

## 茶树愈伤诱导及不同儿茶素含量细胞系筛选

刘亚军<sup>1</sup>, 王正荣<sup>2</sup>, 王 婕<sup>1</sup>, 杨冬青<sup>3</sup>, 郭丽丽<sup>1</sup>, 孙美莲<sup>3</sup>, 王云生<sup>1</sup>, 高丽萍<sup>1\*</sup>, 夏 涛<sup>3\*</sup>

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 枣庄学院化学化工与材料科学学院, 枣庄 277160;

3. 安徽农业大学教育部茶叶生物化学与生物技术重点实验室, 合肥 230036)

**摘 要:** 茶树组织培养是开展茶树次生代谢及调控研究重要的研究平台。在建立茶树愈伤组织培养体系的基础上, 开展了茶树含不同儿茶素含量的细胞系筛选方法的研究。结果表明, 在 H、S 和 B 3 种诱导培养基中, 只有 B 培养基适合于诱导生长迅速、组织疏松、质地均一且具有一定儿茶素合成能力的愈伤组织。从外植体方面考虑, 种子诱导出的愈伤组织具有较强的植株再生能力; 幼茎和叶片诱导出的愈伤组织, 其生长速度快、组织疏松, 但再生能力弱。在此基础上, 采用目视法和二分法, 结合 HPLC 分析, 对 B 培养基诱导的细胞系“yunjing63Y”进行了筛选, 得到含不同儿茶素含量的细胞系“yunjing63Y”和“yunjing63X”。分析结果显示, 细胞系“yunjing63Y”和“yunjing63X”的儿茶素组分与鲜叶相似, 且二者儿茶素含量(干重)差异较大, 前者为 7.77 mg·g<sup>-1</sup>, 后者为 0.13 mg·g<sup>-1</sup>。

**关键词:** 茶树; 组织培养; 儿茶素; 细胞系

中图分类号: S571

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)04-0564-05

## The induction of tea callus and screening for tea cell line containing different catechin contents

LIU Yajun<sup>1</sup>, WANG Zhengrong<sup>2</sup>, WANG Jie<sup>1</sup>, YANG Dongqing<sup>3</sup>, GUO Lili<sup>1</sup>,  
SUN Meilian<sup>3</sup>, WANG Yunsheng<sup>1</sup>, GAO Liping<sup>1</sup>, XIA Tao<sup>3</sup>

(1. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Department of Chemical Engineering and Materials Science, Zaozhuang University, Zaozhuang 277160;

3. Key Lab of Tea Biochemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** The callus culture of tea plant provides a good platform for the regulation and metabolism of secondary metabolites in the tea plant. This research carried out the work in screening for tea cell lines containing different catechin contents based on the callus culture of the tea plant. The results showed that among H, S and B induction mediums, only B medium was fitted for inducing and screening callus which were quickly grown, loosely organized, even textured and produced a good amount of catechins. Callus induced from tender stems and leaves grew quickly and loosely, but its regeneration ability to plants was weak. Cell lines “yunjing63Y”, “yunjing63X” with different catechin contents were obtained by the visual method, dichotomy, and HPLC analysis. The results showed that catechin components in the two cell lines were similar to those in the fresh tea leaves, but the catechin contents in cell lines “yunjing63Y” and “yunjing63X” differed obviously. The catechin contents (DW) of the former was 7.77 mg·g<sup>-1</sup>, and the latter was 0.13 mg·g<sup>-1</sup>.

**Key words:** tea plant (*Camellia sinensis*); callus culture; catechins; cell lines

植物类黄酮的合成受到外界环境因素的影响, 光照<sup>[1]</sup>、温度<sup>[2]</sup>、环境胁迫<sup>[3]</sup>等因素均会影响到茶树中的酚类物质的合成。利用茶树个体研究酚类物质的生物合成代谢受到诸多限制因素影响, 无疑茶愈

伤组织和细胞悬浮培养体系已成为研究茶树次生代谢的良好平台。筛选出含不同儿茶素含量及组分的茶细胞系是这种良好平台最终建立的前提。

常见的含特殊物质细胞系的筛选手段有多种,

收稿日期: 2014-03-10

基金项目: 国家自然科学基金(31170647, 31170282, 31270730, 31300577), 高等学校博士学科点专项科研基金(KJ2012A110), 安徽省自然科学基金(1408085QC51)和安徽省高校自然科学基金(KJ2012A110)共同资助。

