

· 资源与质量评价 ·

阳春砂愈伤组织的诱导

李明晓¹, 陈树辉^{1,2}, 苏景³, 汤丽云⁴, 徐杰^{1,5}, 何卓航¹, 何国振^{1,6*}

- (1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 浙江施强制药有限公司, 杭州 310000;
3. 阳春市砂仁试验示范场, 广东 阳春 529600; 4. 华南农业大学 生命科学学院, 广州 510642;
5. 广东一方制药有限公司, 广东 佛山 528200;
6. 广州中医药大学, 岭南中药资源教育部重点实验室, 广州 510006)

[摘要] 目的:通过阳春砂组织培养获得愈伤组织,建立阳春砂愈伤组织的诱导体系。方法:将阳春砂根状茎芽及阳春砂试管苗的茎段、根尖作为愈伤组织诱导的外植体材料,接种到以MS为基本培养基,分别添加不同浓度的6-苄基腺嘌呤(6-BA), α -萘乙酸(NAA)及2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)的培养基中(各培养基的pH约为5.8),探讨不同外植体材料及不同培养基对阳春砂愈伤组织诱导的影响。结果:研究结果显示,阳春砂根状茎芽及试管苗的茎段、根尖3种外植体材料均能有效地诱导产生愈伤组织;其中阳春砂根状茎芽、试管苗茎段2种外植体材料诱导产生愈伤组织的最适培养基为MS+6-BA($1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+2,4-D($1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+NAA($0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),最高诱导率分别为15%和60%;试管苗根尖诱导产生愈伤组织的最适培养基为MS+6-BA($2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+2,4-D($1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+NAA($1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),最高诱导率76%,为阳春砂愈伤组织诱导的最佳外植体材料。结论:该研究初步建立了阳春砂的根状茎芽及试管苗的茎段、根尖3种外植体的愈伤组织诱导体系,试管苗根尖为愈伤组织诱导的最佳外植体。

[关键词] 阳春砂; 组织培养; 根状茎芽; 茎段; 根尖

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)08-0114-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.201907819

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190103.1553.010.html>

[网络出版时间] 2019-01-05 14:56

Callus Induction from *Amomum villosum*

LI Ming-xiao¹, CHEN Shu-hui^{1,2}, SU Jing³, TANG Li-yun⁴, XU Jie^{1,5}, HE Zhuo-hang¹, HE Guo-zhen^{1,6*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Zhejiang Strong Pharmaceutical Co. Ltd., Hangzhou 310000, China;

3. Yangchun Field Test and Demonstration of *Amomum villosum*, Yangchun 529600, China;

4. College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

5. Guangdong Yifang Pharmaceutical Co. Ltd., Foshan 528200, China;

6. Key Laboratory of Chinese Medicine Resources Under Ministry of Education, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To set up a callus induction system for *Amomum villosum* by tissue culture. **Method:** The rhizome buds of *A. villosum* and stem segments, root tip segments of sterile *A. villosum* plantlets were used as explants and cultured in MS media with different concentrations of 6-BA, NAA and 2, 4-D (the pH of

[收稿日期] 20181005(003)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2017YFC1701102);广东省教育厅特色创新项目(自然科学类,2016KTSCX016);广东省林业科技创新项目(2018KJCX033)

[第一作者] 李明晓,在读硕士,从事药用植物资源利用与生物技术研究,E-mail:1771665205@qq.com。

[通信作者] *何国振,博士,教授,从事药用植物分子与生理学研究,Tel:020-39358553,E-mail:heguozhen@gzucm.edu.cn

each medi is about 5.8). A callus induction system was established to explore the effect of different explants and different medium on callus induction for *A. villosum*. **Result:** The findings showed that the rhizome buds and sterile plantlet stems and root tip segments of three different explants can be successfully induced into calli. The most suitable medium for callus induction from rhizome buds and sterile plantlet stems was MS with 6-BA ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 2, 4-D ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and NAA ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) with the highest induction rates of 15% and 60% respectively. MS medium combined with 6-BA ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 2, 4-D ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and NAA ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was the most suitable proposal for inducing the callus from sterile root tip segments with the highest induction rate of 76%. **Conclusion:** Under certain culture conditions, rhizome buds, stem or root tip segments of sterile plantlet can be effectively induced into callus. The callus induction system of *A. villosum* is preliminarily established, and root tip segments of sterile plantlet are the optimal explant.

