

广藿香同源八倍体诱导与鉴定

严寒静, 熊洋, 叶燕莹, 黄伟剑, 何梦玲*

(广东药学院中药学院, 广州 510006)

摘要: 为诱导广藿香 [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] 同源八倍体, 采用组织培养方法, 研究了秋水仙素对广藿香同源八倍体诱导的影响。结果表明, 以 0.05% 秋水仙素浸泡广藿香组培丛生芽 72 h 的效果最佳, 形态学鉴定处理苗的变异率达 85%, 且八倍体苗的染色体数目为 $2n=8x=128$, 八倍体苗的根茎粗壮, 叶片大而厚, 颜色深, 叶形指数小, 叶片下表皮的气孔个体大、密度小, 保卫细胞中的叶绿体数目多, 植株形态学性状优良。这为进一步获得高产、活性成分含量高的广藿香优良品系奠定基础。

关键词: 广藿香; 秋水仙素; 八倍体; 诱导; 鉴定

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.04.005

Induction and Identification of Homologous Octoploid in *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.

YAN Han-jing, XIONG Yang, YE Yan-ying, HUANG Wei-jian, HE Meng-ling*

(College of Traditional Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to induce homologous octoploid of *Pogostemon cablin*, the effects of colchicine on induction rate were studied by using *in vitro* culture. Three kinds of explants, including adventitious buds, regenerated seedlings and calli, were used as material. The results showed that the induction rate of adventitious buds treated with 0.05% colchicine for 72 hours reached 85% accounting for total buds. The chromosome number of octoploid seedlings was $2n=8x=128$, the roots and stems of octoploid *P. cablin* were thick and strong with large and dark leaves, small leaf index, and the stomata in lower epidermis were large and low density with much chloroplasts in guard cells, the mutant seedlings had good morphological traits. Therefore, the induction method would establish basis for breeding excellent strains of *P. cablin* with high yield and content of active ingredients.

Key words: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; Colchicine; Octoploid; Induction; Identification

广藿香 [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] 为唇形科 (Labiatae) 刺蕊草属植物, 以干燥地上部分入药, 其性辛、微温, 具有芳香化湿、开胃止呕、发表解暑的功效^[1]。广藿香为广东道地药材, “十大广药”之一, 是著名中成药“藿香正气丸”、“藿胆丸”以及中药制剂“抗病毒口服液”的主要原料。广藿香原产于南亚等国, 最早自宋代引入我国。其药材商品按产地不同分为‘牌香’ (广州产)、‘枝香’ (肇庆产)

和‘南香’ (湛江和海南产), 以‘牌香’为道地药材^[2]。目前对广藿香的本草考证、栽培生理、农药和重金属残留、挥发油化学成分和药理药效等方面已有系统的研究报道^[3]。

但据最新的研究报道, 广藿香栽培现状令人堪忧。城市的发展破坏了广藿香的道地产区, 长期无性繁殖也导致广藿香的遗传多样性水平较低^[4]、病虫害发生率高、连作重茬严重、种质退化等问题, 目

收稿日期: 2013-09-13

接受日期: 2013-12-23

基金项目: 广东省科技厅项目 (粤科规划字 [2012] 145 号); 广东省中医药管理局项目 (20111252); 中山市科技计划项目 (20101H019) 资助

作者简介: 严寒静 (1972~), 女, 副教授, 长期从事中药资源与环境相关性研究。E-mail: yanhanjing1211@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: hmldf@126.com

前栽培的品种主要是植株高大的‘南香’,‘牌香’和‘枝香’已经濒临灭绝^[5]。但事实上‘牌香’品质最佳,‘枝香’次之,都做药用,而‘南香’仅能用来提取挥发油^[6]。因此,培育优质高产的广藿香新品种具有重大的理论和现实意义。多倍体植物具有巨大性、产量高、药用成分含量高、适应性和抗逆性强等优点,从目前药用植物多倍体育种的实践来看,其效果令人鼓舞^[7]。广藿香的组织培养技术成熟^[8-9],且品质稳定^[10]。本文采用组织培养与化学诱导相结合的方法,以道地药材品种‘牌香’为母本进行同源八倍体的诱导和鉴定,旨在为进一步选育高产、活性成分含量高的优良品种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

