

NAA 和 2, 4-D 对甘草愈伤组织细胞染色体倍性及次生代谢物的影响

黄惠英^{1,4}, 马文芳², 陈晓燕³, 王 清^{1,2*}

1. 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070

2. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070

3. 兰州大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730070

4. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070

摘要: **目的** 建立甘草愈伤组织细胞高频染色体加倍体系, 为获得高产量药效成分的甘草品系奠定基础。**方法** 采用组织培养法对甘草子叶、下胚轴和胚根进行愈伤组织诱导和染色体加倍; 利用紫外分光光度法检测愈伤组织甘草酸、甘草总黄酮的量。**结果** NAA、2, 4-D 不同质量浓度及配比对不同外植体愈伤组织染色体倍性变异具有显著的影响, 其中下胚轴 $2n > 14$ 和 $2n = 28$ 的细胞频率明显高于子叶和胚根, 平均为 42.38% 和 25.19%; 且子叶、下胚轴及胚根分别在 2.0 mg/L NAA、2.0 mg/L 2, 4-D 以及 1.0 mg/L 2, 4-D 下, $2n > 14$ 和 $2n = 28$ 的细胞频率最高, 分别为 61.50%、39.20%、63.00%、36.23%、63.50%、37.50%。此外, NAA、2, 4-D 对愈伤组织中甘草酸、甘草总黄酮具有明显的促进效应, 在 1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L 2, 4-D 组合下, 子叶愈伤组织的甘草酸和甘草总黄酮量均达到最高, 分别为 52.13 mg/g 和 8.36 mg/g; 在 2 mg/L NAA 下, 下胚轴愈伤组织甘草酸及甘草总黄酮量最高, 分别为 49.01 mg/g 和 8.54 mg/g。相关分析表明, 愈伤组织中甘草酸、甘草总黄酮量与 $2n = 28$ 的细胞频率呈正相关。**结论** NAA、2, 4-D 对愈伤组织细胞染色体加倍及甘草酸、甘草总黄酮量提高具有显著的促进作用, 通过染色体加倍有可能获得高产量药效成分的甘草品系。

关键词: 甘草; NAA; 2, 4-D; 染色体倍性; 甘草酸; 甘草总黄酮

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)10-2104-06

Effect of naphthalenecacetic acid and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on callus cell ploidy and secondary metabolites of *Glycyrrhiza uralensis*

HUANG Hui-ying^{1,4}, MA Wen-fang², CHEN Xiao-Yan³, WANG Qing^{1,2}

1. Gansu Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Germplasm Enhancement, Lanzhou 730070, China

2. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

3. College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730070, China

4. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Objective To establish the system of high frequency chromosome doubling and to lay the foundation for obtaining the strain of licorice with a high active ingredient content. **Methods** Exogenous hormone of naphthalenecacetic acid (NAA) and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) were used to induce callus of *Glycyrrhiza uralensis* explants from cotyledons, hypocotyls, and radicle, and the effect of NAA and 2, 4-D were tested on callus cell ploidy and content of secondary metabolites. **Results** The result showed that there were significant effects of NAA and 2, 4-D with different concentrations on cell ploidy of different explants callus. The frequency of cell with chromosome $2n > 14$ and $2n = 28$ was significantly higher in hypocotyls callus than those in cotyledons and radicle. They were up to 42.38% and 25.19%, respectively. Meanwhile, the frequency of cell with $2n > 14$ and $2n = 28$ in cotyledons, hypocotyls, and radicle callus all reached the highest under the concentration of 2.0 mg/L NAA, 2.0 mg/L 2, 4-D, and 1.0 mg/L 2, 4-D, respectively. They were up to 61.50%, 39.20%, 63.00%, 36.23%, 63.50%, and 37.50%, respectively. The doubling rate of callus cell increased by the extension of cultured time. Furthermore, there were significant effects of NAA and 2, 4-D on promoting the contents of glycyrrhizic acid and licorice flavanone. The contents of glycyrrhizic acid and licorice flavanone of cotyledons callus reached the highest on MS medium with 1.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L 2, 4-D, they were up to 52.13 mg/g and 8.36 mg/g, respectively.

