维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:1671-5497(2006)04-0628-07

基于组合试验设计的两种植物愈伤组织的培养基

孙 莉[1],赵 露[2]

(1.长春大学 生物科学技术学院,长春 130036;2.吉林农业大学 中药材学院,长春 130118)

摘 要:采用二次回归正交组合设计,进行西洋参愈伤组织、胡萝卜愈伤组织生长率的研究。试验因子为3种植物激素:2,4-D、IAA和ZT。每个因子设5水平,共17个处理。首先利用SPSS统计分析软件对生长率试验结果进行参数回归分析和统计检验。然后用Matlab软件分别绘制2种植物愈伤组织生长率趋势图。最后分别选择出有利于西洋参愈伤组织生长、不利于胡萝卜愈伤组织生长的培养基(MS+2,4-D 1.14 mg/L+IAA 1.37 mg/L+ZT 0.47 mg/L),有利于胡萝卜愈伤组织生长、不利于西洋参愈伤组织生长的培养基(MS+2,4-D 3.30 mg/L+IAA 0.55 mg/L+ZT 0.29 mg/L)和同时满足两种植物愈伤组织生长的培养基(MS+2,4-D 1.67 mg/L+IAA 0.98 mg/L+ZT 0.47 mg/L)。

关键词:生物工程;组织培养;组合设计;愈伤组织;培养基

中图分类号:Q813.1 **文献标识码**:A

Effect of medium on callus of two different plants with orthogonal test design combinations

Sun Li[1], Zhao Lu[2]

(1. *College of Biological Scientific and Technical, Changchun University, Changchun* 130036, *China*; 2. *College of Traditional Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun* 130118, *China*)

Abstract: Experimental materials are cotyledon of American ginseng/s (Panax quinquefolium linne) seed embryo, hypocotyl of carrot/s (Daucus carota) seedling from seed. Experimental design is the orthogonal design combination with quadratic regression. The experiment has 17 treatments with 3 factors those were as follows: 2,4-D, IAA and ZT. Every factor supposed 5 levels. First, the regression parameters of the growth rate were carried out by SPSS statistical analysis software based on test results. Then, tendency diagrams of the growth rates for two plants callus were drawn up by the Matlab software. Finally, the media with different function were chosen. The callus of the American ginseng preferred the medium (MS+2,4-D1.14 mg/L + IAA1.37 mg/L+ZT0.47 mg/L). For the carrot, the greater rate of the callus growth was seen in the medium (MS+2,4-D 3.30 mg/L+IAA 0.55 mg/L+ZT 0.29 mg/L). The rate of induction and growth of callus for both American ginseng and carrot was higher in the medium (MS+ 2,4-D 1.67 mg/L+IAA 0.98 mg/L+ZT 0.47 mg/L).

Key words: bioengineering; tissue culture; design combination; callus; medium

---

收稿日期:2005-06-04.

基金项目:吉林省教育厅"产学结合"项目.

作者简介:孙莉(1959-),女,副教授.研究方向:植物遗传育种及良种繁育技术. E-mail:sunl@ccu-edu.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com

0 引　言

原生质体融合是20世纪70年代初发展起来的一项生物技术。通过原生质体融合可以克服远缘有性杂交不亲和性,实现多基因、多性状的转移[1,2]。利用这项技术迄今已获得了许多种、属、亚科及科间体细胞杂种[3-5]。原生质体融合的前提是需要获得大量生活力旺盛的原生质体,因此供体的选择就成为原生质体培养能否成功的关键因素之一。实践证明,由胚性愈伤组织游离出的原生质体能够在培养过程中持续分裂并具有较强的器官分化能力[6]。愈伤组织的诱导受到培养基成分中植物生长调节剂等因素的影响较大[7]。采用常规试验设计对各种植物生长调节剂的配比选择存在经验性、盲目性和偶然性等问题。二次回归正交试验设计是一种处理多因素试验的方法,具有试验次数少、精确度高、数据处理简便并可进行优化分析等优点[8]。二次回归正交试验设计在愈伤组织共培养方面的应用少见报道[9]。作者通过组合试验设计与优化,得到可同时满足西洋参与胡萝卜愈伤组织生长的理想培养基,为2种植物的原生质体融合奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验方案