材料为唇形科植物石牌广藿香(*Pogostemon cablin* ‘Shipaiensis’),采自广东省广州市大学城广东药学院药圃。四倍体广藿香及诱导得到的八倍体广藿香凭证标本均保存于广东药学院标本馆(GDMP)。

1.2 无菌苗材料的获得

于晴天上午采摘广藿香幼嫩叶片,流水冲洗30 min, 75%乙醇消毒5 s、升汞浸泡10~15 min,剪取0.6 cm²的叶片接种于MS+0.2 mg L⁻¹ 6-BA+0.1 mg L⁻¹ NAA培养基上,在12 h d⁻¹光照下培养,1个月后取长为5 cm左右的不定芽接种于1/2MS生根培养基上,生长1个月后得到无菌苗。

1.3 广藿香同源八倍体诱导及鉴定

广藿香诱导材料的选择 根据广藿香组培苗分化程度的不同,分别以愈伤组织、丛生芽、再生苗作为诱导材料,这些材料的获得方法如下:用0.6 cm²的叶片接种于MS+0.5 mg L⁻¹ 6-BA+0.2 mg L⁻¹ NAA培养基上,在12 h d⁻¹光照下培养30 d获得愈伤组织。用同等大小的叶片接种于MS+0.2 mg L⁻¹ 6-BA+0.1 mg L⁻¹ NAA培养基上,在12 h d⁻¹光照下培养,待不定芽长到5 mm左右时收获丛生芽。将不定芽转接到1/2MS培养基上,在12 h d⁻¹光照下培养30 d获得再生苗。愈伤组织、丛生芽和再生苗各自分别用0.05%、0.1%和0.2%秋水仙素浸泡24 h,所有材料用秋水仙素浸泡后用无菌水冲干净,

愈伤组织转接到愈伤组织培养基,丛生芽和再生苗转接到1/2MS培养基继续培养,根据生长状况不断更换新鲜培养基,60 d后观察统计,以筛选最佳诱导材料。以上每个处理均选取10个材料。

浸泡法的条件优化 0.05%秋水仙素加2% DMSO混合溶液过滤灭菌后避光浸泡广藿香‘牌香’材料,同时在40 r min⁻¹的摇床上震荡,分别处理12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h、96 h,每个处理接种40个材料。经秋水仙素浸泡后的愈伤组织转接到愈伤组织培养基,丛生芽和再生苗转接到1/2MS生根培养基中,在12 h d⁻¹光照下培养,待幼苗长至12 cm左右时,进行炼苗、移栽。移栽15 d后统计诱导率。以处理植株的叶片明显变大、变宽、变厚,叶片锯齿变深同时叶片下表皮保卫细胞变大、单位面积气孔数目减少、保卫细胞叶绿体数增多作为形态变异指标,统计诱导率。诱导率=[变异株数/处理(成活)株数]×100%^[11]。经秋水仙素处理后,除顶芽外还会长出一些侧芽,这些侧芽发育而成的苗也在统计范围之内。

广藿香同源八倍体的鉴定 (1)表型变异特征的观察测定。以诱导后出现表型变异的幼苗作为八倍体的初筛群体,根据气孔特征进行2次筛选,选取气孔明显变大、保卫细胞内叶绿体数明显增多的幼苗;(2)根尖染色体计数^[12-14]。于上午10:30左右取长为1~2 cm的根尖,采用去壁低渗法,用冰水混合液处理24 h,再用4%混合酶液(纤维素酶和果胶酶各占4%, m/V)酶解30 min、低渗15 min,然后用改良卡宝品红染色20 min,进行染色体鉴定,每个植株统计50个清晰的分裂期细胞,3次以上鉴定为八倍体的植株予以保留繁殖。

1.4 广藿香四倍体与八倍体植株的比较

形态特征比较 炼苗移栽后,观察对比广藿香四倍体与八倍体的株高、茎粗、叶形、叶色、叶边缘锯齿的多少及深浅,叶片的大小等。取室温生长3个月的四倍体、八倍体各5株,每株各取中部成熟叶片4片,测量叶面积、叶长、叶宽,计算叶形指数。