作者简介: 刘亚军, 博士。E-mail: liuyajun1228@163.com

\* 通信作者: 高丽萍, 教授。E-mail: gaolp62@126.com 夏 涛, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: xiatao62@126.com

而寻找一种有效易行的特殊物检测手段是筛选体系建立的基础。对于有颜色的特殊物, 通常采用直接目视法筛选高产细胞系<sup>[4]</sup>, 如含花青素、萜醌、类胡萝卜素、叶绿素等物质的愈伤组织或细胞系, 其颜色的深浅表明了内含物含量的变化。Yamamoto等在筛选具有高产和稳产花青素细胞系过程中, 利用目视法挑选颜色较深的愈伤组织继代培养, 这样反复筛选了近 30 代, 在第 23 代之后细胞块的色素含量平均值保持稳定, 并比原细胞株含量高 7 倍<sup>[5]</sup>。吴蕴祺等利用二分法结合高效液相色谱分析 (HPLC), 对红豆杉愈伤组织中的紫杉醇高产细胞系进行筛选, 获得了一个紫杉醇高产细胞系 Ts-19, 其紫杉醇含量达细胞干重的 4.0%<sup>[6]</sup>。

但茶树儿茶素是无色的, 无法通过肉眼直接进行茶细胞系的识别筛选, 只能采取间接的方法。本文在建立茶树愈伤组织培养体系的基础上, 利用二分法, 结合香草醛盐酸显色和高效液相色谱分析, 开展了茶树含不同儿茶素含量及组分的细胞系筛选方法的研究, 为开展茶树儿茶素合成代谢及调控研究建立了良好平台。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

试验所用茶树(*Camellia sinensis* (L.))材料均来自安徽农业大学大杨店农业园。

### 1.2 主要试剂与仪器

**1.2.1 主要试剂** 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、激动素(KT)、吲哚丁酸(IBA)购自 sigma 公司; 香草醛购自天津市光复精细化工研究所; (+)-儿茶素(C)、(+)-没食子儿茶素(GC)、(-)-表儿茶素(EC)、表没食子儿茶素(EGC)、(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、(-)-表儿茶素没食子酸酯(ECG)购自上海融禾医药科技发展有限公司, 纯度>98%。甲醇、乙腈、乙酸购自美国 Tedia 公司, 色谱级; 其他试剂均为分析纯。

**1.2.2 主要仪器** WATERS600 紫外检测器高效液相色谱仪(美国 WATERS 公司)、BECKM centrifuge 高速离心机(美国 BECKMAN 公司)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 茶愈伤组织诱导与继代培养** 选取茶树云南大叶种、农抗早、舒茶早、龙井 43 的幼叶、幼茎和种子为外植体。在超净工作台上, 先后用 70% 的乙醇和 0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡消毒, 将外植体接种于诱导培养基上诱导茶愈伤组织。诱导培养基分别为 B 培养基: pH5.5 的 B<sub>5</sub>+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.1 mg·L<sup>-1</sup> KT+3%

(w/v)蔗糖; S 培养基: pH5.5 的 B<sub>5</sub>+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT+3% 蔗糖; H 培养基: pH5.5 的 MS+10 mg·L<sup>-1</sup> IBA+2 mg·L<sup>-1</sup> KT+3% (w/v)蔗糖。培养条件: 温度 25℃; 暗培养; 21 d 为一个培养周期。

茶树愈伤组织液体悬浮培养条件: 将诱导出且稳定继代的茶树愈伤组织切成直接约 0.5 cm 的大小, 按 1:10 (g/v) 加入液体培养液, 黑暗下 25℃、转速 120 r·min<sup>-1</sup> 摇床中培养。培养初期, 每 7 d 更换一次培养液, 不断提出老化和长势不好的愈伤, 继代 4~5 次后, 改为 21 d 继代 1 次。其他条件与固体培养相同。

