

# 老瓜头悬浮细胞培养及基质消耗规律的初探

胡海英 朱维宁 (宁夏大学生命科学学院, 宁夏银川 750021)

**摘要** [目的] 为老瓜头资源利用提供前期的生物技术试验参考。[方法] 以老瓜头愈伤组织为外植体, 运用正交设计试验, 进行细胞悬浮培养, 对接种量及悬浮培养基进行筛选试验研究, 并测定了老瓜头细胞悬浮培养过程中硝酸盐、氨盐、磷酸盐、蔗糖及可溶性总糖含量的消耗。[结果] 老瓜头愈伤细胞最佳液体培养基为不添加任何激素的MS培养基; 其最适接种量为40 g/L; 黑暗培养条件适合其细胞生长, 其生长周期较短, 生物量大; 在老瓜头细胞培养初期(0~9 d), 培养中的硝酸盐、氨盐、磷酸盐、蔗糖含量均呈急剧下降趋势, 分别为初始含量的7.19%、21.53%、0.28%、1.53%, 之后各自变化趋于平缓。[结论] 初步建立了老瓜头悬浮细胞培养技术体系。

**关键词** 老瓜头; 细胞培养; 培养基; 接种量; 基质消耗

中图分类号 S567.23+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)33-14453-03

## Study on the Suspension Cell Culture of *Cynanchum komarovii* Al Iljiriski and Its Matrix Consumption Laws

HU Hai-ying et al (School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

**Abstract** [Objective] The research aimed to provide the biotechnology test reference for the utilization of *Cynanchum komarovii* resources. [Method] With the calli of *C. komarovii* as explants, the orthogonal design test was used to make the cell suspension culture. The screening test was made on the inoculation amount and suspension culture media. And the consumption of nitrate, ammonia salt, phosphate, sucrose and total soluble sugar during the cell suspension culture process of *C. komarovii* were determined. [Result] The optimum liquid medium for the calli of *C. komarovii* was MS medium without adding any hormone and its suitable inoculation amount was 40 g/L. The dark culture conditions were suitable for the cell growth and it had shorter growth period and greater biomass. The content of nitrate, ammonia salt, phosphate, sucrose all showed the sharply decreasing trend during the initial cell suspension culture of *C. komarovii* (0-9 d), being 7.19%, 21.53%, 0.28% and 1.53% of the initial content respectively. And then the respective changes slowed down. [Conclusion] The suspension cell culture technology system of *C. komarovii* was preliminarily established.

**Key words** *Cynanchum komarovii* Al Iljiriski; Cell culture; Medium; Inoculation amount; Matrix consumption

老瓜头(*Cynanchum komarovii* Al Iljiriski)系萝藦科鹅绒藤属植物, 全草可入药, 性苦、温, 有毒<sup>[1]</sup>。据报道<sup>[2-3]</sup>, 老瓜头植株含有的2种主要生物碱7-脱甲氧娃儿藤次碱和氧化脱氧娃儿藤次碱均具有细胞毒性作用, 其体内化合物牡丹酚在临床上具有镇痛作用, 槲皮素具有抗炎及止咳、祛痰作用。老瓜头又是一种较好的蜜源植物, 其蜂蜜质量为中上等。在农业上从老瓜头中提取的生物碱对蚜虫、菜青虫有一定防治作用, 并对烟草花叶病毒(TMV)有特效<sup>[4]</sup>。老瓜头广泛分布于次生沙漠中的半固定沙丘和荒漠流沙区, 为强旱生适阳植物, 喜光、极为耐旱、耐高温, 有人认为老瓜头是在沙化进程中, 适应其环境而保存下来的沙漠生态型植物, 是土地严重沙质荒漠化的指示植物之一, 也是草原逆行演替过程中最后阶段的指示种。目前, 对老瓜头的开发利用还未形成规模, 只限于防风固沙、作为野生优良蜜源植物、农业杀虫剂等方面<sup>[3]</sup>。对老瓜头的抗旱机理研究以及有效成分生产利用的研究工作现已开展, 而且受到很多专家及相关研究机构的重视, 并逐渐成为宁夏银川道地野生药用植物研究的一大热点<sup>[5]</sup>。有关老瓜头组织培养方面的文献报道只有曲玲等以其茎段作为外植体, 对老瓜头的组织培养及快繁技术进行了初步研究<sup>[5]</sup>。在老瓜头细胞培养方面的研究尚未见报道。笔者根据植物细胞全能性原理和组织培养技术, 研究不同激素配比、不同接种量对老瓜头悬浮细胞生长的影响并对培养过程中主要基质消耗规律进行了初步探讨, 初步建立了老瓜头悬浮培养体系, 并为老瓜头生物碱等有效成分的利用研究提供前期的技术支持。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 供试材料为老瓜头无菌愈伤组织, 由宁夏大学