[**Key words**] *Amomum villosum*; tissue culture; rhizome bud; stem segment; root tip segment

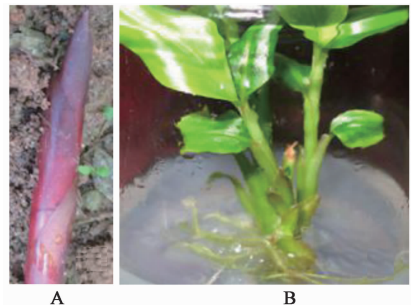
阳春砂 (*Amomum villosum*) 是姜科豆蔻属多年生常绿草本植物^[1], 以其干燥成熟的果实入药, 果实又称“春砂仁”, 是我国著名的四大南药之一。春砂仁性温, 味辛, 具有化湿开胃、温脾止泻、理气安胎等功效^[2], 是中医治疗肠胃病的常用中药, 在我国临床上应用广泛, 有着 1 300 多年的应用历史^[3]。阳春砂目前主要分布于广东、广西、云南和福建等地, 其中以广东阳春所产的春砂仁药效最佳^[4]。砂仁是我国传统大宗常用药材, 其市场需求量较大, 估计每年超过 $2.2 \times 10^6 \text{ kg}$, 相关产业市场需求量超过 100 亿元人民币^[5-6]。但是国内春砂仁的产量约为 $1.6 \times 10^6 \text{ kg}$, 远远不能满足市场的需求^[6]。导致产量低的主要原因是落果率高、自然结实率低、人工授粉强度大等。立地环境和种质类型综合影响阳春砂的产量^[7]。阳春砂的种质资源丰富, 目前已知的有长果、圆果、仲华、锦秋 4 种栽培类型^[8], 还有许多类型有待筛选。丰富的种质资源为良种培育提供了基础。阳春砂可以进行种内杂交育种, 也可以与海南砂 (*A. longiligulare*) 进行杂交育种。但因为阳春砂开花时间只有 1 d, 且各种质的花期不一定能够一致, 所以用体细胞杂交技术育种也是候选途径之一。阳春砂可以进行种子繁殖, 也可以进行分株繁殖。种子繁殖的缺陷是种子发芽时间长、种子寿命短且不易贮藏, 而分株繁殖的不足是繁殖系数低。组织培养技术是体细胞杂交育种必经的技术平台, 且经愈伤组织诱导的组织培养可以大幅度提高无性繁殖系数。

植物组织培养又称离体培养, 是指通过无菌操作把植物体的离体器官、组织、细胞甚至原生质体, 在人为提供及控制的环境条件下生长和发育的所有组织培养技术的总称^[9]。阳春砂体细胞杂交可以以愈伤组织细胞为起始材料, 获得原生质体, 进行

原生质体融合, 再经愈伤组织诱导途径生成杂交植株。经过愈伤组织途径的组织培养技术, 能在短时间内有效地扩大繁殖系数, 获得大量、一致的试管苗。所以, 愈伤组织的诱导具有重要的意义。已有以种子或通过无菌播种获得阳春砂实生苗作为外植体进行愈伤组织诱导的研究^[10-11], 而以阳春砂大田植株为起始材料进行愈伤组织诱导的研究未见报道。因阳春砂的种子不耐贮藏, 以种子或无菌实生苗为研究材料受到季节的限制, 而以大田植株为材料则可以克服这一缺陷。本研究将以阳春砂大田植株根状茎芽、其试管苗茎段和根尖为外植体, 进行愈伤组织诱导研究, 以获得愈伤组织, 建立阳春砂愈伤组织诱导技术体系, 为体细胞杂交育种和高系数无性繁殖阳春砂奠定基础。

1 材料

外植体材料为广州中医药大学阳春砂大棚内的阳春砂根状茎芽及其经离体培养的试管苗茎段、根尖, 见图 1。



A. 大田植株的根状茎芽; B. 大田根状茎的试管苗

图 1 外植体材料

Fig. 1 Experimental materials

Streamline 型超净工作台 (新加坡 Esco 公司); WP800TL23-K3 型微波炉 (Galanz); DHG-9245A 型电热鼓风恒温干燥箱 (上海一恒科学仪器有限

公司); LDZX-50FBS 型高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂); AGBP211D 型 1/1 万电子天平, BS2202S 型电子天平(德国 Sartorius)。