试验采用二次回归正交组合设计。设置2,4-D、IAA和ZT三个因子各5个水平,共17个处理。利用SPSS统计分析软件对试验结果做回归系数的计算和统计检验。

1.2 试验材料

为降低试验材料中激素背景的干扰,采用种子作为试验材料。西洋参种子取自吉林省华富参业有限公司。试验样品种子去皮、洗净后,用质量浓度为0.1%的升汞溶液消毒,取出种胚接种到培养基上,诱导愈伤组织。胡萝卜种子购自吉林农业大学蔬菜种子商店。播种幼苗长至7~8 cm高时取出洗净,用质量浓度为0.1%的升汞溶液消毒,取幼苗下胚轴,接种到固体培养基上,诱导愈伤组织。

1.3 培养基与培养条件

愈伤组织诱导、生长阶段和继代培养阶段均采用MS基本培养基,培养物在(24±1)℃、700勒克斯(自然散射光)下进行培养。在不同阶段附加不同质量浓度的2,4-D、IAA和ZT。

愈伤组织诱导、生长阶段附加的激素及配比见表1。每次处理设10个重复试验。继代培养阶段附加的Pub、ProA、ProC激素及配比见表2。

表1　植物激素组合处理试验设计

Table 1　Test design of phytohormone combination process

试验号	$x_1(u)$	$x_2(v)$	$x_3(w)$	u/(mg·L^{-1})	v/(mg·L^{-1})	w/(mg·L^{-1})
1	1	1	1	3.40	1.37	0.45
2	1	1	-1	3.40	1.37	0.15
3	1	-1	1	3.40	0.63	0.45
4	1	-1	-1	3.40	0.63	0.15
5	-1	1	1	0.60	1.37	0.45
6	-1	1	-1	0.60	1.37	0.15
7	-1	-1	1	0.60	0.63	0.45
8	-1	-1	-1	0.60	0.63	0.15
9	γ	0	0	3.90	1.00	0.30
10	$-\gamma$	0	0	0.10	1.00	0.30
11	0	γ	0	2.00	1.50	0.30
12	0	$-\gamma$	0	2.00	0.50	0.30
13	0	0	γ	2.00	1.00	0.50
14	0	0	$-\gamma$	2.00	1.00	0.10
15	0	0	0	2.00	1.00	0.30
16	0	0	0	2.00	1.00	0.30
17	0	0	0	2.00	1.00	0.30

注:u=2,4-D,v=IAA,w=ZT,以下同。

表2　培养基激素质量浓度处理组合表

Table 2　Combination of medium hormone concentration

类别	培养基编号	u/(mg·L^{-1})·	v/(mg·L^{-1})	w/(mg·L^{-1})
Pub	Pub_1	2.01	0.94	0.33
	Pub_2	1.80	0.96	0.38
	Pub_3	1.70	0.98	0.44
	Pub_4	1.67	0.98	0.47
ProA	$ProA_1$	1.14	1.37	0.47
	$ProA_2$	0.89	1.48	0.49
	$ProA_3$	1.43	1.17	0.45
	$ProA_4$	1.73	1.39	0.42
ProC	$ProC_1$	3.30	0.55	0.29
	$ProC_2$	3.89	1.20	0.23
	$ProC_3$	3.89	1.17	0.26

1.4 测试指标

测试指标包括最早出现愈伤组织的时间、外植体愈伤率、愈伤指数和愈伤组织生长率。

维普资讯 http://www.cqvip.com

根据外植体愈伤化程度,将愈伤指数分成5级。外植体无愈伤化设为0级,愈伤化在0~25%内为1级,在26%~50%内为2级,在51%~75%内为3级,76%~100%内为4级。

$$\text{愈伤组织生长率} = \frac{\text{收获量} - \text{接种量}}{\text{接种量}} \times \frac{1}{\text{培养时间}}$$