生命科学学院胡海英、叶芳芳提供<sup>[6]</sup>。

## 1.2 方法

**1.2.1 老瓜头悬浮细胞培养培养基激素的配比。**选取在固体培养基培养的质地疏松、颜色淡黄、鲜亮的愈伤组织。以MS培养基<sup>[7]</sup>为基本培养基, 蔗糖浓度为3%, 含有不同浓度的2,4-D、6-BA、NAA进行正交设计[L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>)](表1)。每处理接入愈伤组织0.8 g/50 ml, 30 d后统计鲜干重, 每处理3次重复。

**1.2.2 接种量。**设计不同接种量进行细胞悬浮培养, 即50 ml培养液分别接种0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 g愈伤细胞, 30 d后收获细胞鲜重和干重, 摇床转速为130 r/min。

**1.2.3 细胞生长周期的测定。**在试验确定培养基和接种量后, 设计光照和黑暗2种条件进行细胞悬浮培养, 接种后每3 d取不同条件下培养的悬浮细胞, 经过滤称其鲜重和干重, 绘出生长曲线。

细胞鲜重 = 鲜细胞和湿滤纸的质量 - 湿滤纸的质量

细胞干重 = 干细胞和干滤纸的质量 - 干滤纸质量

细胞生长速率 g/(L·d) = (收获干重 - 接种干重) / (培养液体积 × 培养时间)

**1.2.4 悬浮细胞培养过程中培养基主要基质含量的测定。**

**1.2.4.1 硝酸盐含量的测定。**滤液中硝酸根离子测定基本采用张志良等编写的《植物生理学试验指导》的方法<sup>[8]</sup>。根据标准曲线及回归方程计算样品中硝酸盐的含量。

硝酸根离子直线回归方程:  $y = 0.3649x + 0.5819$

$R^2 = 0.9514$

**1.2.4.2 铵盐含量的测定。**滤液中氨根离子测定基本采用上海植物生理学会编写的《现代植物生理学实验指南》的方法<sup>[9]</sup>。根据标准曲线及回归方程计算样品中铵盐含量。

氨根离子直线回归方程:  $y = 0.4245x - 0.5577$

$R^2 = 0.9443$

**1.2.4.3 磷酸根离子含量的测定。**滤液中磷酸根离子的测

基金项目 宁夏大学科学研究基金项目(NS0505)。

作者简介 胡海英(1976-), 女, 宁夏平罗人, 硕士, 讲师, 从事植物生物技术方面的研究。

收稿日期 2008-09-22

定采用张志良等编写的《植物生理学试验指导》的方法<sup>[8]</sup>。根据标准曲线及回归方程计算样品中磷酸盐含量。

磷酸根离子直线回归方程:  $y = 0.2186x + 0.022$

$$R^2 = 0.9755$$

**1.2.4.4 蔗糖、可溶性总糖的测定。**滤液中蔗糖、可溶性总糖测定采用张志良等编写的《植物生理学试验指导》的方法<sup>[8]</sup>。利用蒽酮试剂在不同反应条件下与可溶性糖发生反应,可分别测定培养基中各种残糖。根据标准曲线及回归方程计算样品中蔗糖和可溶性总糖的含量。