收稿日期: 2010-12-26

基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目 (0803RJZA032)

作者简介: 黄惠英 (1959—), 女, 河南鄢陵人, 主要从事作物遗传育种的研究。E-mail: huanghy@gsau.edu.cn

*通讯作者 王 清 Tel: (0931)7631875 E-mail: wangqing@gsau.edu.cn

And the contents in hypocotyls callus reached the highest on MS medium with 2 mg/L NAA, they were up to 49.01 mg/g and 8.54 mg/g, respectively. Besides the contents of glycyrrhizic acid and licorice flavanone showed positive correlation with chromosome doubling frequency of callus cell. **Conclusion** There are significant effects of NAA and 2, 4-D with different concentrations to promote chromosome doubling and the content increasing of glycyrrhizic acid and licorice flavanone in different explants callus. It suggests that perhaps the new material in licorice with higher pharmacodynamic components will be obtained by chromosome doubling.

Key words: licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.); NAA; 2, 4-D; chromosome ploidy; glycyrrhizic acid; licorice flavanone

国内外学者在甘草生物学、化学、药理学、栽培技术等方面已做了大量的研究^[1-3],取得了丰硕的成果,为甘草资源的开发、利用和保护奠定了基础。但目前甘草生产中仍然存在着许多急需解决的问题,如人工种植甘草的品质普遍不能满足国内外市场的要求^[1],甘草病害(根腐病、锈病、褐斑病、猝倒病、白粉病等)未能很好地解决^[4],同种甘草在不同生产地主要药效成分不稳定^[5],以及种子市场的混乱,种子质量差、发芽率低等影响甘草产量和质量的限制因素^[6]。近年来,由于野生甘草资源的匮乏和国家保护野生资源力度的加大,人工栽培甘草成为获取商品甘草的重要手段,甘草的品质改良逐渐受到重视^[7-8]。然而,甘草的品质改良和育种工作还很滞后,相关报道也很少。

细胞工程技术,尤其是细胞染色体加倍技术已经成为目前药用植物育种的主要途径之一。与二倍体相比,多倍体植株具有组织器官巨型性,药用活性成分含量高,抗逆性强等特点^[9-10]。自 20 世纪 80 年代以来,我国已通过多倍体育种方法先后培育出牛膝、丹参、菘蓝、当归、百合等药用多倍体新品种,但甘草多倍体的研究尚未见报道。本实验针对外源激素对甘草愈伤组织体细胞加倍及次生代谢物产量的影响进行了研究,旨在为进一步获得高药效成分、染色体加倍的甘草新材料奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

样品采自甘肃酒泉金塔县,经甘肃农业大学陈垣教授鉴定为胀果甘草($2n=2x=14$) *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的种子。甘草酸铵(110731)和柚皮苷(110722)对照品购自中国药品生物制品检定所。

愈伤组织诱导培养基:以 MS+1.0 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤(BAP)为基本培养基,在此基础上分别添加质量浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0 mg/L NAA 和 1.0、2.0 mg/L 2, 4-D 以及 1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L 2, 4-D,形成不同生长激素种类及不同质量浓度的愈伤组织培养基。

1.2 仪器

XSP—2CB 普通光学显微镜(上海上光新光学科技有限公司); Motic B1 数码显微镜(深圳拓天仪器设备有限公司); WT700—格兰仕微波炉(格兰仕微波炉电器有限公司); U2800 型紫外-可见分光光度计(Hitachi 公司)。

2 方法

2.1 愈伤组织诱导及细胞倍性检查

70%乙醇浸泡种子 1 min, 0.1%升汞溶液浸泡种子 10 min, 无菌水冲洗 3 次后,接种于不含任何激素的 MS 培养基中发芽。待子叶完全展开,将子叶剪成小块,下胚轴和胚根剪成小段接入不同激素配比的培养基中进行愈伤组织诱导。每一种外植体在各种激素配比培养基中接种 100~120 块(段),并置于光强 2 000 lx, 温度(25 ± 1)℃的光照培养箱中,每隔 20 d 继代 1 次。于愈伤组织培养 40 d 时进行细胞染色体数目检查,随机取每一激素组合下生长的愈伤组织 10 块,于卡诺固定液中固定 4 h 以上,蒸馏水冲洗后加入少量 HCl,置于(60 ± 1)℃的恒温水浴锅中酸解 8 min,改良品红染色后,分 3 次压片;在光学显微镜下观察并计数 60 个以上具有中期分裂相细胞的染色体数。计算愈伤组织频率和细胞染色体数目变化频率。