气孔特征比较 取室温生长3个月的广藿香四倍体、八倍体各5株,每株各取中部成熟叶片4片,撕取下表皮,测量保卫细胞长度、宽度、叶绿体数。每片叶测量20个气孔^[13],计算平均值,并统计气孔密度(气孔密度=气孔数/面积)。

2 结果和分析

2.1 广藿香同源八倍体诱导

诱导材料的选择 对比广藿香 3 种诱导材料,从表 1 可以看出,愈伤组织过于幼嫩,0.05%和 0.1%秋水仙素处理后幼苗有少量成活,0.05%秋水仙素处理后存活苗的诱导率较低,仅为 6.25%,0.1%和 0.2%秋水仙素处理的诱导率为 0。丛生芽经 0.05%和 0.1%秋水仙素处理后均能正常生长,存活苗的诱导率均较高,分别为 36.61%和 30.45%,丛生芽经 0.2%秋水仙素处理后的死亡率较高,但存活苗的诱导率仍有 22.34%。而再生苗对秋水仙素的敏感度明显降低,经 0.05%和 0.1%秋水仙素处理后虽能正常生长,但 0.05%秋水仙素浓度太低(0.05%),存活苗的诱导率仅有 9.09%,0.1%秋水仙素处理的存活苗的诱导率可达 25.45%,再生苗经 0.2%秋水仙素处理后的死亡率较高。因此,选择丛生芽作为广藿香八倍体的诱导材料较为合适,秋水仙素的浓度以 0.05%为宜。

浸泡法时间的优化 如图 1 所示,随 0.05%

秋水仙素(含 2% DMSO)浸泡时间的延长,广藿香丛生芽的八倍体诱导率逐渐升高,浸泡 72 h 的诱导率达到最高,85% 的处理芽均诱导出八倍体。浸泡时间再继续延长,诱导率出现快速下降,浸泡 96 h 的诱导率约为 35% 左右。

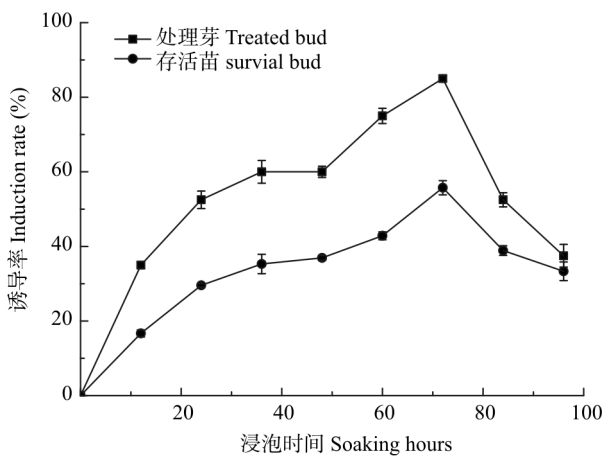


图 1 秋水仙素浸泡时间对诱导广藿香同源八倍体的影响
Fig. 1 Effects of colchicine soaking time on octoploid induction rate of *Pogostemon cablin*

表 1 广藿香不同诱导材料的选择
Table 1 Different induction materials of *Pogostemon cablin*

材料 Material	秋水仙素 Colchicine (%)	生长状况 Growth status	存活苗的诱导率 Induction rate of survival seedlings (%)
愈伤组织 Calli	0.05	+	6.25±2.81
	0.1	芽少,叶色黄 Few buds, yellow leaves	—
	0.2	死亡 Death	—
丛生芽 Adentitious bud	0.05	+++	36.61±2.03
	0.1	++	30.45±3.25
	0.2	死亡率高 High mortality rate	22.34±2.93
再生苗 Regenerated seedling	0.05	++++	9.09±1.54
	0.1	+++	25.45±2.34
	0.2	死亡率高 High mortality rate	—

+:长势正常; -:无存活苗
+:Normal growth; -:No survival seedling.