蔗糖直线回归方程:  $y = 0.2108x - 0.2701$

$$R^2 = 0.9898$$

可溶性总糖直线回归方程:  $y = 0.1235x - 0.1185$

$$R^2 = 0.9873$$

**1.2.5 数据分析与处理。**利用 SPSS 软件,对正交设计 [ $L_{16}(4^3)$ ] 所得鲜、干重结果进行显著性分析,利用 Microsoft

Excel 2003 软件进行 S 生长曲线的绘制,及以上各标准曲线回归分析并建立直线回归方程<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 老瓜头细胞悬浮培养体系的建立

**2.1.1 不同激素对比对老瓜头悬浮细胞生长的影响。**将淡黄、鲜亮疏松的愈伤块进行悬浮培养,不同的激素进行配比,通过直观分析与鲜、干重的统计,分析不同激素的作用差异显著性,结果见表1。

从表1中直观分析可以比较出3因素的影响力,不含有任何激素的配方中悬浮细胞生长量大,鲜重达10.601 g/瓶,干重达0.607 g/瓶,颜色淡黄,色泽鲜亮,质地疏松。用方差分析的方法可知,在试验所选的范围内,在显著性水平 = 0.05 下,2,4-D 对试验指标有显著性影响。综合因素考虑,将不添加任何激素的 MS 液体培养基作为下一步细胞悬浮培养的培养基。

表1 不同激素对比对老瓜头细胞生长的影响

Table 1 Effects of different hormone proportions on the cell growth of *Cynanchum komarovii*

试验号 Est No.	激素类型与浓度 ng/L Types and concentrations of hormone			鲜重 g/瓶 Fresh weight	干重 g/瓶 Dry weight	颜色 Color	质地 Texture
	2,4 D	6-BA	NAA				
	1	0	0				
2	0	0.5	0.1	4.607	0.496	淡黄,色泽鲜亮	疏松
3	0	1.0	0.5	5.663	0.292	淡黄,色泽暗淡	一般
4	0	2.0	1.0	5.326	0.475	淡黄,色泽鲜亮	疏松
5	0.5	0	0.1	3.406	0.284	淡黄,色泽鲜亮	疏松
6	0.5	0.5	0	3.716	0.345	淡黄,色泽鲜亮	疏松
7	0.5	1.0	1.0	3.128	0.310	淡黄,色泽暗淡	一般
8	0.5	2.0	0.5	3.474	0.288	淡黄,色泽鲜亮	疏松
9	1.0	0	0.5	6.619	0.406	淡黄,色泽鲜亮	疏松
10	1.0	0.5	1.0	5.763	0.343	淡黄,色泽鲜亮	疏松
11	1.0	1.0	0	3.701	0.282	淡黄,色泽鲜亮	疏松
12	1.0	2.0	0.1	1.335	0.152	淡黄,色泽暗淡	致密
13	2.0	0	1.0	1.177	0.189	淡黄,色泽暗淡	致密
14	2.0	0.5	0.5	3.783	0.278	淡黄,色泽暗淡	致密
15	2.0	1.0	0.1	2.177	0.231	黄褐,色泽暗淡	致密
16	2.0	2.0	0	1.548	0.211	褐色,色泽暗淡	致密

表2 不同接种量对老瓜头细胞生长的影响

Table 2 Effects of different inoculation amount on the cell growth of *C. komarovii*

处理 g/50 ml Treatment	干重 g Dry weight	细胞生长速 率 g/(L·d) Cell growth rate	颜色、质地 Color and texture
0.20	0.100	0.088	淡黄、色泽鲜亮、质地疏松
0.50	0.098	0.070	淡黄、色泽鲜亮、质地疏松
1.00	0.211	0.146	淡黄、色泽鲜亮、质地疏松
1.50	0.332	0.225	淡黄、色泽鲜亮、质地疏松
2.00	0.363	0.235	淡黄、色泽鲜亮、质地疏松
2.50	0.627	0.532	黄褐、色泽暗淡、质地紧密
3.00	0.589	0.392	黄褐、色泽暗淡、质地紧密
4.00	0.840	0.484	黄褐、色泽暗淡、质地紧密