**1.3.2 愈伤组织筛选** 在茶愈伤组织继代培养过程中, 采取目视法对愈伤组织进行初筛, 按照不同生长类型、不同颜色、不同质地挑选, 分别进行继代扩大培养。

在获得不同茶愈伤组织的基础上, 在培养过程中利用二分法, 结合 1% (w/v) 香草醛盐酸试剂活体快速显色法, 对愈伤组织进行复筛, 即可筛选出不同儿茶素含量的愈伤组织, 具体操作如图 1。在超净工作台上将细胞团逐一编号后用手术刀一分为二, 取其中一半细胞团放入事先装有 5 mL 1% 香草醛盐酸试剂试管中, 显色 10 min。将显色不同深浅愈伤组织对应的另一半愈伤组织分别接种, 继续培养。如此反复, 以筛选不同儿茶素含量的愈伤组织。

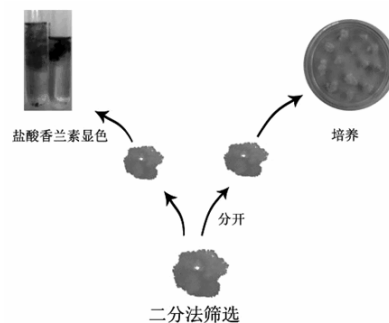


图 1 二分法筛选富含儿茶素愈伤组织

Figure 1 Screening for cell lines with high catechin contents by dichotomy

**1.3.3 儿茶素提取及其检测** 取愈伤组织 3 g 或茶树(云南大叶种)初展的叶片 0.5 g, 加少许石英砂, 液氮研磨至粉碎, 加 3 mL 95%乙醇研磨, 4000 g 离心, 吸取上清液, 沉淀加 3 mL 95%乙醇, 再次离心。此法重复 3 次, 最后 95%乙醇定容至 10 mL。将上述得到的 10 mL 乙醇溶液, 蒸干去除乙醇, 再用热水溶解, 再用等量乙酸乙酯萃取 3 次, 取有机相浓缩干燥, 用 1 mL 甲醇定容。得到的样品用孔径为 0.45 μm 有机膜过滤, 得儿茶素提取液, 利用

HPLC 检测儿茶素种类和含量。

HPLC 色谱条件: 色谱泵, Waters 600; 控制仪, Waters 600; 色谱柱, Phenomenex Synergi 4u Fusion 250 mm×4.6 mm; 检测器: UV Waters 2487; 灵敏度: 0.01; 检测波长: 280 nm; 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 5 μL; 每一试样进样之前, 以流动相平衡 15 min。采用梯度洗脱条件 A 相: 1%乙酸, B 相: 色谱纯乙腈, 洗脱梯度为前 20 min 内 B 相由 10% 到 13%; 20 min 到 40 min B 相由 13%到 30%。以儿茶素标准品制作标准曲线定量计算儿茶素含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基对茶愈伤组织儿茶素合成积累影响

不同培养基会影响到茶愈伤组织的生长特性和

儿茶素合成能力, 在 H、S 和 B 培养基上均能诱导出茶树愈伤组织, 但愈伤组织生长状态和愈伤组织儿茶素含量与组份差别较大(表 1 和图 2)。在 H 固体培养基生长的愈伤组织, 生长速度慢, 儿茶素含量相对较低, 儿茶素总含量(干重)只有 0.034 mg·g<sup>-1</sup>, 且儿茶素只检出非酯型儿茶素 GC、C、EC 和 EGC; 在 S 固体培养基上生长的愈伤组织, 生长速度慢, 但儿茶素合成类型和各种儿茶素相对含量与鲜叶内儿茶素相近, 含量相对较高, 儿茶素总含量(干重)约为 8.221 mg·g<sup>-1</sup>; 只有在 B 固体培养基上诱导的茶愈伤组织, 生长速度快, 组织疏松, 较容易获得均一的愈伤组织, 且具备一定的儿茶素合成能力, 愈伤组织儿茶素总含量(干重)约为 4.112 mg·g<sup>-1</sup>。

