>}		0.0	1.0	2.0
		X ₁ (IAA, mg L ⁻¹)	X ₂ (NAA, mg L ⁻¹)	X ₃ (KT, mg L ⁻¹)
Z _{2<i>j</i>}	生根 Roots-regenerating	1.5	1.5	0.3
Z _{1<i>j</i>}		0.5	0.5	0.1

1.3.2 数学模型的组建 一次回归正交试验设计要求每个因素都取 2 个水平, 一次回归的方程为:

$$Y_{\alpha} = B_0 + \sum_{j=1}^p B_{1j} X_{\alpha j} + \sum_{i < j} B_{ij} X_{\alpha i} X_{\alpha j} + \xi_{\alpha}$$

拟合情况的 *t* 值检验模型为 $t = [(b_0 - y_0) \times (df_{\text{剩}} + df_0)^{1/2}] / [(SS_{\text{剩}} + SS_0)^{1/2} \times (1/N + 1/m_0)^{1/2}]$

1.4 统计参数

愈伤组织诱导率=形成愈伤组织的外植体数/接种外植体数 × 100%

芽分化系数=有效芽数/接种愈伤组织数

生根率=有生根现象的芽数/接种的芽数 × 100%

2 结果与分析

2.1 建立回归方程

由试验所得数据计算各项回归系数(表 2), 并分别建立可控因子与愈伤组织诱导率、芽分化系数和生根率之间的回归方程 $Y = 86.90 + 3.34X_1 - 0.33X_2 + 1.36 X_3 + 0.94X_1 X_2 + 2.86X_1 X_3 + 2.47X_2 X_3$, $Y = 7.70 + 0.35X_1 + 1.52X_2 - 0.23X_3 - 0.09X_1 X_2 - 0.01X_1 X_3 - 0.01X_2 X_3$ 和 $Y = 299.30 + 6.39X_1 + 0.69X_2 - 0.61X_3 + 4.32X_1 X_2 - 0.57X_1 X_3 + 0.99X_2 X_3$ 。

2.2 回归方程的显著性检验

表 3 表明, 在愈伤组织诱导率的回归方程中, NAA 和 NAA 与蔗糖之间的互作达极显著水平, 蔗糖和 KT 与蔗糖

表 2 正交设计的处理组合与结果
Table 2 Treatments combination and results in orthogonal design

处理 Treatment	X_0	X_1	X_2	X_3	X_1X_2	X_1X_3	X_2X_3	Y (A, %)	Y (B)	Y (C, %)
1	1	1	1	1	1	1	1	97.58	9.78	311.26
2	1	1	1	-1	1	-1	-1	84.21	9.43	309.11
3	1	1	-1	1	-1	1	-1	91.44	6.11	296.72
4	1	1	-1	-1	-1	-1	1	87.92	7.38	303.59
5	1	-1	1	1	-1	-1	1	83.34	8.44	288.44
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	81.37	9.73	289.08
7	1	-1	-1	1	1	-1	-1	80.90	6.06	296.27
8	1	-1	-1	-1	1	1	1	88.86	5.66	295.78
9	1	0	0	0	0	0	0	86.48	7.84	297.56
10	1	0	0	0	0	0	0	85.17	5.71	299.99
11	1	0	0	0	0	0	0	88.65	8.56	301.56
a_j	11	8	8	8	8	8	8	$\sum Y=955.92$	$\sum Y=84.7$	$\sum Y=3289.36$
B_j	A	955.90	26.68	-2.62	10.90	7.48	22.88	19.78	$SS_{\text{总}}=232.27$	
b_j		86.90	3.34	-0.33	1.36	0.94	2.86	2.47	$SS_{\text{总}}=226.02$	
u_j			88.90	0.86	14.85	6.99	65.43	8.90	$SS_{\text{总}}=6.25$	
B_j	B	84.70	2.81	12.17	-1.81	-0.73	-0.03	-0.07	$SS_{\text{总}}=26.19$	
b_j		7.70	0.35	1.52	-0.23	-0.09	-0.01	-0.01	$SS_{\text{总}}=19.98$	
u_j			0.99	18.51	0.41	0.07	0.00	0.00	$SS_{\text{总}}=6.21$	
B_j	C	3289.30	51.11	5.53	-4.87	34.59	-4.57	7.89		$SS_{\text{总}}=516.14$
b_j		299.03	6.39	0.69	-0.61	4.32	-0.57	0.99		$SS_{\text{总}}=493.27$
u_j			326.53	3.82	2.96	149.56	2.61	7.78		$SS_{\text{总}}=22.87$