**2.1.2 不同接种量对老瓜头细胞生长的效应。**该文采用 0.2,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,4.0 g FW 瓶接种于 50 ml 培养液中,130 r/min,暗培养,30 d 后测定细胞的鲜干重,并计算细

胞生长速率,结果如表2所示。

由表2可以看出,悬浮细胞鲜干重随其接种量的增加而增加,接种量为 0.2~0.5 g 时细胞生长量为 0.1 g(干重)左右,生长速率最低,说明低的接种量不利于细胞生长。接种量为 2.50 g/50 ml 培养基中细胞的生长速率最高,而 4.0 g/50 ml 的接种量可使悬浮细胞的收获量达到最高,高的接种量可以得到较高的生物量,并有较高的生长速率,但培养后期细胞状态不佳。这可能是由于接种量的增加,在培养后期营养物质消耗过快,造成营养不足而细胞衰老呈现出颜色黄褐、色泽暗淡、质地紧密的状态。所以,为得到质量好、生长较快的悬浮细胞,确定了 2.0 g/50 ml 为最适接种量。

**2.1.3 老瓜头悬浮培养细胞的生长曲线。**在不添加植物激素的 MS 培养基中,接种量为 2.0 g/50 ml,分别置于黑暗和光照条件下培养,以细胞鲜、干重对培养时间作图,绘制老瓜头悬浮培养细胞的生长曲线。

从图1可以看出,以 27 d 为 1 个培养周期,老瓜头的生

长曲线呈S形。黑暗条件下,鲜生长量有明显的滞后期(0~9 d),继而进入指数生长期,直到18 d生长量呈下降趋势,鲜生长量达到10.768 g;测量的干重悬浮细胞也呈S形,培养到第18 d结束指数生长期,进入静止期,此时干重生量为0.682 g。光照条件下,老瓜头细胞鲜重明显低于黑暗条件下的鲜生长量,直到24 d时生长量达到最大6.469 g,此时进入静止期,其干重增长变化也呈S形,但增长缓慢,对数生长和直线生长期无明显区别。由此看出,老瓜头悬浮细胞在黑暗条件下培养,生长周期较短、生长量大;而光照条件下,老瓜头的细胞鲜干重生量小、周期长。说明黑暗条件有利于老瓜头悬浮细胞的生长。