6-苄基腺嘌呤(6-BA, 美国 Sigma 公司, 批号 WXBC4149V), α -萘乙酸(NAA, 上海伯奥生物科技有限公司, 批号 070811), 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D, 美国 Aladdin 公司, 批号 37149), 实验用水为超纯水。

2 方法

2.1 培养基的配制 愈伤组织的诱导通常以生长素类和细胞分裂素类植物生长调节剂进行配比使用, 其中使用的植物生长调节剂主要有 2,4-D, NAA, 6-BA, 氯吡苯脲(KT)等^[12-15]。因此, 本研究选用 MS 培养基为基本培养基, 分别添加 6-BA, 2,4-D, NAA 3 种植物生长调节剂, 根据不同的外植体材料, 设计不同的阳春砂愈伤组织诱导培养基配方, 各培养基 pH 约 5.8。见表 1。

表 1 阳春砂愈伤组织诱导培养基组成

Table1 Media for callus induction of *Amomum villosum* mg·L⁻¹

No.	6-BA	2,4-D	NAA
1	1.0	0.5	0.5
2	1.0	1.0	0.5
3	1.0	1.0	-
4	1.0	-	1.0
5	1.5	1.0	0.5
6	1.5	0.5	1.0
7	1.5	1.0	1.0
8	2.0	1.0	0.5
9	2.0	1.0	1.0
10	2.0	1.5	0.5
11	3.0	0.5	0.5
12	3.0	1.0	0.5
13	3.0	2.0	1.0

2.2 根状茎芽的消毒 将采自大田的阳春砂根状茎芽用自来水冲洗 0.5~1.0 h, 无菌水荡洗一遍后, 置超净工作台上用 75% 乙醇浸泡 30 s, 0.1% HgCl₂ 浸泡 10 min 后, 用无菌水冲洗 5~6 次, 待用。

2.3 试管苗的制备 切取经消毒处理后的阳春砂根状茎芽长约 3 cm, 接种于 MS 基本培养基(pH 约为 5.8)上培养, 待芽新长至约 0.5 cm 时, 转入 MS + NAA (0.1 mg·L⁻¹) 培养基(pH 约 5.8)上进行生根培养, 以获得无菌苗。

2.4 根状茎芽的愈伤组织诱导 将经消毒处理后

的阳春砂根状茎芽切取约 3 cm 的小段, 沿中轴面纵切成大小相似的两瓣后, 横放于愈伤组织诱导培养基上进行培养; 每种培养基接种 20 瓶, 每瓶接种 1 瓣根状茎芽。每 3 d 观察、记录 1 次。对成功诱导出的愈伤组织进行继代培养, 30 d 继代 1 次。

2.5 试管苗茎段愈伤组织诱导 切取阳春砂试管苗直立茎约 2 cm 的小段, 竖放于愈伤组织诱导培养基上进行培养。在分析根状茎芽愈伤组织诱导预实验结果的基础上, 选用 1, 2, 5, 7 号培养基作为试管苗茎段愈伤组织诱导的培养基。每种培养基接种 5 瓶, 每瓶接种 1 段直立茎。每 3 d 观察、记录 1 次。对成功诱导出的愈伤组织进行继代培养, 30 d 继代 1 次。

2.6 试管苗根尖愈伤组织诱导 切取阳春砂试管苗根尖约 1 cm 的小段, 横放于愈伤组织诱导培养基上进行培养; 在分析根状茎芽愈伤组织诱导预实验结果的基础上, 选用 1, 5, 6, 9 号培养基作为试管苗根尖愈伤组织诱导的培养基。每种培养基接种 5 瓶, 每瓶接种 5 段根尖。每 3 d 观察、记录 1 次。对成功诱导出的愈伤组织进行继代培养, 30 d 继代 1 次。

2.7 培养条件 培养温度(25 ± 2) °C, 相对湿度 40%~60%, 光照强度(33.6 ± 0.7) μmol·m⁻²·s⁻¹, 光周期为光照与黑暗时间各半。