$a_j = \sum X_j^2$, $B_j = \sum X_j Y$, $b_j = B_j / a_j$, $u_j = B_j^2 / a_j$.

A, B 和 C 分别表示出愈率、芽分化系数和生根率。

A, B, and C represent callus-inducing rate, buds differentiation coefficient and roots-regenerating rate respectively.

表 3 回归方程的显著性检验
Table 3 Significance test of regression equation

	变异来源 Variation origin	df	SS	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
A	X_1	1	88.98	88.98	57.04**	6.60	16.26
	X_2	1	0.86	0.86	0.55	6.60	16.26
	X_3	1	14.85	14.85	9.52*	6.60	16.26
	X_1X_2	1	6.99	6.99	4.48	6.60	16.26
	X_1X_3	1	65.43	65.43	41.94**	6.60	16.26
	X_2X_3	1	8.90	8.90	7.71*	6.60	16.26
	回归 Regression	6	226.02	37.67			
	剩余 Remnant	4	6.25	1.56			
	总变异 Total variation	10	232.27				
B	X_1	1	0.99	0.99	0.64	6.60	16.26
	X_2	1	18.51	18.51	11.95*	6.60	16.26
	X_3	1	0.41	0.41	0.26	6.60	16.26
	X_1X_2	1	0.07	0.07	0.04	6.60	16.26
	X_1X_3	1	0.00	0.00	0.00	6.60	16.26
	X_2X_3	1	0.00	0.00	0.00	6.60	16.26
	回归 Regression	6	19.98	3.33			
	剩余 Remnant	4	6.21	1.55			
	总变异 Total variation	10	26.19				
C	X_1	1	326.53	326.53	57.09**	6.60	16.26
	X_2	1	3.82	3.82	0.67	6.60	16.26
	X_3	1	2.96	2.96	0.52	6.60	16.26
	X_1X_2	1	149.56	149.56	26.15**	6.60	16.26
	X_1X_3	1	2.61	2.61	0.47	6.60	16.26
	X_2X_3	1	7.78	7.78	1.36	6.60	16.26
	回归 Regression	6	493.27	82.21			
	剩余 Remnant	4	22.87	5.72			
	总变异 Total variation	10	516.14				

* 代表 $F > F_{0.05}$, ** 代表 $F > F_{0.01}$ 。A, B 和 C 分别表示出愈率、芽分化系数和生根率。

* and ** mean significant difference at 0.05 and at 0.01 probability levels respectively. A, B, and C represent callus-inducing rate, buds differentiation coefficient and roots-regenerating rate respectively.

之间的互作达显著水平, 而 KT 和 NAA 与 KT 之间的互作均不显著; 在芽分化系数的回归方程中, 只有 KT 达显著水平, 而其他因子表现均不显著; 在生根率的回归方程中, 只有 IAA 和 IAA 与 NAA 之间的互作达极显著水平, 其他因子表现均不显著。因此可将其平方和及自由度并入剩余项, 进行第二次显著性检验分析。

表 4 表明, 愈伤组织诱导率除与 NAA 和蔗糖之间的互作不显著外, 与其他因子的回归达显著水平, 因此愈伤组织诱导的回归方程可简化为 $Y = 86.90 + 3.34X_1 + 1.36X_3 + 2.86X_1X_3$; 芽分化系数与 KT 达极显著, 因此芽分化系数的回归方程可简化为 $Y = 7.70 + 1.52X_2$; 生根率与 IAA 和 IAA×NAA 达极显著, 因此生根的回归方程可简化