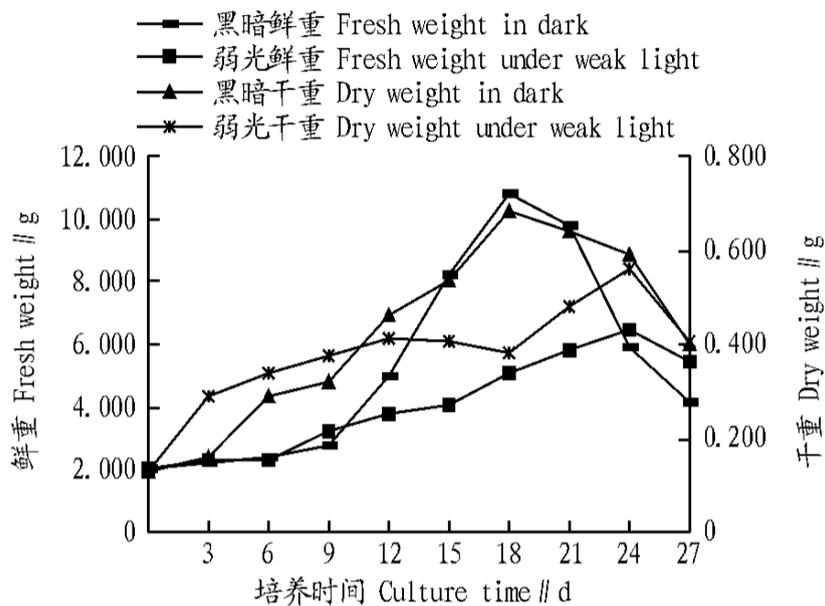


图1 老瓜头悬浮培养细胞的生长曲线

Fig.1 Growth curve of suspension culture cell of *C. komarovii*

## 2.2 老瓜头悬浮细胞培养过程中主要基质消耗的变化

**2.2.1 老瓜头悬浮细胞培养过程中氮的消耗。**以MS液体培养基中硝态氮浓度和氨态氮浓度为纵坐标,以培养时间为横坐标,绘制硝态氮和氨态氮的变化曲线(图2)。

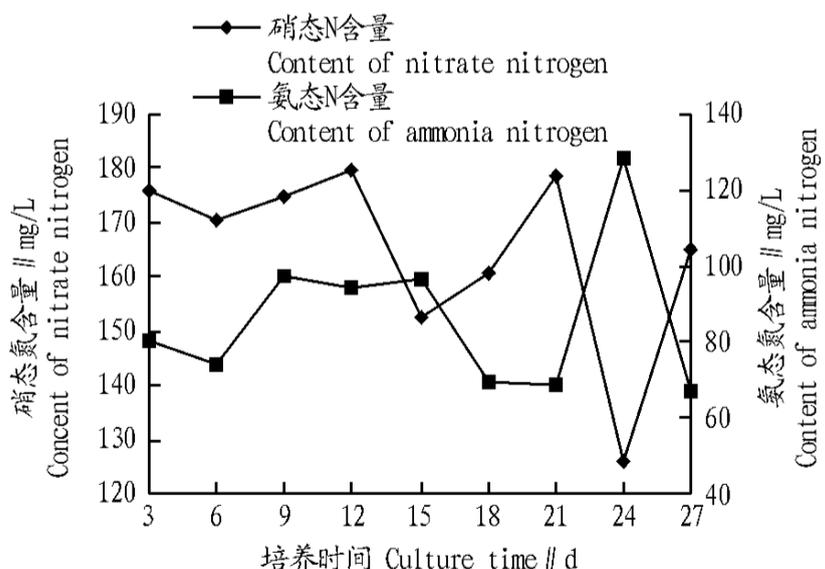


图2 老瓜头细胞悬浮培养过程中培养基中硝态氮和氨态氮含量的变化

Fig.2 Content changes of nitrate nitrogen and ammonia nitrogen in the medium during the cell suspension culture process of *C. komarovii*

MS培养基中初始硝酸盐浓度为2 445.08 ng/L,氨盐浓度为371.25 ng/L。从图2可见,在细胞培养过程中,第3天其硝酸盐的含量有175.884 ng/L,氨盐79.941 ng/L,两者含量均急剧下降,分别为初始含量的7.19%、21.53%。第9天后两者随培养时间呈一者上升另一者下降的规律进展,说明在培养中后期植物细胞在相同培养时间内对一种形式的氮

( $\text{NO}_3^-$ )吸收利用后,使其转化为另一种形式的氮( $\text{NH}_4^+$ ),故使培养液中( $\text{NH}_4^+$ )含量增加,反之亦然。而且在培养后期两者含量相背距离较大,这可能与 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NH}_4^+$ 的相互转化以及培养液中有机还原态氮的吸收转化有关<sup>[10]</sup>。