2.2 广藿香同源八倍体形态学鉴定

形态学比较 无菌苗经炼苗、移栽后,在室温生长 3 个月,广藿香八倍体与四倍体植株在形态上表现出明显差异(图 2、表 2)。与四倍体植株相比,八倍体植株更加高大,且茎枝粗壮、叶色更深、叶面积增大、叶形指数变小、锯齿加深,但锯齿数不变。

四倍体植株和八倍体植株在叶长、叶宽、叶形指数和叶面积上均达到差异显著水平($P<0.05$)。

气孔与叶绿体数目的比较 与四倍体广藿香相比,八倍体广藿香的气孔明显变大,密度变小,保卫细胞中的叶绿体数目也增加(表 3、图 3)。四倍体植株和八倍体植株在保卫细胞的长和宽、气孔密

表 2 广藿香四倍体和同源八倍体叶片特征比较

Table 2 Leaf characteristics in tetraploid and octoploid of *Pogostemon cablin*

倍性 Ploidy	叶长 Leaf length (cm)	叶宽 Leaf width (cm)	叶形指数 Leaf index	叶面积 Leaf area (cm ²)
四倍体 Tetraploid	6.55±0.21	5.08±0.14	1.3±0.03	24.17±1.10
八倍体 Octoploid	7.23±0.13*	6.84±0.18*	1.06±0.02*	35.37±1.15*

*, $P<0.05$

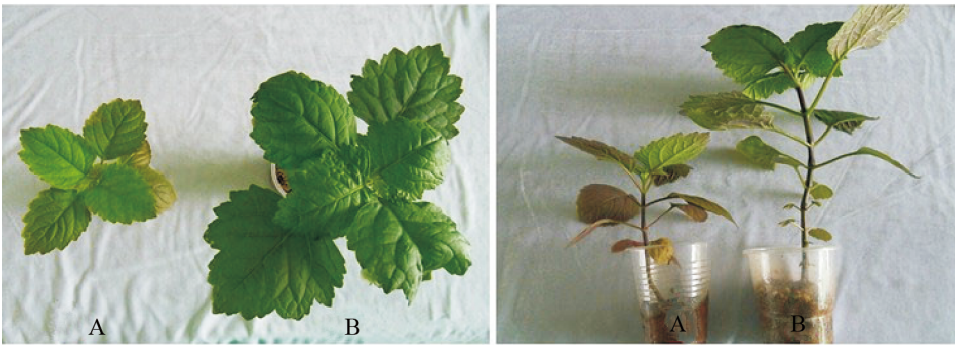


图 2 广藿香四倍体与八倍体植株形态。A: 四倍体; B: 八倍体。
Fig. 2 Plant morphology of *Pogostemon cablin*. A: Tetraploid plant; B: Octoploid plant.

表 3 广藿香四倍体和同源八倍体的气孔特征比较

Table 3 Stomata characteristics in tetraploid and octoploid *Pogostemon cablin*

倍性 Ploidy	保卫细胞长 (μm) Length of guard cell	保卫细胞宽 (μm) Width of guard cell	气孔密度 (mm ⁻²) Stomata density	保卫细胞的叶绿体数 Number of chloroplasts in stomata
四倍体 Tetraploid	29.15±0.48	23.00±0.29	7.01±0.2	6.36±0.44
八倍体 Octoploid	41.41±0.68*	29.07±0.49*	3.48±0.16*	14.04±0.45*