表 4 回归方程的第二次显著性检验
Table 4 The second significance test of regressive equation

变异来源 Variation origin	df	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}	
A	X ₁	1	88.98	88.98	37.86**	5.99	13.74
	X ₃	1	14.85	14.85	6.32*	5.99	13.74
	X ₁ X ₃	1	65.43	65.43	27.84**	5.99	13.74
	X ₂ X ₃	1	8.90	8.90	3.79	5.99	13.74
	回归 Regression	4	218.17	54.54			
	剩余 Remnant	6	14.10	2.35			
总变异 Total variation	10	232.27					
B	X ₂	1	18.51	18.51	21.78**	5.12	10.56
	回归 Regression	1	18.51	18.51			
	剩余 Remnant	9	7.68	0.85			
	总变异 Total variation	10	26.19				
C	X ₁	1	326.53	326.53	54.42**	5.32	11.26
	X ₁ X ₂	1	149.56	149.56	29.91**	5.32	11.26
	回归 Regression	2	476.10	238.05			
	剩余 Remnant	8	40.04	5.00			
	总变异 Total variation	10	516.14				

*代表 $F > F_{0.05}$; **代表 $F > F_{0.01}$ 。A, B 和 C 分别表示出愈率、芽分化系数和生根率。

* and ** mean significant difference at 0.05 and at 0.01 probability levels respectively. A, B, and C represent callus-inducing rate, buds differentiation coefficient and roots-regenerating rate respectively.

为 $Y = 299.30 + 6.39X_1 + 4.32X_1X_2$ 。

2.3 回归方程的拟合检验

上述回归关系显著, 只说明一次回归方程在试验点上与试验结果拟合得好, 至于被研究的整个回归区域内部, 特别是中心区域拟合得如何, 还要进一步做回归方程的拟合检验。愈伤组织诱导率零水平重复试验的偏差平方和:

$$SS_0 = \sum_{j=1}^3 (Y_{0j} - \bar{Y}_0)^2 = 6.18$$

$$t_{愈伤组织诱导率} = [(b_0 - y_0) \times (df_{剩} + df_0)^{1/2}] / [(SS_{剩} + SS_0)^{1/2} \times (1/N + 1/m_0)^{1/2}]$$

$$= [(86.90 - 86.77) \times (6 + 2)^{1/2}] / [(14.1 + 6.18)^{1/2} \times (1/11 + 1/2)^{1/2}] = 0.11$$

芽分化系数零水平重复试验的偏差平方和:

$$SS_0 = \sum_{j=1}^3 (Y_{0j} - \bar{Y}_0)^2 = 4.4$$

$$t_{芽分化系数} = [(b_0 - y_0) \times (df_{剩} + df_0)^{1/2}] / [(SS_{剩} + SS_0)^{1/2} \times (1/N + 1/m_0)^{1/2}]$$

$$= [(7.70 - 7.37) \times (9 + 2)^{1/2}] / [(7.68 + 4.4)^{1/2} \times (1/11 + 1/2)^{1/2}] = 0.41$$

生根率零水平重复试验的偏差平方和:

$$SS_0 = \sum_{j=1}^3 (Y_{0j} - \bar{Y}_0)^2 = 8.12$$

$$t_{生根率} = [(b_0 - y_0) \times (df_{剩} + df_0)^{1/2}] / [(SS_{剩} + SS_0)^{1/2} \times (1/N + 1/m_0)^{1/2}]$$

$$= [(299.3 - 298.7) \times (8 + 2)^{1/2}] / [(40.04 + 8.12)^{1/2} \times (1/11 + 1/2)^{1/2}] = 0.36$$