**2.2.2 老瓜头悬浮细胞培养过程中磷的消耗。**以MS液体培养基中磷酸盐浓度为纵坐标,以培养时间为横坐标,绘制磷酸盐的变化曲线(图3)。

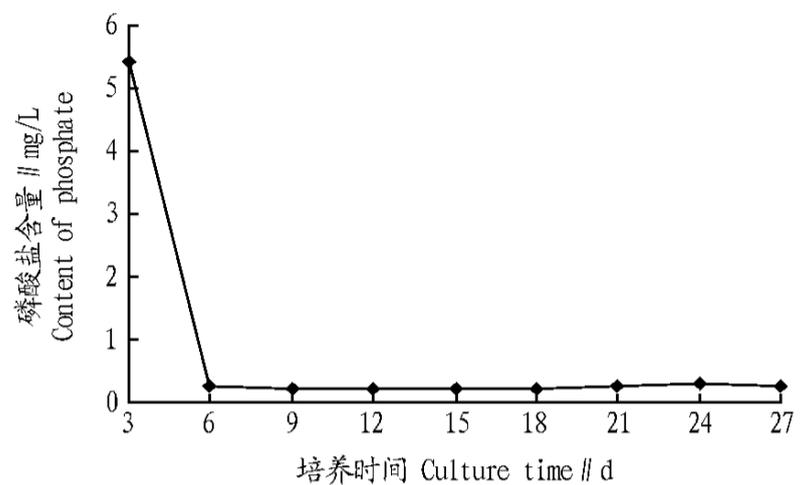


图3 老瓜头细胞悬浮培养过程中培养基中磷酸盐含量的变化

Fig.3 Content changes of phosphate in the medium during the cell suspension culture process of *C. komarovii*

MS培养基中磷酸盐浓度为90 ng/L。从图3可见,在老瓜头细胞悬浮培养初始阶段(0~6 d)磷酸盐含量急剧下降,其磷酸盐降至0.254 ng/L,约为培养初始时磷酸盐含量的0.28%;此后,磷酸盐的变化平缓。由此可以看出,在悬浮细胞培养初期,细胞生长对磷酸盐的吸收已达到最大。

**2.2.3 老瓜头悬浮细胞培养过程中蔗糖及可溶性总糖的消耗。**以MS液体培养基中蔗糖浓度和可溶性总糖浓度为纵坐标,以培养时间为横坐标,绘制蔗糖和可溶性总糖的变化曲线(图4)。

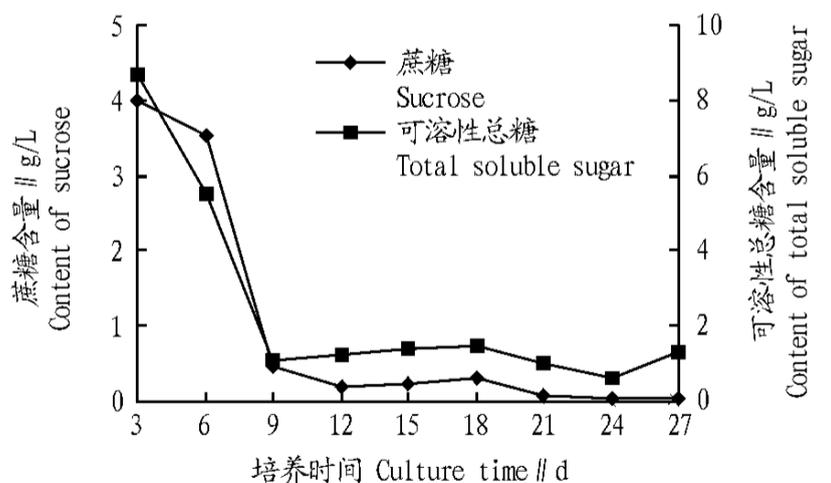


图4 老瓜头细胞液体培养过程中培养基中蔗糖和可溶性总糖含量的变化

Fig.4 Content changes of sucrose and total soluble sugar in the medium during the liquid culture process of *C. komarovii* cells

由图4可以看出,黑暗条件下蔗糖含量变化曲线与可溶性总糖的变化基本相似。因为蔗糖作为碳源,必须在转化酶的作用下分解为葡萄糖和果糖,才能被植物细胞吸收利用。所以,培养基中的总糖主要是葡萄糖、果糖和蔗糖的混合物<sup>[11]</sup>。由图4可知,蔗糖和可溶性总糖的消耗趋势基本相同,在悬浮细胞培养初期(0~9 d),细胞生长对蔗糖消耗量最大,此时,可溶性总糖浓度为1.096 g/L,蔗糖浓度为0.460 g/L,是初