表 1 不同培养基诱导的茶愈伤组织的特性

Table 1 Characters of tea callus induced from different culture mediums

培养基 Culture medium	愈伤组织特性 Characters of callus	儿茶素类型 Catechin type	儿茶素含量/mg·g <sup>-1</sup> Content (DW)
H	浅黄、生长速度缓慢、见光转绿	GC, C, EC, EGC	0.034±0.018
S	浅黄、生长速度缓慢、见光转绿	GC, C, EC, EGC, ECG, EGCG	8.221±2.311
B	浅白、生长速度快、见光不转绿	GC, C, EC, EGC, ECG, EGCG	4.112±1.374

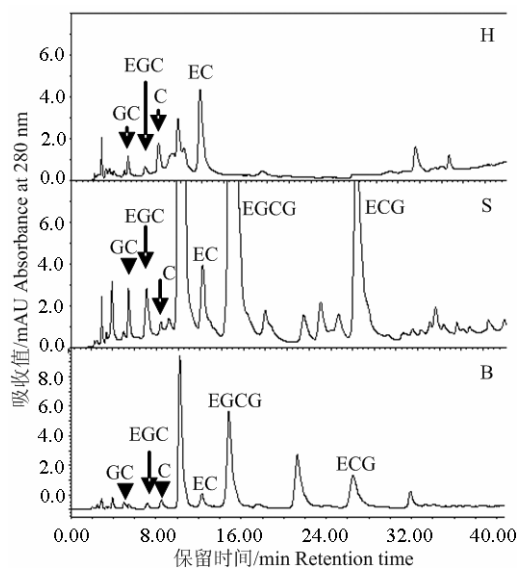
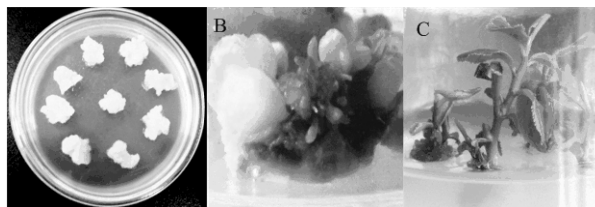


图 2 不同培养基(H, S, B)培养的愈伤组织中儿茶素分析  
Figure 2 Assay of catechins in tea callus induced with different culture mediums (H, S, B) by HPLC

### 2.2 不同外植体对茶愈伤组织儿茶素合成积累影响

由不同外植体诱导出的愈伤组织类型也不尽相同, 且儿茶素含量差异较大。图 3 结果显示, 由茶树种子诱导出的愈伤组织“NKZ79”, 其质地不均一, 呈不规则突起生长且生长迅速; 植株再生能力较强, 愈伤组织稳定性好, 可以稳定继代 4 年之久(图略);

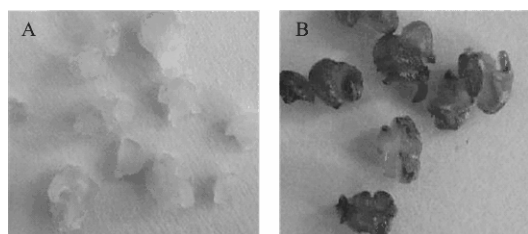
香草醛盐酸染色显示具有一定的儿茶素合成能力(图 4)。图 5 结果显示, 由茶树茎和叶诱导的愈伤组织“yunjing63”, 呈淡黄色, 质地均一, 生长旺盛; 但细胞照光后不能再生; 香草醛盐酸染色显示具有较强的儿茶素合成能力; HPLC 分析显示, 此类愈伤组织积累的儿茶素主要有 EGCG 和 ECG, 其次是 EC、EGC、C, 与鲜叶中的儿茶素组成类型相近, 总儿茶素含量(干重)为 5.02 mg·g<sup>-1</sup>(表 2)。



A. 黑暗下由农抗早种子诱导出的茶树愈伤组织“NKZ79”; B. 光照诱导 5 周后形成的不定芽; C. 芽诱导后培养 2 个月的茶树小苗

A. callus induced from seeds of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. var. *sinensis* cultivar nongkangzao in darkness; B. buds induced from “NKZ79” callus after five days’ illumination; C. tea seedlings cultured for two months after induction of bud