*, $P<0.05$

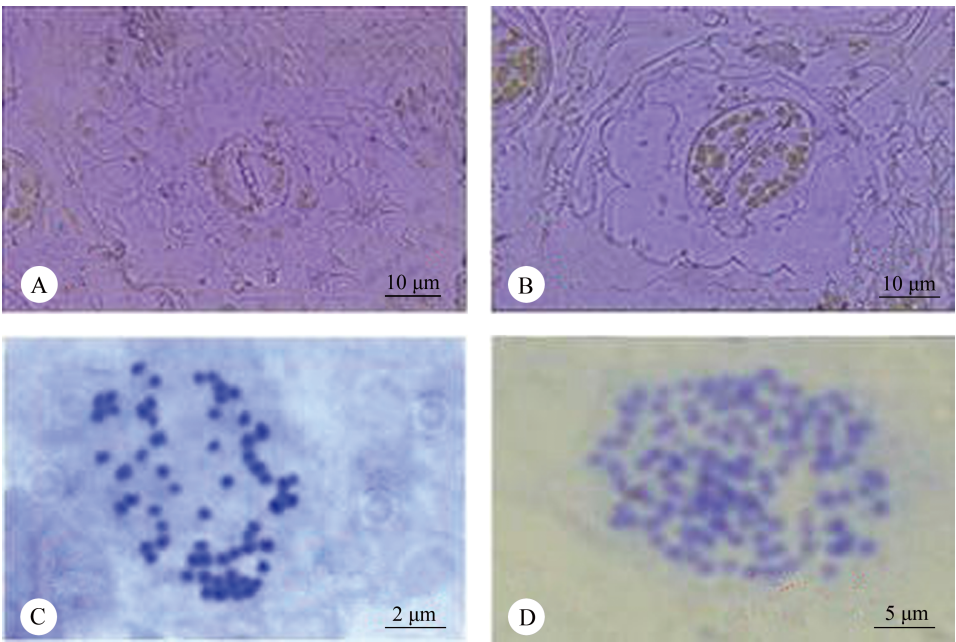


图 3 广藿香四倍体与同源八倍体气孔特征(A, B)及染色体数目(C, D)的比较。A, C: 四倍体, $2n=4x=64$; B, D: 八倍体, $2n=8x=128$ 。
Fig. 3 Stomata characteristics (A, B) and chromosome number (C, D) of *Pogostemon cablin*. A, C: Tetraploid, $2n=4x=64$; B, D: Octoploid, $2n=8x=128$.

度以及保卫细胞中的叶绿体数目上的差异均达显著水平($P<0.05$)。

2.3 染色体数目的鉴定

对筛选出的变异株及四倍体对照株分别进行染色体数目鉴定。结果表明,未经处理的四倍体植株根尖细胞染色体数为 $2n=4x=64$;而经秋水仙素处理后获得了纯合的同源八倍体植株,根尖细胞染色体数目为 $2n=8x=128$ (图3),染色体数目比四倍体增加了一倍,且细胞体积也明显增大。

3 讨论

唇形科刺蕊草属植物的染色体基数有 $x=16$ ^[14],已有报道药用植物广藿香的染色体数目为 $2n=64$ ^[15-16],因此广藿香为四倍体植株。

同源多倍体的诱导方法多样,选择不同的处理方法是影响诱导率的关键因素。组织培养与化学诱导相结合的方法具有取材方便,材料稳定的特点,已在多种药用植物,如丹参(*Salvia miltiorrhiza*)^[17]、扁茎黄芩(*Astragalus complanatus*)^[18]、盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis*)^[19]等的同源四倍体诱导中得到应用,并获得成功。本研究结果表明,此方法也适用于广藿香同源八倍体的诱导。

关于诱导材料的选择,理论上处理材料分化程度越低,越容易诱导产生较多的纯合多倍体。同时,材料对诱变剂的敏感度越高,经处理后越难恢复正常的生长发育,难以把握诱变剂的浓度和处理时间。本实验通过比较广藿香的愈伤组织、丛生芽、再生苗3种材料,结果表明丛生芽经秋水仙素处理后较容易获得纯合多倍体,这与金银花(*Lonicera japonica*)同源四倍体的诱导研究结果一致^[20]。愈伤组织经秋水仙素浸泡后,药液易残存在愈伤组织内,致使愈伤组织难以恢复正常生长分化。而再生苗的顶端分生组织有3层细胞^[21],必须同时使这3层细胞加倍才会得到纯合多倍体,所以秋水仙素处理再生苗得到嵌合体的几率很大。

秋水仙素的处理浓度和时间组合是影响染色体加倍最重要的外在条件。由于不同来源的外植体对秋水仙素的反应、耐受能力及敏感程度不同而导致不同植物有不同的组合。秋水仙素处理浓度在0.0006%~1.6%之间均有成功的报道,处理时间也从几小时到数天不等。具体到广藿香丛生芽,最

佳的诱导浓度和时间分别为0.05%(含2% DMSO)和72 h。研究结果表明,秋水仙素能有效诱导广藿香多倍体,并且随着秋水仙素浓度的增加、处理时间的增长,对幼苗的生长抑制越强。低浓度秋水仙素、长时间浸泡是提高广藿香同源八倍体诱导率的有效方法。