正相关<sup>[15-20]</sup>。该研究结果表明,可溶性糖含量与插穗发芽率成正相关,与生根率相关不显著,原因可能是林木扦插与饲草扦插的生根方式不同。笔者在试验中观察到,饲草扦插生根有两种方式,一种是在新芽下部分化节上生根<sup>[21]</sup>,另一种是在插穗节上生根,在统计时包括了这两种方式,因此该试验中插穗可溶性糖含量对生根率的影响中包含有对发芽率的影响<sup>[22]</sup>,但未直接体现出来。

该试验筛选出了成活率和发芽率最高扦插材料嫩茎插穗,初步弄清了扦插繁殖的原理和影响成活率的因素。对于如何进一步提高成活率以及弄清扦插繁殖的机理,尚需深入研究。

### 参考文献

- [1] 唐祈林,李晚忱,宋运淳,等.玉米与四倍体多年生玉米代换种质的选育及其基因组原位杂交鉴定[J].遗传学报,2004,31(4):340-344.
- [2] TANG Q L, RONG T Z, SONG Y C, et al. Introgression of perennial teosinte genome into maize and identification of genomic in situ hybridization and microsatellite markers[J]. Crop Science, 2005, 45:717-721.
- [3] 任勇,唐祈林,荣廷昭.新选育饲草玉米品系饲用营养价值初步研究[J].植物遗传资源学报,2005(4):444-447.
- [4] 周芙蓉.中国工程院院士荣廷昭称:发展饲草玉米是西南生态区的重要选择[J].草业科学,2005,22(12):81.
- [5] 李继华.扦插的原理与应用[M].上海:上海科学技术出版社,1987:23-27.
- [6] 曹兵,高捍东.希蒙得木的扦插繁殖技术[J].南京林业大学学报:自然科学版,2003,27(4):62-66.

(上接第14455页)

始蔗糖含量的1.53%。在对数生长期,总糖(蔗糖)的消耗速度都减慢,蔗糖在21 d时几乎消耗殆尽,而可溶性总糖的含量在培养24 d时出现最低点,此后有所回升,说明蔗糖已完全分解为葡萄糖和果糖。

### 3 结论与讨论

植物生长调节物质是培养基中的关键物质,对植物细胞培养起着重要且明显的调节作用,植物生长调节物质的种类以及浓度对不同的植物有不同的效果<sup>[6]</sup>。与愈伤组织的诱导相同,植物激素在细胞悬浮培养中起着重要的作用。适合的激素种类及浓度搭配可以培养出所需的愈伤组织类型,对愈伤细胞悬浮培养中生物量及代谢物质积累同样起着关键作用。笔者进行老瓜头愈伤组织诱导培养时,几种植物激素的作用并不显著,但直观分析最适的培养基配方中含有2,4-D、6BA、NAA的诱导效果明显<sup>[6]</sup>。在该文中,不添加任何生长激素的MS培养基中老瓜头细胞生长量最大,细胞生长状态最佳。从方差分析结果可看出,植物激素对细胞生物量的积累并未产生显著作用,说明在老瓜头细胞悬浮培养过程中可能其内源激素水平已达到支持和满足其细胞培养所需。

营养成分对培养物质的影响同样重要,通过对营养物质消耗规律的研究在该文的研究中发现,在细胞培养初期,硝酸盐、磷酸盐及蔗糖三者的消耗已达最大,从以上各基质消耗变化曲线图中可以看出,在细胞培养初期(0~9 d),培养基中的硝酸盐、氨盐、磷酸盐、蔗糖含量均呈现急剧下降的趋势,之后各自变化趋于平缓。这说明,老瓜头细胞在MS培养