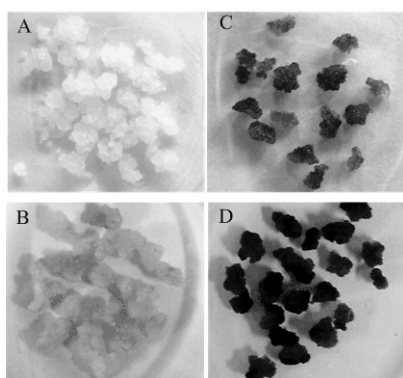
图 3 基于 NKZ79 愈伤组织的茶树植株再生体系  
Figure 3 Regeneration system of tea plant based on “NKZ79” callus



A 和 B 为香草醛盐酸染色前和染色后的 NKZ79 愈伤组织  
A and B: "NKZ79" callus before and after staining with vanillin-HCL

图 4 “NKZ79”愈伤组织的香草醛盐酸显色

Figure 4 “NKZ79” callus staining with vanillin-HCL



A 和 C: 细胞系 yunjing63Y 香草醛盐酸染色前后; B 和 D: 细胞系 yunjing63X 香草醛盐酸染色前后

A and C: Cell lines “yunjing63Y” before and after staining with vanillin-HCL; B and D: Cell lines “yunjing63X” before and after staining with vanillin-HCL

图 5 “yunjing63X”和“yunjing63Y”细胞系香草醛盐酸染色前后

Figure 5 The “yunjing63 X” and “yunjing63 Y” cell line before and after staining with vanillin-HCL

### 2.3 不同儿茶素含量的愈伤组织筛选

在获得上述长势较好, 且具有儿茶素合成能力的愈伤组织“yunjing63”的基础上, 通过目视法, 进一步将长势和颜色上有明显差异的愈伤组织分开,

表 2 “yunjing63X”和“yunjing63Y”细胞系中儿茶素含量(干重)

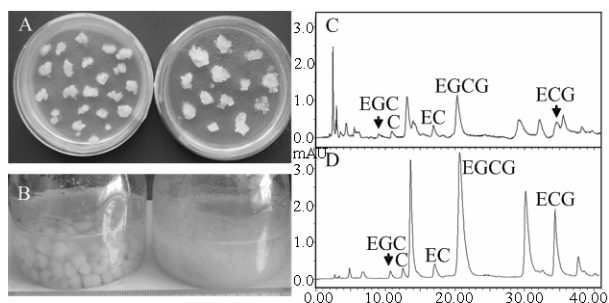
Table 2 Catechin contents (DW) in “yunjing63X” and “yunjing63Y” cell lines

细胞系 Cell line	ECG	EGCG	EC	C	EGC	总量 Content
Yunjing63(筛选母本)	1.10	2.90	0.52	0.28	0.21	5.02
Yunjing63X	0.03	0.04	0.01	0.03	0.02	0.13
Yunjing63Y	1.75	4.51	0.72	0.51	0.28	7.77
鲜叶 Freshleaf	14.79	32.64	10.39	1.47	6.84	66.13

## 3 讨论

植物组织培养包括器官培养、组织培养、胚培养、茎尖培养、花药培养、细胞培养等类型。已在快速繁殖、脱毒、单倍体育种、种质资源保存、在次生代谢产物等方面得到广泛运用<sup>[7-8]</sup>。愈伤组织诱

结合香草醛盐酸试剂活体快速显色法, 对愈伤组织进行复筛, 筛选出具有明显儿茶素含量差异的茶愈伤组织, “yunjing63X”和“yunjing63Y”(图 5)。从外形上看, “yunjing63X”细胞颜色发白, 松散, 而“yunjing63Y”颜色发黄, 略紧; “yunjing63X”细胞的悬浮性较好(图 6)。HPLC 分析表明(表 2), “yunjing63Y”的总儿茶素含量(干重)是  $7.77 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , “yunjing63X”总儿茶素含量(干重)仅为  $0.13 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 前者较后者高出近 59 倍。从儿茶素组成类型来看, 两种细胞系均含有鲜叶主要的 5 种儿茶素, 但“云茎 63Y”中总儿茶素含量中 EGCG、ECG、EGC、C 和 EC 的含量分别是“云茎 63X”中含量的 112、58、14、17 和 72 倍。