2.8 愈伤组织诱导率统计 诱导培养后每隔 3 d 观察愈伤组织生长情况, 统计诱导率。诱导率 = (出愈外植体数/接种外植体总数) × 100%。

3 结果

3.1 不同培养基对阳春砂根状茎芽愈伤组织诱导的影响 以阳春砂大田植株的根状茎芽作为外植体, 进行愈伤组织诱导培养, 培养 60 d 后统计诱导率, 结果见表 2。表 2 结果显示, 13 个培养基中只有 6 个可以诱导出愈伤组织。在出现愈伤组织的培养中, 愈伤组织的诱导率为 5%~15%, 其中 5 号培养基的愈伤组织诱导率最高, 而 8 号培养基的诱导率最低。愈伤组织的数量和质量以 1 号和 5 号配方的最好, 愈伤组织块相对较大、颜色浅绿色、质地较疏松、生长较快; 2 号, 6 号及 7 号配方出现少数破碎、不明显的愈伤组织, 且颜色较深, 呈黄绿色; 8 号配方的愈伤组织颜色较深, 呈黄色, 质地较硬, 生长较慢, 见图 2。因此, 阳春砂根状茎芽愈伤组织诱导的最适培养基为 5 号培养基, 即 MS + 6-BA (1.5 mg·L⁻¹) + 2,4-D (1.0 mg·L⁻¹) + NAA (0.5 mg·L⁻¹)。

表 2 不同植物生长调节剂组合对阳春砂根状茎芽愈伤组织诱导的影响

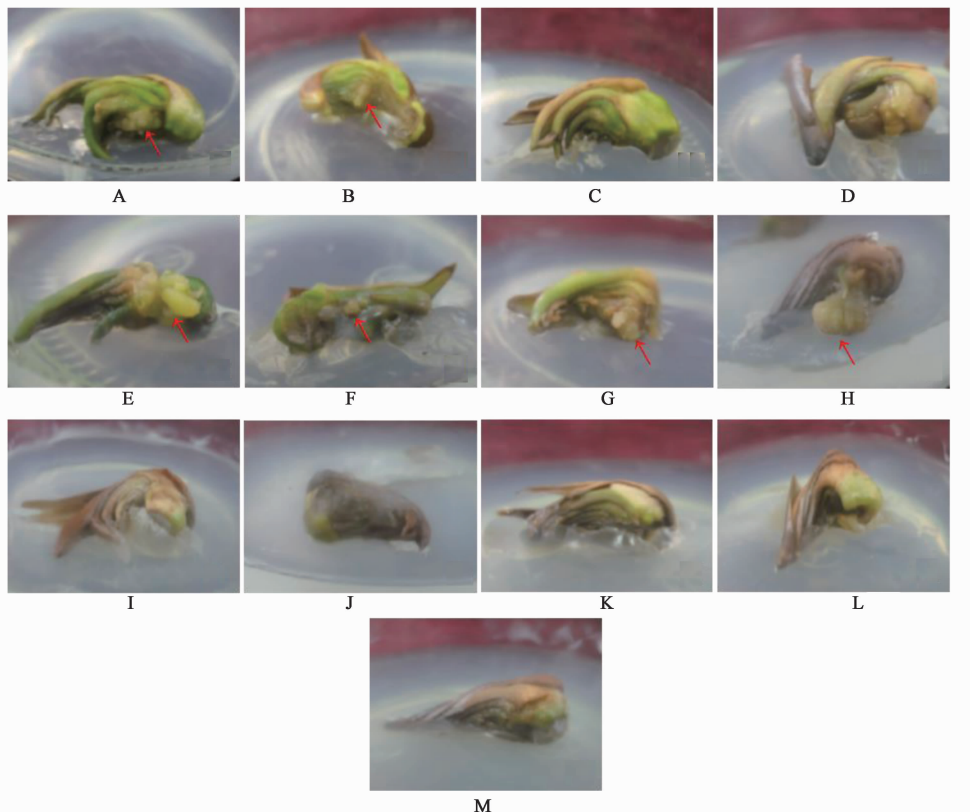
Table 2 Effect of different combinations of plant growth regulators on callus induction from rhizomes of *Amomum villosum* buds

No.	出愈伤数/块	出愈伤起始时间/d	诱导率/%	愈伤组织的性状
1	2	36~60	10	淡黄绿色,质地疏松,较大
2	2	30~60	10	淡黄绿色,破碎,较小
3	0	-	0	-
4	0	-	0	-
5	3	30~60	15	淡黄绿色,质地疏松,较大
6	2	27~60	10	黄绿色,破碎
7	2	24~60	10	奶黄色,破碎
8	1	45~60	5	暗黄绿色,质地较硬,较大
9	0	-	0	-
10	0	-	0	-
11	0	-	0	-
12	0	-	0	-
13	0	-	0	-