- [7] 马小军,丁万隆.东北红豆杉扦插繁殖的研究[J].中国中药杂志,1994,19(6):337-338.
- [8] 罗焕荣,何郁如.广州地区香石竹的扦插繁殖研究初报[J].园艺学报,1993,20(4):409-410.
- [9] 徐兴友,郭学民,王同坤,等.两种野生花灌木硬枝扦插繁殖试验[J].西北林学院学报,2005,20(2):104-106,120.
- [10] 罗旭,张海峰,李华.笃斯越桔嫩枝扦插繁殖技术[J].林业科技,2005,30(2):6-8.
- [11] 王宝全,左福元,曾子健,等.杂交狼尾草茎秆无性繁殖技术研究[J].四川畜牧兽医,2002(29):23-24.
- [12] 张志良.植物生理学实验指导[M].2版.北京:高等教育出版社,1990:160-162.
- [13] 许晓岗,汤庚国,谢寅峰.海棠果插穗的内源激素水平及其与扦插生根的关系[J].莱阳农学院学报,2005,22(3):195-199.
- [14] 周云龙.植物生物学[M].2版.北京:高等教育出版社,2004:251.
- [15] 周元.西蒙得木扦插繁殖技术初探[J].植物生理学通讯,2002,38(6):564-566.
- [16] 吕明霞.梅花硬枝扦插繁殖与贮藏养分的关系[J].浙江农业科学,2000(4):200-202.
- [17] 詹亚光,杨传平,金贞福,等.白桦插穗生根内源激素和营养物质[J].东北林业大学学报,2001,29(4):1-4.
- [18] 张志权,陈志明.南方红豆杉嫩枝扦插生根性研究[J].林业科学研究,1999,12(5):539-543.
- [19] 郭素娟,凌宏勤,李凤兰.白皮松插穗生根的生理生化基础研究[J].北京林业大学学报,2004,29(4):1-4.
- [20] 张应团.紫玉兰绿枝扦插生根率与采条时期的关系[J].江苏林业科技,2000,27(4):16-19.
- [21] 闵继淳,吴新荣,田红霞,等.多年生疏丛型禾草扦插繁殖的研究[J].新疆农业大学学报,1991,14(1):46-49.
- [22] CHEN R Y, YAN M M, CHEN W Q, et al. Study on propagation by cuttings of forage maize[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5):74-77,105.

基中对各营养物质消耗量集中在培养初期,而在对数生长期,主要基质含量很少,极大地影响了细胞生长量的积累。以此也说明了细胞最大生长量(干重)相对较少与基质的前期消耗过量有关。为了提高老瓜头悬浮细胞培养生物量的积累,需要进行培养基营养物质含量的调配,当细胞培养到对数生长期时要进行细胞继代培养,或者在培养基中适量加大硝酸盐、磷酸盐及蔗糖的用量,以保证细胞培养中期对营养物质的持续利用<sup>[12]</sup>。

### 参考文献

- [1] 张维库,吴文君.牛心朴子化学成分及生物活性研究进展[J].天然产物研究与开发,2004,16(3):273-277.
- [2] 祁利民,杨洁,贾建荣.宁夏野生植物老瓜头生物碱的化学成分研究[J].宁夏医学院学报,2002,24(5):336-339.
- [3] 曲玲,曹有龙.牛心朴子的研究现状及综合利用[J].甘肃农业科技,2002(4):40-42.
- [4] 谢鹤.谈老瓜头蜜源在西北地区养蜂业中的地位[J].养蜂科技,2001(5):36-39.
- [5] 曲玲,曹有龙.牛心朴子组织培养与快繁技术初步研究[J].甘肃农业科技,2002(4):42-45.
- [6] 胡海英,叶芳芳.老瓜头愈伤组织诱导培养技术的研究[J].中草药,2007,38(11):1716-1719.
- [7] 李浚明.植物组织培养教程[M].2版.北京:中国农业出版社,2002.
- [8] 张志良,瞿伟菁.植物生理学试验指导[M].3版.北京:高等教育出版社,2003:48-52,127-133.
- [9] 中国科学院上海植物生理研究所,上海植物生理学会.现代植物生理学试验指南[M].北京:科学出版社,1999:138-139.
- [10] 李春喜,于志和,王文林.生物统计学[M].北京:科学出版社,2002:81-113,149-156.
- [11] 周英彪,土瑞,肖冬光.水翁悬浮细胞系的建立及其悬浮培养的生长特性[J].生物技术,2007,17(1):66-69.
- [12] 范美华,刘树楠,张国彬,等.半夏细胞悬浮培养中生理生化指标的测定[J].生物技术,2004,14(5):78-81.