愈伤组织频率=形成愈伤组织的外植体小块数/接入外植体小块总数

细胞染色体数目变化频率=分裂中期相应染色体数目的细胞数/检测的分裂中期细胞总数

2.2 甘草酸及甘草总黄酮的联合提取及检测

2.2.1 甘草酸及甘草总黄酮的联合提取 将继代培养 40 d 的愈伤组织(子叶、下胚轴)于 60℃烘箱中烘干,研成细粉。称取愈伤组织粉末 2 g,加无水甲醇 20 mL,冷浸 30 min 后放入微波炉;中高火辐射 3 min,离心并倒出上清液。下层残渣在同样条件下重复提取 3 次,合并 3 次提取液备用。

2.2.2 甘草酸及甘草总黄酮最大吸收波长的确定 以甘草酸铵及柚皮苷为对照品,检测甘草酸及甘草

总黄酮的量^[11]。精密称取甘草酸铵及柚皮苷对照品，用甲醇分别配成 0.424 mg/mL 及 1.003 mg/mL 的对照品溶液，以甲醇为对照，于 200~600 nm 的波长处扫描，获得甘草酸及甘草总黄酮的最大吸收波长分别为 237 nm 和 431 nm。

2.2.3 甘草酸及甘草总黄酮的测定 吸取愈伤组织提取液 0.2 mL，用甲醇溶液定容至 50.00 mL，以甲醇为对照，紫外可见分光光度计检测 237 nm 处吸光度。吸取愈伤组织液 0.5 mL，加入 2.5 mL 甲醇和 1.25 mL 10% KOH 溶液，室温放置 5 min 后用甲醇定容至 25.0 mL，以甲醇为对照，紫外分光光度计检测 431 nm 处的吸光度。以吸光度为横坐标 (X)，甘草酸铵及柚皮苷质量浓度为纵坐标 (Y)，绘制甘草酸铵标准曲线， $Y=0.000\ 6+0.173\ 5X$ ($r=0.998\ 3$) 及柚皮苷标准曲线 $Y=0.000\ 4+0.045\ X$ ($r=0.995\ 9$)，计算出样品中甘草酸及甘草总黄酮的量。

2.3 统计分析

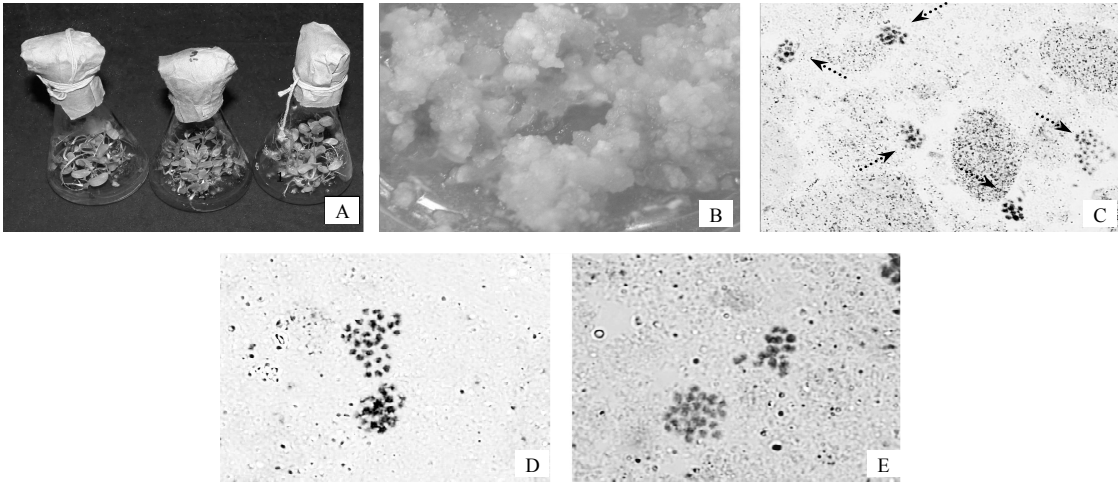
采用 SPSS 15.0 数据处理系统进行数据分析及相关系数计算。

3 结果与分析

3.1 NAA 与 2, 4-D 对愈伤组织细胞染色体倍性的影响

3.1.1 不同外植体愈伤组织细胞倍性的变化 将甘草子叶、下胚轴、胚根外植体接入含有不同外源生长素及配比的培养基中进行愈伤组织诱导(图 1-A、1-B)，40 d 后检查愈伤组织细胞染色体倍性，发现不同外植体愈伤组织细胞均存在明显的亚倍体现象(图 1-D、1-E)，且细胞的染色体倍性变异频率明显不同，子叶及下胚轴染色体 $2n>14$ 的细胞频率明显高于胚根，染色体 $2n=28$ 平均加倍率分别为 24.79% 和 25.19%，而染色体 $2n>28$ 的加倍细胞在下胚轴和胚根中较高，分别为 4.46% 和 4.11%，见表 1。