秋水仙素诱导的广藿香八倍体植株表现出节间变短变粗、叶色更深、叶面积增大、叶形指数变小等现象。同时其八倍体植株的气孔长度和宽度,气孔密度,保卫细胞中的叶绿体数均与四倍体植株有显著差异,这与相关研究报道多倍体的结论一致^[15-17]。因此,可根据形态上的显著差异进行多倍体初步筛选。

植物多倍体化过程中染色体发生变异,最终引起产量和有效成分含量也发生变化,使优良品种的获得成为可能。本实验基于组织培养进行广藿香多倍体诱导,能节约育种时间,为解决广藿香道地品种退化等问题提供了有效方法。本实验采用秋水仙素诱导广藿香同源八倍体,并成功获得了植株高大、枝条粗壮、叶片宽厚的‘牌香’多倍体植株,克服了四倍体‘牌香’植株弱小、产量低、抗性差等问题,为后续高产优良品系的筛选奠定了基础。

参考文献

- [1] National Committee of Pharmacopoeia. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Vol. 1 [M]. Beijing: Chemical Industrial Publishing House, 2010: 42-43.
国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 第一部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 42-43.
- [2] Li W, Pan C M, Xu H H, et al. The observation and comparison of *Pogostemon cablin* from different habitats [J]. Chin Med Mat, 2002, 25(7): 463-465.
李薇, 潘超美, 徐鸿华, 等. 不同产地广藿香特征的观测和比较 [J]. 中药材, 2002, 25(7): 463-465.
- [3] Wu Y G, Wu L H, He J C. Progress in research of the hereditary basis and biotechnology of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. [J]. J Trop Org, 2010, 1(3): 288-292.
吴友根, 吴连花, 何际婵. 广藿香遗传基础及生物技术研究进展 [J]. 热带生物学报, 2010, 1(3): 288-292.
- [4] Pan C M, Li W, He H, et al. Study on intraspecific genetic diversity in different plant populations of *Pogostemon cablin* [J]. Chin J Chin Mat Med, 2006, 31(9): 723-726.
潘超美, 李薇, 贺红, 等. 不同栽培居群广藿香的种内遗传多样性研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(9): 723-726.
- [5] He Z G, Li J K, Ga W, et al. The strategy to promote the development