注:“-”代表未见到愈伤组织产生;诱导出愈伤组织的时间以第一次能在同一种培养基中看到膨大浅绿色的愈伤组织的天数为准(表 3,4 同)。接种数均为 20 块。

愈伤组织诱导率在 10% 或以上的培养基中的 6-BA 的质量浓度在 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 或以下。在没有诱导出愈伤组织的培养基中,配方 9,10,11,12,13 的 6-BA 质量浓度 $> 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而配方 3,4 则是 2,4-D 和 NAA 没有同时出现在同一培养基中。培养基 8 虽然出现愈伤组织,但诱导率只有 5%,可能与 6-BA 的质量浓度高于 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 有关。

3.2 不同培养基对阳春砂试管苗茎段愈伤组织诱导的影响 分析了不同植物生长调节剂组成和浓度对根状茎芽愈伤组织诱导的影响后,选择了培养基 1,2,5,7 对阳春砂试管苗茎段进行愈伤组织诱导。统计了第 60 天的诱导率,结果见表 3。结果显示,在 4 个培养基配方中,均能有效地诱导产生愈伤组织,颜色呈浅绿色,愈伤组织的诱导率为 40% ~ 60%。其中 1 号,5 号培养基的愈伤组织诱导率最高,均为 60%;但是 1 号配方的愈伤组织体积较小、质地较硬,不利于后续的继代培养,且出愈时间比 5 号配方的时间长,而 5 号配方诱导的愈伤组织块较大、质地松脆,质量更好。2 号,7 号配方的诱导率次之,均为 40%;2 号和 7 号配方的出愈时间较短,



A ~ M. 1 ~ 13 号培养基;红色箭头指示的是愈伤组织

图 2 不同培养基对阳春砂根状茎芽愈伤组织诱导的影响

Fig. 2 Effect of different formulations on callus induction of rhizomes from *Amomum villosum* buds

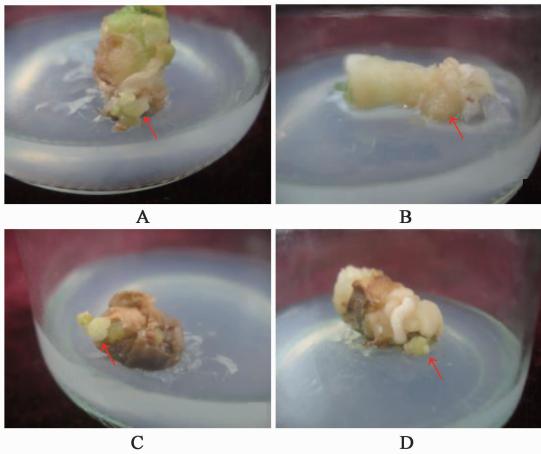
但是愈伤组织出现不同程度的水渍化,7号配方的情况更严重,影响愈伤组织的继代培养,不利于愈伤组织的生长,不适合细胞培养和扩繁,见图3。因此,阳春砂试管苗茎段愈伤组织诱导的最适培养基与根状茎芽愈伤组织诱导的最适培养基一样,均为5号配方,即MS+6-BA(1.5 mg·L⁻¹)+2,4-D(1.0 mg·L⁻¹)+NAA(0.5 mg·L⁻¹)。

表3 不同植物生长调节剂组合对阳春砂试管苗的茎段愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of different combinations of plant growth regulators on callus induction from stem segments of sterile *Amomum villosum* plantlets

No.	出愈伤数/块	出愈伤起始时间/d	诱导率/%	愈伤组织的性状
1	3	24~60	60	浅绿色,质地较硬,较小
2	2	18~60	40	浅绿色,较大,水渍化
5	3	21~60	60	黄白色,质地松脆,较大
7	2	18~60	40	浅绿色,较小,水渍化严重

注:接种数均为5块。



A~D. 1,2,5,7号培养基;红色箭头指示的是愈伤组织

图3 不同培养基对阳春砂试管苗茎段愈伤组织诱导的影响

Fig. 3 Effect of different formulations on callus induction from stem segments of sterile *Amomum villosum* plantlets