3.1.2 NAA 与 2, 4-D 对愈伤组织染色体倍性的影响 不同质量浓度的 NAA、2, 4-D 显著影响愈伤组织细



A-甘草无菌种苗 B-甘草愈伤组织 C-愈伤组织细胞分裂中期染色体分布(箭头所示) D-四倍体($2n=28$)及亚倍体细胞染色体 E-二倍体($2n=14$)及亚倍体细胞染色体
A-plantlets of licorice *in vitro* B-callus of licorice C-arrows show chromosome in medium term of callus cell division D-chromosome of tetraploid with $2n=28$ and of hypoploid E -chromosome of diploid with $2n=14$ and of hypoploid

图 1 甘草愈伤组织及其细胞分裂中期的染色体
Fig. 1 Callus of licorice and chromosome in division metaphase

表 1 不同外植体愈伤组织的诱导频率和染色体倍性变化频率

外植体类型	愈伤组织频率/%	愈伤组织细胞染色体数目变化频率/%				
		$2n=14$	$14<2n<28$	$2n=28$	$2n>28$	$2n>14$
子叶	90.96	60.76	11.71	24.79 ^a	3.78	39.76 ^b
下胚轴	94.95	57.88	12.99	25.19 ^a	4.46	42.38 ^a
胚根	88.22	64.11	11.45	21.25 ^b	4.11	36.35 ^c

不同小写字母代表显著水平 $P<0.05$
Different small letters represent significant level $P<0.05$

胞倍性。当 NAA 为 0.1 mg/L 时, 子叶、胚根愈伤组织细胞倍性未发生任何改变, 仅下胚轴 3.75% 细胞倍性发生了改变。随着 NAA 质量浓度的升高, $2n>14$ 、 $2n=28$ 和 $2n>28$ 的细胞频率逐渐升高, 且在 2.0 mg/L NAA 下达到最高, 其中 $2n>14$ 、 $2n=28$ 的细胞频率在子叶、下胚轴和胚根中分别为 61.50%、39.20%、56.25%、35.50% 和 47.50%、29.60%。另外, 下胚轴愈伤组织在两种质量浓度 2, 4-D 下也有相同的趋势, 并在 2.0 mg/L 下 $2n>14$ 、 $2n=28$ 的细胞频率最高, 分别为 63.00%、36.23%。但子叶、胚根却在 1.0 mg/L 2, 4-D 下 $2n>14$ 、 $2n=28$ 的细胞频率最高, 分别为 58.25%、36.47% 和 63.5%、37.5% (图 2~4)。