2 试验结果与分析

2.1 西洋参愈伤组织的诱导

西洋参种胚在固体培养基上培养30 d时,调查愈伤数、诱导率、平均愈伤指数。西洋参组织培养物生长较慢,生长9~10周时外植体脱分化才基本完成。生长68 d时测定的生长率结果见表3。

表3 激素的不同组合对西洋参愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of hormone concentration combinations on induction of American Ginseng callus

编号	接种数	愈伤数(30 d)	诱导率(30 d)	平均愈伤指数(30 d)	生长率(68 d)
1	24	20	0.83	3.10	0.717
2	24	18	0.75	3.33	0.023
3	22	20	0.90	3.38	1.138
4	25	24	0.96	3.00	0.440
5	24	22	0.91	2.88	1.486
6	25	20	0.80	2.12	0.523
7	25	25	1.00	2.13	1.019
8	22	20	0.90	2.00	0.976
9	25	5	0.20	1.00	0.186
10	25	25	1.00	2.30	1.434
11	25	25	1.00	3.50	0.364
12	23	19	0.83	4.00	0.398
13	25	25	1.00	3.56	2.239
14	25	21	0.84	3.40	1.056
15	24	20	0.83	4.00	1.638
16	25	25	1.00	3.75	1.623
17	24	24	1.00	3.85	1.640

注:接种数中不计算死亡的外植体数,以下同。

从表3可知,除试验组9外,各处理组合的愈伤组织诱导率均较高,达到75%~100%。编号11~17的试验组外植体脱分化较快,平均愈伤指数达到3.5~4,外植体表面大部分被愈伤组织覆盖。

此外,诱导率高的试验组的平均愈伤指数和生长率不一定高,如试验组7、8和10等。这说明激素的组合处理虽可诱导愈伤组织发生,但不一定有利于愈伤组织(特别是非胚性愈伤组织)的增殖。在培养终止时,分别测得7、8试验组的体细胞胚发生率为33.3%和45.4%,并可观察到球形胚、心形胚、鱼雷形胚和筒状子叶形胚。

2.2 胡萝卜愈伤组织的诱导

在胡萝卜幼苗下胚轴培养30 d时调查诱导率和平均愈伤指数。在培养55 d时测定其生长率,结果见表4。

表4 激素的不同组合处理对胡萝卜外植体愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effect of hormone concentration combinations on induction of carrot callus

编号	接种数	愈伤数(30 d)	诱导率(30 d)	平均愈伤指数(30 d)	生长率(55 d)
1	25	18	0.72	2.88	0.148
2	24	24	1.00	1.00	0.030
3	25	19	0.76	3.50	2.358
4	25	15	0.60	3.80	0.435
5	22	21	0.95	4.00	0.205
6	21	17	0.81	4.00	0.635
7	23	19	0.83	4.00	2.803
8	25	14	0.56	4.00	0.126
9	25	21	0.84	3.56	3.835
10	24	17	0.71	4.00	3.241
11	21	18	0.85	3.83	0.315
12	25	18	0.72	3.38	1.190
13	23	22	0.95	3.85	2.996
14	22	18	0.81	3.55	0.392
15	22	20	0.90	3.90	5.345
16	24	22	0.91	3.86	5.367
17	23	21	0.91	3.91	5.353

从表4中数据可知,胡萝卜外植体的诱导在各个试验组均有效。其中,试验组2、5、13、15、16、17的诱导率都在90%以上,试验组13、15、16、17的愈伤指数和培养终止时的生长率比较高,分别达到3.85~3.91和2.996~5.367。因此,胡萝卜外植体愈伤组织诱导和生长最好的试验组是13、15、16、17。试验组8诱导率最低,生长率也较低。