3.3 不同培养基对阳春砂试管苗根尖愈伤组织诱导的影响 分析了不同植物生长调节剂组成和浓度对根状茎芽、试管苗茎段愈伤组织诱导的影响,并考虑到根尖与茎段是不同的器官,选择了培养基1,5,6,9对阳春砂试管苗根尖进行愈伤组织诱导。统计了第60天的诱导率,结果见表4。表4结果显示,在4个培养基配方中,均能有效地诱导产生愈伤组织,颜色呈浅绿色,质地相近;愈伤组织的诱导率为64%~76%,其中9号培养基的愈伤组织诱导率最高,而1号培养基的诱导率最低。愈伤组织的数量

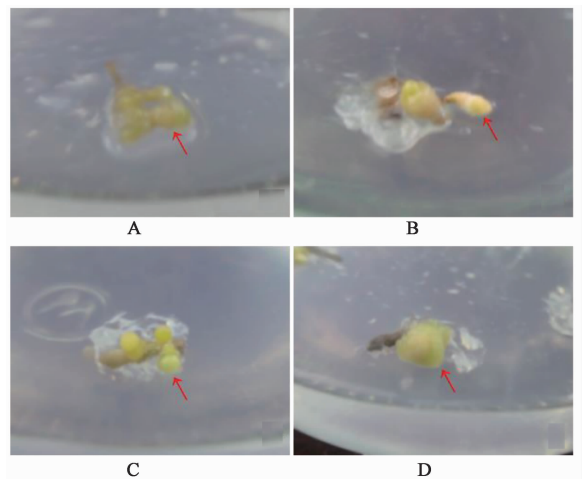
和质量以9号配方的最好,愈伤组织块相对较大、颜色浅绿色、生长较快;6号配方的诱导效果次之,愈伤组织块较大、颜色浅绿色;5号配方的愈伤组织块较小、颜色黄白色,且出现水渍化;1号配方的愈伤诱导率相对较低,愈伤组织块相对较小、颜色浅绿色,且出现水渍化的情况更严重,影响愈伤组织的继代培养,不利于愈伤组织的生长,见图4。因此,阳春砂试管苗根尖愈伤组织诱导的最佳培养基为9号配方,即MS+6-BA(2.0 mg·L⁻¹)+2,4-D(1.0 mg·L⁻¹)+NAA(1.0 mg·L⁻¹)。

表4 不同植物生长调节剂组合对阳春砂试管苗的根尖愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effect of different combinations of plant growth regulators on callus induction from root tip segments of sterile *Amomum villosum* plantlets

No.	出愈伤数/块	出愈伤起始时间/d	诱导率/%	愈伤组织的性状
1	16	18~60	64	浅绿色,较小,水渍化
5	17	18~60	68	黄白色,较小,水渍化
6	17	15~60	68	浅绿色,较大
9	19	15~60	76	浅绿色,较大

注:接种数均为25块。



A~D. 1,5,6,9号培养基;红色箭头指示的是愈伤组织

图4 不同配方对阳春砂试管苗根尖愈伤组织诱导的影响

Fig. 4 Effect of different formulations on callus induction from root tip segments of sterile *Amomum villosum* plantlets

4 讨论

阳春砂是我国传统的大宗药材,目前是广东省首批立法重点保护的八大药材之一。本研究通过阳春砂大田植株根状茎芽、试管苗茎段及试管苗根尖3种材料开展愈伤组织诱导研究,建立愈伤组织诱导体系,为通过体细胞杂交育种获得优良种质和快

速无性繁殖打下基础。本研究建立了以阳春砂根状茎芽、试管苗的茎段和根尖作为外植体的愈伤组织诱导体系,丰富了外植体材料的来源,突破了以往只能用种子或无菌实生苗作为外植体的局限,将不再受季节的限制,更容易获得外植体材料。

比较阳春砂大田植株根状茎芽、试管苗茎段及试管苗茎尖 3 种外植体材料的出愈效果,可知在相同的培养条件下,阳春砂试管苗茎段、根尖比大田植株根状茎芽更适宜作为诱导愈伤组织的外植体,且出愈时间更短。这可能与升汞对大田植株根状茎芽的毒害作用,导致根状茎芽的活力降低有关。而在相同培养条件下,根尖比茎段的诱导率更高、产生愈伤组织的时间更短,根尖更容易产生愈伤组织。这可能与试管苗根的分生组织更发达、分生能力更强有关。因此,阳春砂试管苗的根尖更适合作为愈伤组织诱导的外植体。