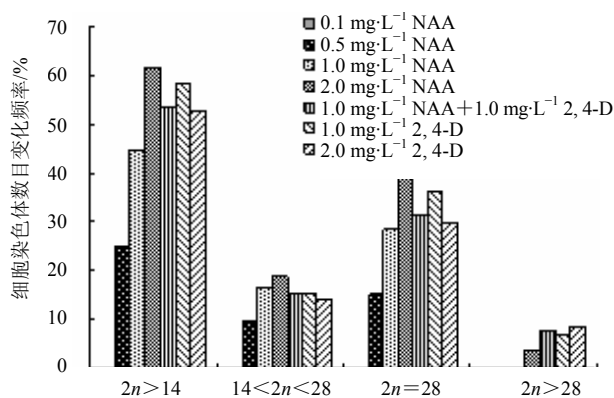


图 2 NAA 和 2, 4-D 对子叶愈伤组织染色体倍性的影响

Fig. 2 Effects of NAA and 2, 4-D to chromosome ploidy of hypocotyls callus

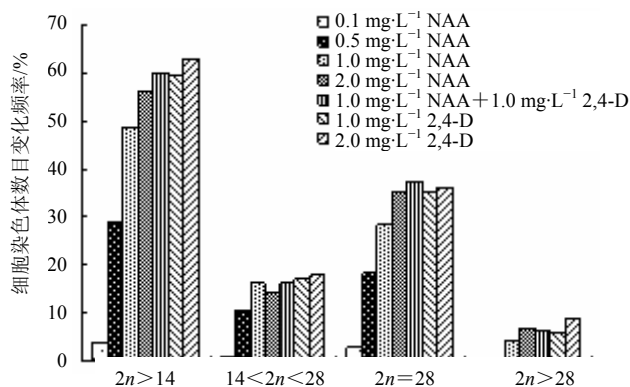


图 3 NAA 和 2, 4-D 对下胚轴愈伤组织染色体倍性的影响

Fig. 3 Effects of NAA and 2, 4-D on chromosome ploidy of cotyledons callus

比较 1.0、2.0 mg/L NAA 与 1.0、2.0 mg/L 2, 4-D 下愈伤组织细胞倍性的平均变异频率, 发现 2, 4-D 的效应明显大于 NAA; 尤其在下胚轴和胚根愈伤组织细胞中更为明显, 其 $2n>14$ 、 $2n=28$ 及 $2n>28$ 的细胞频率分别比 NAA 高 14.36%、10.79%、26.28%

(下胚轴) 和 27.54%、24.35%、61.98% (胚根)。另外, 除子叶、下胚轴 $2n>14$ 细胞频率及 3 种外植体 $2n>28$ 细胞频率明显高于 1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L 2, 4-D 组合外, 其他类型的细胞频率在 2, 4-D 及 1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L 2, 4-D 间没有差异 (图 5)。

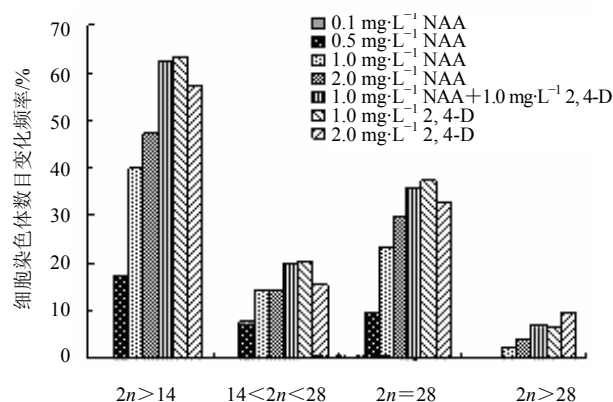


图 4 NAA 和 2, 4-D 对胚根愈伤组织染色体倍性的影响

Fig. 4 Effects of NAA and 2, 4-D to chromosome ploidy of radicle callus

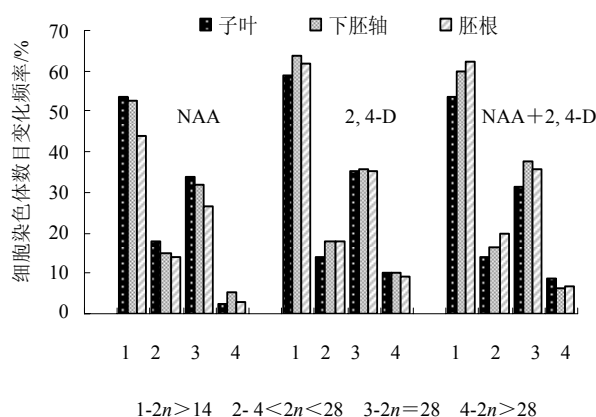


图 5 NAA 和 2, 4-D 及其组合下愈伤组织细胞倍性的平均变异频率

Fig. 5 Mean variation frequency of chromosome poildy from callus cells cultured in medium with NAA, 2, 4-D, and NAA+2, 4-D

3.2 NAA 与 2, 4-D 对愈伤组织甘草酸和甘草总黄酮量的影响

统计结果表明, 子叶、下胚轴愈伤组织甘草酸、甘草总黄酮的平均量没有差异, 分别为 41.30、5.93 mg/g 和 40.47、5.06 mg/g, 见表 2。但在 7 种 NAA 和 2, 4-D 不同组合下, 愈伤组织中甘草酸、甘草总黄酮却有显著差异。其中, 子叶愈伤组织中甘草酸和甘草总黄酮量有随 NAA 质量浓度的增加而提高的趋势, 并在 1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L 2, 4-D 激素