A. 固体培养基培养的“yunjing63X”和“yunjing63Y”细胞系形态; B. 液体培养基培养的“yunjing63X”和“yunjing63Y”细胞系形态; C. “yunjing63X”细胞系中儿茶素组成类型; D. “yunjing63Y”细胞系中儿茶素组成类型

A. Morphological characters of “yunjing 63X” and “yunjing 63Y” cell lines cultured on solid medium; B. Morphological characters of “yunjing 63X” and “yunjing 63Y” cell lines cultured in liquid medium; C. catechin components in “yunjing 63X” cell lines; D. catechin components in “yunjing 63Y” cell lines

图 6 “yunjing63X”和“yunjing63Y”细胞系形态、儿茶素组成类型

Figure 6 Morphological characters and catechin components in “yunjing 63X” and “yunjing 63Y” cell lines

导是植物组织培养过程中关键一环, 它的作用是使植物外植体脱分化形成分生能力强的愈伤, 以便于在进一步的培养中, 形成新植株。

愈伤组织诱导体系的建立, 为次生代谢研究奠定坚实基础。细胞培养物已被证明能产生许多有用的次生代谢物, 包括生物碱、糖苷、萜类化合物、

香精、植物杀虫剂等<sup>[9]</sup>。Lu 研究了不同诱导子对人参皂苷合成的影响, 在人参的悬浮培养过程中加入茉莉酮酸酯, 人参皂甙含量为对照的 28 倍<sup>[10]</sup>。Linus 研究了不同生长素对桔叶鸡眼藤悬浮细胞积累蒽醌(AQ)影响<sup>[11]</sup>, 指出在添加 1 mol·L<sup>-1</sup> NAA 的 B<sub>5</sub> 培养基中, 能产生大量蒽醌(AQ)。而在培养基中加入 1 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 时, 没有 AQ 产生。

不同的外植体诱导出的愈伤组织类型和次生代谢能力往往差异较大。不同来源的东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)愈伤组织, 芽愈伤生长最快, 叶最慢, 但叶愈伤组织中紫杉醇含量最高, 是芽或茎愈伤组织 3 倍<sup>[12]</sup>。以银杏的不同外植体诱导愈伤组织, 其诱导率高低顺序依次为子叶、叶片、茎段<sup>[13]</sup>。陈学森等报道, 银杏叶、茎、根来源的愈伤组织黄酮含量分别为 1.5%、1.0%和 0.3%<sup>[14]</sup>。王黎等报道根诱导形成的软紫草愈伤组织色素含量较子叶诱导愈伤高 13 倍<sup>[15]</sup>。

在茶树组织培养过程中, 不同的组织器官几乎都可以诱导出愈伤组织, 但是各种材料诱导出的愈伤组织时间各不相同, 一般来说, 幼嫩的材料比成熟的材料更容易诱导出愈伤组织, 同时幼嫩组织诱导出的愈伤增殖也更活跃<sup>[16]</sup>。本研究过程中发现茶愈伤组织幼嫩的茎和叶在 B 培养基上诱导出的愈伤组织类型较为相似, 无明显差别, 多酚合成能力较强, 具有合成酯型儿茶素的能力。但由种子诱导出的茶愈伤组织与叶茎诱导出的愈伤差别较大, 表现为细胞长势好, 细胞团不均一, 植株再生能力强, 但儿茶素合成能力有限。

不同的培养基成分对诱导愈伤组织类型影响较大, 即使在同一培养基上使用同一类型外植体, 诱导出的愈伤也存在差异, 这种差异可能源于愈伤组织潜在的变异。这种变异在组织培养过程中是非常普遍的, 可能和外植体类型<sup>[17]</sup>、继代时间<sup>[18]</sup>、培养基激素<sup>[19]</sup>有关。有人认为外植体细胞中已经积累了遗传变异, 细胞分裂能力较强的分生组织比高度分化的组织器官诱导出的愈伤组变异要少<sup>[17]</sup>。Fras 等认为愈伤组织变异与外植体基因型有关<sup>[20]</sup>, 也有研究表明愈伤组织的变异率随继代次数增多和培养时间的延长而增加<sup>[18]</sup>。另外, 培养基中加入 2,4-D、6-BA 也会引起染色体变异<sup>[19]</sup>。笔者发现茶树愈伤组织诱导和长期继代过程中, 愈伤组织变异时有发生。本实验在 B 培养基上以茶树品种云南大叶种的嫩茎诱导出了具有较强儿茶素合成能力的愈伤组织“yunjing63”。该愈伤组织在长期的继代过程中,