- of planting industry of *Pogostemon cablin* in Guangdong Province [J]. Chin Agri Sci Bull, 2012, 28(31): 288–292.
- 何国振, 李锦坤, 高伟, 等. 广东省广藿香种植业发展策略 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(31): 288–292.
- [6] Luo J P, Liu Y P, Feng Y F, et al. Two chemotypes of *Pogostemon cablin* and influence of region of cultivation and harvesting time on volatile oil composition [J]. Acta Pharm Sin, 2003, 38(4): 307–310.
- 罗集鹏, 刘玉萍, 冯毅凡, 等. 广藿香的两个化学型及产地与采收期对其挥发油成分的影响 [J]. 药学学报, 2003, 38(4): 307–310.
- [7] Zhang H M, Xu T F, Guo M L, et al. Polyploid breeding of medicinal plant [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2002, 33(7): Appendix 1–Appendix 3.
- 张汉明, 许铁峰, 郭美丽, 等. 药用植物的多倍体育种 [J]. 中草药, 2002, 33(7): 附1–附3.
- [8] Du Q, Wang Z H, Xu H H. Tissue culture and rapid reproduction of *Pogostemon cablin* [J]. Plant Physiol Commun, 2002, 38(5): 454–455.
- 杜勤, 王振华, 徐鸿华. 广藿香的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(5): 454–455.
- [9] Lin X H, He H, Wu L R, et al. Studies on callus induction and plantlets regeneration of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. [J]. J Guangzhou Univ Trad Chin Med, 2009, 26(2): 171–175.
- 林小桦, 贺红, 吴立蓉, 等. 广藿香愈伤组织诱导和分化再生植株的研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(2): 171–175.
- [10] Yu L W, Zhong Y Z, Li W, et al. Influence of reproduction methods on volatile oil of *Pogostemon cablin* Benth. [J]. Trad Chin Drug Res Clin Pharmac, 2008, 19(4): 296–298.
- 喻良文, 钟燕珠, 李薇, 等. 不同繁殖方式的广藿香药材挥发油分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(4): 296–298.
- [11] Zhou Y L, Ren S F, Zhang C H. Polyploidy induction and identification in *Forsythia suspense* [J]. J Agri Univ Hebei, 34(1): 73–77.
- 周玉丽, 任士福, 张成合. 连翘多倍体诱导与鉴定 [J]. 河北农业大学学报, 2011, 34(1): 73–77.
- [12] Wang X H, Xiong L, Qu Y H, et al. The ployploid induction and identification of *Platycodon grandiflorus* (Campanulaceae) in China [J]. Acta Bot Yunnan, 2006, 28(6): 593–598.
- 王小华, 熊丽, 屈云慧, 等. 中国桔梗多倍体诱导与鉴定 [J]. 云南植物研究, 2006, 28(6): 593–598.
- [13] Gao S L, Huang H P, Wei K H. Tissue culture and generation of autotetraploid plants of *Sophora flavescens* Aiton [J]. Pharmacogn Mag, 2010, 6(24): 286–292.
- [14] Cherian M, Kuriachan P I. Cytotaxonomic studies of the subtribe *Pogostemoninae sensu* Benth (Labiatae) from south India [J]. Cytologia, 1993, 58(4): 439–444.
- [15] Chen R Y, Chen C B, Liang G L, et al. Chromosome Atlas of Major Economic Plants Genome in China, Tomus V: Chromosome Atlas of Medicinal Plants in China [M]. Beijing: Science Press, 2009: 1–341.
- 陈瑞阳, 陈成彬, 梁国鲁, 等. 中国主要经济植物基因组染色体图谱, 第五册 中国药用植物染色体图谱 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 1–341.
- [16] Xiong Y, He M L, He F, et al. Chromosome sectioning optimization and chromosome counting of three cultivars of *Pogostemon cablin* [J]. Guangdong Agri Sci, 2013, 40(24): 31–35.
- 熊洋, 何梦玲, 何芳, 等. 3个广藿香品种染色体制片技术优化与计数 [J]. 广东农业科学, 2013, 40(24): 31–35.
- [17] Fang C P, Shan C G, Wang W T, et al. Study on the identification of polyploidy of *Salvia miltiorrhiza* multiple shoots induced by coichicine in Shandong [J]. J Anhui Agri Sci, 2011, 39(24): 14629–14631.
- 房翠萍, 单成钢, 王维婷, 等. 秋水仙素诱导山东丹参丛生芽多倍体的研究及鉴定 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(24): 14629–14631.
- [18] Wang L Y, Jin R Y, Xiao L J, et al. Rapid propagation *in vitro* and polyploid induction of *Astragalus complanatus* [J]. Acta Agrest Sin, 2009, 18(1): 94–99.
- 王丽艳, 荆瑞勇, 肖莉杰, 等. 扁茎黄芪离体快繁及多倍体诱导 [J]. 草业学报, 2009, 18(1): 94–99.
- [19] Xie C X, Gao S L, Qin H Z, et al. The inducement and identification of the polyploid of *Dioscorea zingibiersis* [J]. Pharm Biotechn, 2005, 12(1): 15–18, 35.
- 谢彩侠, 高山林, 秦慧贞, 等. 盾叶薯蓣同源四倍体的诱导和鉴定 [J]. 药物生物技术, 2005, 12(1): 15–18, 35.
- [20] Xiang Z X, Gao S L. Induction of autotetraploid and identification in *Lonicera japonica* Thunb. [J]. Chin J Chin Mat Med, 2008, 33(6): 696–697.
- 向增旭, 高山林. 金银花同源四倍体的诱导和鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(6): 696–697.
- [21] Li T F, Cai D T. Studies on mechanism and research progress of plant chimera [J]. J Hubei Univ (Nat Sci), 2002, 24(1): 81–86.
- 李天菲, 蔡得田. 植物嵌合体机理及研究进展 [J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2002, 24(1): 81–86.