表 2 外源激素对愈伤组织甘草酸和甘草总黄酮量的影响

Table 2 Effects of different exogenous hormone on contents of glycyrrhizic acid and licorice flavanone of callus

NAA/(mg·L ⁻¹)	2, 4-D/(mg·L ⁻¹)	外植体类型	甘草酸/(mg·g ⁻¹)	甘草总黄酮/(mg·g ⁻¹)	染色体 2n=28 的细胞频率/%
0.1	—	子叶	16.04 cC	1.12 eE	0
		下胚轴	24.31 eD	1.60 eD	3.00
0.5	—	子叶	45.31 bB	6.05 cC	15.25
		下胚轴	40.56 cdBC	4.08 dC	18.18
1.0	—	子叶	43.11 bB	4.86 dD	28.50
		下胚轴	45.19 abAB	6.83 bB	28.45
2.0	—	子叶	46.06 bAB	8.40 aA	39.20
		下胚轴	49.01 aA	8.54 aA	35.50
1.0	1.0	子叶	52.13 aA	8.36 aA	37.23
		下胚轴	45.48 abAB	5.29 cC	37.65
—	1.0	子叶	41.26 bB	5.77 Cc	37.82
		下胚轴	41.78 bcBC	4.74 cdC	36.50
—	2.0	子叶	45.19 bB	6.96 bB	29.55
		下胚轴	39.98 ^{dC}	4.33 dC	36.23
平 均		子叶	41.30 a	5.93 a	27.17
		下胚轴	40.47 a	5.06 a	27.79

大小写字母分别代表 1% ($P < 0.01$) 和 5% ($P < 0.05$) 的差异显著水平

The capital letter and small letter represent significant level of 1% ($P < 0.01$) and 5% ($P < 0.05$), respectively

配比下甘草酸量最高 (52.13 mg/g); 此激素配比及 2 mg/L NAA 质量浓度下甘草总黄酮量最好, 分别为 8.36 mg/g 和 8.40 mg/g。下胚轴中甘草酸及甘草总黄酮量也随 NAA 质量浓度的增加而提高, 但在 2 mg/L NAA 下表现最好, 分别为 49.01 mg/g 和 8.54 mg/g, 当 NAA 和 2, 4-D 分别为 1.0 mg/L, 以及随 2, 4-D 质量浓度增加时, 甘草酸、甘草总黄酮量反而有下降的趋势 (表 2)。

对不同组合下四倍体 $2n=28$ 的细胞频率与甘草酸、甘草总黄酮量进行相关分析, 发现子叶中甘草酸、甘草总黄酮量及下胚轴甘草酸量与相应外源激素水平下诱导的愈伤组织 $2n=28$ 细胞频率呈显著的正相关, r 分别为 0.82、0.85、0.84。

4 讨论

生长素和细胞分裂素在调节细胞生长和发育中具有重要作用, 本实验采用不同质量浓度的 2, 4-D、NAA 组合诱导愈伤组织并调查愈伤组织细胞倍性和甘草酸、甘草总黄酮量的变化, 发现不同外植体在所有供试培养基中均易形成愈伤组织^[12]。

利用组织培养进行染色体加倍是倍性育种的主要途径之一。本实验在对培养 40 d 的 3 种甘草外植体愈伤组织细胞倍性检查时, 发现培养基中 NAA

或 2, 4-D 质量浓度超过 1.0 mg/L 时, $14 < 2n < 28$ 、 $2n=28$ 和 $2n > 28$ 的细胞频率急剧上升, 且四倍体细胞占到 23.40%~39.20%。外植体形成愈伤组织及愈伤组织继代培养过程中, 普遍存在细胞的染色体数目变异^[13-14], 有学者认为, 染色体数目变异与愈伤组织培养中细胞分裂期间纺锤体功能受阻有关, 由于纺锤丝受阻, 使细胞的有丝分裂变成无丝分裂, 从而形成多核细胞; 当多核细胞核同步分裂时就会发生核融合而产生多倍体^[14-16]。也有学者认为, 已存在植物体内的多倍体细胞在形成愈伤组织的过程中, 由于启动其分裂也可导致多倍体细胞的增加^[16]。因此, 实验中愈伤组织染色体数目的变化, 除具有组织的自然变异外, 更多是由于外源激素水平所致。本研究中, 在附加 0.1 mg/L NAA 的 MS 对照培养基中, 愈伤组织染色体数目几乎全部正常, 而当 NAA 质量浓度增加以及 2, 4-D 替代 NAA 后, 愈伤组织细胞的染色体数目变化频率呈上升趋势, 可见生长素的种类与质量浓度不同在染色体加倍中的效应不同。因此, 在成功诱导愈伤组织后, 如何使细胞经历多倍化途径, 无疑是染色体加倍方法的关键所在, 也是通过倍性育种获得高药效成分甘草品系的关键所在。