求得 $t_{愈伤组织诱导率} < t_{(11, 0.05)} = 2.201$ 、 $t_{芽分化系数} < t_{(8, 0.05)} = 2.306$ 、 $t_{生根率} < t_{(10, 0.05)} = 2.228$, 表明平均效应 b_0 项与零水平重复试验实测数据的算术均数之间无显著差异, 这就说明回归方程在回归区域中心拟合得较好, 回归方程可以用来在回归区域内部进行预报。

2.4 利用回归方程进行预报

根据表 4 中的剩余平方和及零水平重复试验的实测值相对于试验平均效应偏差平方和, 所预报的标准误差如下:

$$S_{愈伤组织诱导率} = (SS_{剩} / df_{剩})^{1/2} = (14.1/6)^{1/2} = 2.35^{1/2} = 1.53$$

$$S_{芽分化系数} = (SS_{剩} / df_{剩})^{1/2} = (7.68/9)^{1/2} = 0.85^{1/2} = 0.92$$

$$S_{生根率} = (SS_{剩} / df_{剩})^{1/2} = (40.04/8)^{1/2} = 5.00^{1/2} = 2.24$$

如果选定 95% 的置信概率进行预报, 则预报方程如下:

$$Y_{愈伤组织诱导率} = y \pm t_{0.05} \times S = 86.90 + 3.34X_1 + 1.36X_3 + 2.86X_1X_3 \pm 0.17$$

$$Y_{芽分化系数} = y \pm t_{0.05} \times S = 7.70 + 1.52X_2 \pm 0.40$$

$$Y_{生根率} = y \pm t_{0.05} \times S = 299.30 + 6.39X_1 + 4.32X_1X_2 \pm 0.81$$

今分别设愈伤组织诱导培养基配方为 1.0 mg L⁻¹ 萘

乙酸、 4.0 mg L^{-1} 激动素和 3% 蔗糖; 芽分化培养基配方为 0.05 mg L^{-1} 萘乙酸、 2.0 mg L^{-1} 激动素和 3% 蔗糖; 生根培养基配方为 1.0 mg L^{-1} 萘乙酸、 1.0 mg L^{-1} 激动素和 2% 蔗糖。因此将 X_1 、 X_2 和 X_3 编码全部变换为 0.5, 代入预报方程分别获得愈伤组织诱导率 $Y=(89.97 \pm 0.17)\%$, 芽分化系数 $Y=8.46 \pm 0.40$, 生根率 $Y=(303.58 \pm 0.81)\%$ 。在培养基配方与本试验条件相近的情况下, 其预报愈伤组织诱导率在 89.8%~90.14%、芽分化系数在 8.06~8.86、生根率在 302.97%~304.39% 的可靠程度为 95%。

3 讨论

正交设计是根据数理统计学观点, 以正交性原理, 对多个因素同时进行考查, 在各个因素都处于变动的情况下, 用一套规范化的正交表来合理地安排试验, 它可以较少的试验获得精度较高的回归方程。有关植物组织培养中的正交试验设计方法也有报道, 而本文的特点在于以回归设计方程进行预报, 更精确地筛选桂花草组织培养中所用的各植物激素的浓度配比, 既保留了正交试验设计的优点, 又达到浓度优化的目的。

利用正交试验设计, 分别建立了可控因子与愈伤组织诱导率、芽分化系数和生根率之间的回归方程。愈伤组织诱导率与培养基中的 NAA、NAA × 蔗糖互作和蔗糖有关; 芽分化系数只与激动素有关; 而生根率不仅与 IAA 有关, 而且还与 IAA 和 NAA 之间的互作有关。