有不同细胞系的分化特定, 在此基础上笔者通过努力成功筛选出两种儿茶素积累有明显差别的“yunjing63X”和“yunjing63Y”细胞系, 但不断变异的细胞系为筛选出优良细胞系的保存提出了严峻的挑战。如何降低或减缓细胞系的变异, 如何有效保存筛选的细胞系将是今后研究的重点所在。

## 参考文献:

- [1] Wang Y S, Gao L P, Shan Y, et al. Influence of shade on flavonoid biosynthesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)[J]. *Sci Hortic*, 2012, 141: 7-16.
- [2] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 140-142.
- [3] 柳洁, 肖斌, 王丽霞, 等. 盐胁迫下丛枝菌根(AM)对茶树生长及茶叶品质的影响[J]. *茶叶科学*, 2013, 33(02): 140-146.
- [4] 苏国庆, 王莉, 刘玉军. 植物细胞培养中的高产细胞系筛选[J]. *海南师范学院学报: 自然科学版*, 2005, 18(4): 364-368.
- [5] Yamamoto Y, Mizuguchi R. Selection of a high and stable pigment-producing strain in cultured *Euphorbia millii* cells[J]. *Theor Appl Genet*, 1982, 61: 113-116.
- [6] 吴蕴祺, 朱蔚华, 陆俭, 等. 红豆杉愈伤组织中 sinenxans 高产细胞系的选择及其培养[J]. *中国药学杂志*, 1998, 33(01): 15-18.
- [7] 梁称福. 植物组织培养研究进展与应用概况[J]. *经济林研究*, 2005, 23(4): 364-368.
- [8] Georgiev M I, Weber J, Maciuk A. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83(5): 809-823.
- [9] 查夫拉 H S, 许亦农, 麻密. 植物生物技术导论[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 112-116.
- [10] Lu M B, Wong H L, Teng W L. Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*[J]. *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 674-677.
- [11] Linus H W, Eijkelboom C, Hagendoorn M J M. Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspensions[J]. *Plant Cell Tiss Org*, 1995, 43: 111-116.
- [12] 蔡朝晖, 高山林, 朱丹尼. 东北红豆杉愈伤组织的诱导、生长及紫杉醇含量的测定[J]. *药物生物技术*, 1995(2): 11-14.
- [13] 徐刚标, 何方, 陈良昌. 银杏愈伤组织诱导与继代培养的研究[J]. *中南林学院学报*, 1999, 19(3): 32-36.
- [14] 陈学森, 邓秀新, 章文才. 培养基及培养条件对银杏愈伤组织黄酮产量的影响[J]. *园艺学报*, 1997, 24(4): 373-377.
- [15] 王黎, 张治国, 蔡志光, 等. 软紫草愈伤组织的初步培养[J]. *广西植物*, 1994, 14(4): 345-348.
- [16] 成浩, 李素芳. 茶树组织培养再生技术的研究[J]. *中国茶叶*, 1996(3): 28-30.
- [17] Feher F, Hangyel Tarczy M, Bocsa I, et al. Somaclonal chromosome variation in tetraploid alfalfa[J]. *Plant Sci*, 1989, 60(1): 91-99.
- [18] Morrish F, Hanna W, Vasil I. The expression and perpetuation of inherent somatic variation in regenerants from embryonic cultures of *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.(pearl millet)[J]. *Theor Appl Genet*, 1990, 80(3): 409-416.
- [19] Ramsay J L, Galitz D S, Lee C W. Basal medium and sucrose concentration influence regeneration of Easter Lily in ovary culture[J]. *Hortscience*, 2003, 38(3): 404-406.
- [20] Fras A, Maluszynska J. The correlation between the chromosome variation in callus and genotype of explants of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Genetica*, 2004, 121(2): 145-154.