甘草酸、甘草总黄酮是甘草中的两种主要有效成分^[17-18],关系到人工栽培甘草的质量与品质。故提高甘草酸、甘草总黄酮量应作为甘草品质育种的主要内容之一。本实验发现,随着外源生长素质量浓度的提高,甘草愈伤组织亚倍体及加倍细胞频率有逐渐升高的趋势,同时甘草酸、甘草总黄酮的量也随之升高,这一结果与梁玉玲等^[18]的实验相符。以往,人们认为外源激素是导致愈伤组织次生代谢产物或细胞合成化合物量发生改变的原因;本实验结果表明,2*n*=28的细胞频率与甘草酸、甘草总黄酮量呈正相关,这可能说明外源生长素能够改变愈伤组织细胞染色体数目的变异,正是由于细胞染色体加倍从而导致甘草酸、甘草总黄酮量的改变,因为染色体加倍意味着与次生代谢产物相关的基因表达量也会增加。当然,这一推测有待在今后的实验中进一步论证,但可以尝试通过染色体加倍创造多倍体甘草植株来获得高药效成分的甘草新材料。

参考文献

- [1] 郝心敏,王德军,杜建喜,等.栽培甘草的质量考察[J].内蒙古中医药,2002,1:40-41.
- [2] 彭励,胡正海.甘草生物学及化学成分的研究进展[J].中草药,2005,36(11):1744-1747.
- [3] 马君义,张继,王一峰,等.乌拉尔甘草根挥发性化学成分的分析研究[J].草业学报,2006,15(1):120-123.
- [4] 高立原,杨彩霞,刘浩.宁夏甘草病虫害记述[J].植物保护,2002,28(4):30-32.
- [5] 陆嘉惠,李学禹,马森.国产甘草属植物的RAPD分析及其分类学研究[J].西北植物学报,2006,26(3):527-531.
- [6] 孙群,佟汉文,杨力刚.市售甘草种子的质量分析[J].中国农学通报,2005,21(3):127-131.
- [7] 王连喜,李剑萍,李琪,等.乌拉尔甘草研究现状与可持续利用对策[J].中草药,2009,40(3):496-499.
- [8] 周应群,陈士林,赵润怀.药用甘草植物资源生态学研究探讨[J].中草药,2009,40(10):1668-1671.
- [9] 乔传卓,吴美枢,戴富宝.菘蓝多倍体育种的研究[J].植物学报,1989,31(9):678-682.
- [10] 乔传卓,催煦.药用植物多倍体的应用[J].中药材科技,1981,4(4):4-6.
- [11] 李俊松,徐德生,冯怡,等.甘草中黄酮的纯化方法和含量测定[J].中成药,2007,29(7):997-1000.
- [12] 马文芳,黄惠英,王清.外源激素对甘草愈伤组织诱导及染色体加倍的影响(简报)[J].草业学报,2008,17(3):142-145.
- [13] Hao Y J, You C X, Deng X X. Effects of cryopreservation developmental competence, cytological and molecular stability of citrus callus[J]. *Cryo Letters*, 2002, 23(1): 27-35.
- [14] Mohanty B D, Paul N K, Ghosh P D. Chromosomal behaviour in callus culture of *Zea mays* L. [J]. *Cytologia*, 1986, 51: 37-41.
- [15] Lee M, Geadelmann J L, Phillips R L. Agronomic evaluation of inbred lines derived from tissue culture of maize[J]. *Theor Appl Genet*, 1988, 75: 841-849.
- [16] 高效民.植物离体培养中染色体的变异[J].细胞生物学杂志,1984(1):5-12.
- [17] 杨英,何峰,季家兴,等.四种前体对胀果甘草细胞悬浮培养生产甘草黄酮的调控效果评价[J].武汉植物学研究,2007,25(5):484-489.
- [18] 梁玉玲,管延英,阳丽,等.胀果甘草愈伤组织培养及甘草酸含量分析[J].河北大学学报:自然科学版,2000,20(4):365-368.