在植物生长调节剂的影响研究方面,添加不同的植物生长调节剂和比例,对愈伤组织的诱导产生不同的影响^[16-18]。其中 2,4-D 在阳春砂愈伤组织的诱导中起着重要的作用,在一定浓度范围内,提高 2,4-D 浓度有利于提升阳春砂的愈伤组织诱导率,而浓度过高会抑制愈伤组织的诱导。如 2,4-D 质量浓度在 0.5 ~ 1.0 mg·L⁻¹ 时,阳春砂愈伤组织诱导率随着浓度的增大而增加,出愈时间也在缩短,当 2,4-D 的质量浓度超过 1.5 mg·L⁻¹ 时,未见有愈伤组织的产生。而 NAA 的浓度水平对愈伤组织诱导的影响因不同的外植体而不同,以根状茎芽及试管苗茎段为外植体诱导愈伤组织,NAA 的最适质量浓度为 0.5 mg·L⁻¹;以试管苗根尖为外植体诱导愈伤组织,NAA 的最适质量浓度为 1.0 mg·L⁻¹。有趣的是,只有当培养基中同时含有 2,4-D 和 NAA 时才能诱导阳春砂根状茎芽的愈伤组织产生。6-BA 质量浓度在 1.0 ~ 1.5 mg·L⁻¹ 时,阳春砂愈伤组织诱导率随着浓度的增大而增加,出愈时间也在缩短,当 6-BA 的质量浓度在 2.0 mg·L⁻¹ 时出现最大诱导率,而后随着浓度的增大愈伤组织的诱导率开始下降。

[参考文献]

[1] 陈蔚文. 岭南本草(一)[M]. 广州:广东科技出版社, 2010:297-328.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M].

北京:中国医药科技出版社,2015:253.

[3] 段立胜,张丽霞,彭建明,等. 西双版纳阳春砂仁种质资源调查初报[J]. 时珍国医国药,2009,20(3): 627-628.
[4] 高伟. 药用植物阳春砂生殖生物学特性初步研究[D]. 广州:广州中医药大学,2011.
[5] 陆善旦,王健. 春砂仁销势连年看好[J]. 中国现代中药,2008,10(2):48-49.
[6] 汤丽云,何国振,苏景,等. 道地春砂仁产业发展的策略研究[J]. 中国农学通报,2012,28(8):94-99.
[7] 徐杰,李明晓,苏景,等. 阳春砂-龙眼生态立体种植模式的研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(2):288-298.
[8] 蒋焯,苏景,汤丽云,等. 一种阳春砂新栽培类型的鉴定[J]. 广西植物,2017,37(5):554-564.
[9] 肖尊安. 植物生物技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2005:31.
[10] 张雅明,董燕,周联,等. 阳春砂愈伤组织诱导与植株再生[J]. 广州中医药大学学报,2007,24(1):66-68.
[11] 刁玲武,董燕,周联,等. 阳春砂愈伤组织诱导的多因子正交试验研究[J]. 广州中医药大学学报,2011,28(4):434-438,460.
[12] 付航,黄涵签,王妍,等. 防风愈伤组织诱导及植株再生体系的建立[J]. 中草药,2018,49(13):3127-3133.
[13] 徐瑞超,马云桐,陈新,等. 三角叶黄连愈伤组织诱导和培养条件的优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(1):113-116.
[14] Wong K F, Taha R M. The effect of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and 6-benzylaminopurine on callus induction and plant regeneration of *Allamanda cathartica*-A valuable medicinal plant [J]. Res J Biotechnol,2012,7(3):75-80.
[15] 游建军,彭建明,李荣英,等. 植物生长调节物质对白豆蔻花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22):172-175.
[16] 周宜君,周生闯,刘玉,等. 植物生长调节剂对植物愈伤组织的诱导与分化的影响[J]. 中央民族大学学报,2007,16(1):23-28.
[17] 李俊强,林丽华,张帆,等. 早开堇菜组织培养及植株再生体系的建立[J]. 草业学报,2015,24(11): 163-173.
[18] 张林魁,赵德刚. 玄参愈伤、不定根和内生菌产哈巴俄苷的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):136-139.

[责任编辑 顾雪竹]