References

- [1] Edye L A, Cameron D F. Prospects for *Stylosanthes* Improvement and Utilization. In: Edye L A ed. *The Biology and Agronomy of Stylosanthes*. Sydney: Academic Press, 1984. pp 571-587
- [2] Clements R J. Pasture for prosperity the future for new tropical pasture plants. *Trop Grass*, 1996, 30: 31-36
- [3] Edye L A, Mass B L. Recent advances in studies of an tyracnose of *Stylosanthes*. *Trop Grass*, 1997, 31: 417-423
- [4] Rodrigo S. Agrobacterium-mediated transformation of *stylosanthes guianensis* and production of transgenic plant. *Plant Sci*, 1994, 96: 119-127
- [5] Gillies A C, Abbott R J. Phylogenetic relationships in the genus *Stylosanthes* based upon chloroplast DNA variation. *Plant Syst Evol*, 1996, 200: 193-211
- [6] Kelemu S, Badel J L, Moreno C X, Miles J W. Virulence spectrum of South American isolates of *Collectotrichum gloeosporioides* on selected *Stylosanthes guianensis* genotype. *Plant Dis*, 1996, 80: 1355-1358
- [7] Jiang C-S(蒋昌顺). Utilization and studies of *Stylosanthes* spp. *Trop Crop Res*(热带作物研究), 1995, 15(3): 64-70 (in Chinese with English abstract)
- [8] Liang Y-C(梁英彩), Lai Z-Q(赖志强), Teng S-H(滕少花), Huang Z-C(黄致城), Feng J(冯军). Studies on breeding of *stylosanthes* 907. *Acta Paratacultural Sci*(草业科学), 1998, (2): 27-29 (in Chinese with English abstract)
- [9] Yi K-X(易克贤), Huang J-S(黄俊生), Liu G-D(刘国道), Weeds P, Charkraborty S. Genetic diversity analysis of styloanthracnose pathogens using random amplified polymorphic DNA. *Acta Microbiol Sin*(微生物学报), 2003, 43(3): 379-387(in Chinese with English abstract)
- [10] Wang D-M(王冬梅), Tang Y-Q(唐燕琼), Zhuo P(周鹏). An investigation of approaches to optimize gene transformation system of *Stylosanthes guianensis* Reyan. *Acta Paratacultural Sci*(草业科学), 2005, 22(10): 25-30 (in Chinese with English abstract)
- [11] Jiang C-S(蒋昌顺), Jia H-S(贾虎森), Ma X-R(马欣容), Zou D-M(邹冬梅), Zhang Y-Z(张义正). AFLP analysis of genetic variability among *Stylosanthes guianensis* accessions resistant and susceptible to the styloanthracnose. *Acta Bot Sin*(植物学报), 2004, 46(4): 480-488 (in Chinese with English abstract)
- [12] Jiang C-S(蒋昌顺), Zhang X-S(张新申). RAPD analysis of genetic variability among *Stylosanthes guianensis* accessions resistant and susceptible to styloanthracnose. *Chin J Trop Crops*(热带作物学报), 2005, 26(3): 61-67 (in Chinese with English abstract)
- [13] Jiang C-S(蒋昌顺). The progress of studies on *Stylosanthes*. *Chin J Trop Crops*(热带作物学报), 2005, 26(4): 104-108 (in Chinese with English abstract)
- [14] Tang S-H(汤绍虎), Sun M(孙敏), Zhou Q-G(周启贵), Li D-G(李道高), Liu Z-H(刘照会). Studies on getting bacteria-free explants of pear by applying orthogonal design. *J South-West China Nor Univ* (西南师范大学学报), 2004, 29(2): 282-284 (in Chinese with English abstract)
- [15] Sun L(孙丽), Zhao L(赵露). Effect of medium on callus of two different plants with orthogonal test design combinations. *J Jilin Univ*(吉林大学学报), 2006, 36(4): 628-634 (in Chinese with English abstract)
- [16] Han X-H(韩秀慧), Yin W-L(尹伟伦), Wang H-F(王华芳). Application of quadratic regressive factorial experiment to in vitro culture of miniature rose. *Sci Silvae Sin*(林业科学), 2004, 40(4): 189-192 (in Chinese with English abstract)
- [17] Zhong J(钟军), Zhi X-D(智旭丹), Yang B(杨波). Study on tissue culture of *stylosanthes*. *J Hunan Agric Univ*(湖南农业大学学报), 2006, 32(5): 494-496 (in Chinese with English abstract)