2.3 各种试验因素对试验指标的影响趋势

将生长率值作为试验指标进行参数回归分析,分别求得西洋参二次回归方程和胡萝卜二次

维普资讯 http://www.cqvip.com

回归方程。

西洋参生长率二次回归方程式为:

$$y = 5.454 + 0.875u + 10.897v + 2.972w - 0.396uv - 0.244uw - 0.292vw - 0.125u^2 - 5.097v^2 \quad (1)$$

胡萝卜生长率二次回归方程式为:

$$y = -22.208 + 1.385u + 33.627v + 60.467w - 0.127uv - 11.241vw - 0.315u^2 - 15.684v^2 - 74.49w^2 \quad (2)$$

式中:uv 为2,4-D与IAA的交互作用;uw 为2,4-D与ZT的交互作用;vw 为IAA与ZT的交互作用。

对式(1)的回归参数进行 F 检验,结果为:$F=477.36$,$\beta=0.005$。对式(2)的 F 检验结果为:$F=32.07$,$\beta=0.04$。

式(1)和式(2)中的 u、v 和 w 分别在0水平取值,可求得另外两种因素及其之间的交互作用对试验指标的影响,并将方程式用Matlab软件绘出影响趋势曲面图。

图1、图2、图3表示两种不同因素的交互作用对西洋参试验指标的影响方程及影响趋势。由图1可以看出:当2,4-D为1.5 mg/L、IAA为1.01~1.02 mg/L时生长率最高($y=1.6566$)。由图2可以看出,当2,4-D为1.5 mg/L、ZT为0.44 mg/L时生长率最高($y=2.0884$)。由图3可以看出当IAA为1.0 mg/L、ZT为0.4 mg/L时生长率最高($y=1.9154$)。从图1、图2和图3,当2,4-D为1.5 mg/L、IAA为1~1.02 mg/L和ZT为0.4~0.44 mg/L时,西洋参愈伤组织生长率最高。

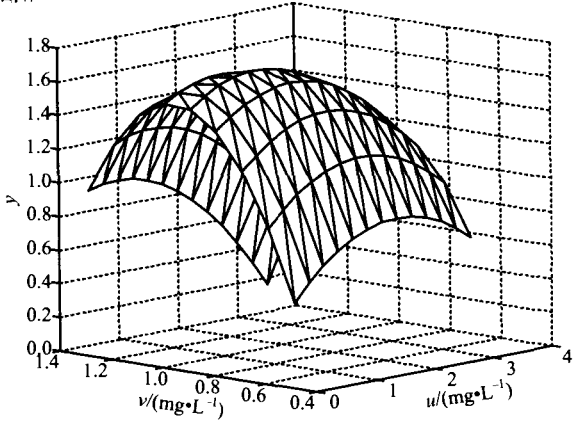

图1　u-v 对西洋参试验指标的影响

Fig.1　Effect of variables u and v on test index of America ginseng

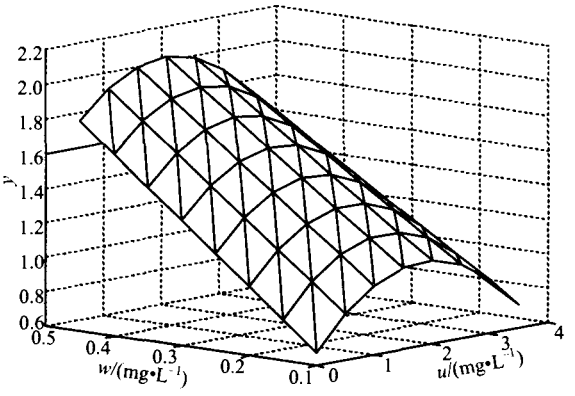

图2　u-w 对西洋参试验指标的影响

Fig.2　Effect of variables u and w on test index of America ginseng

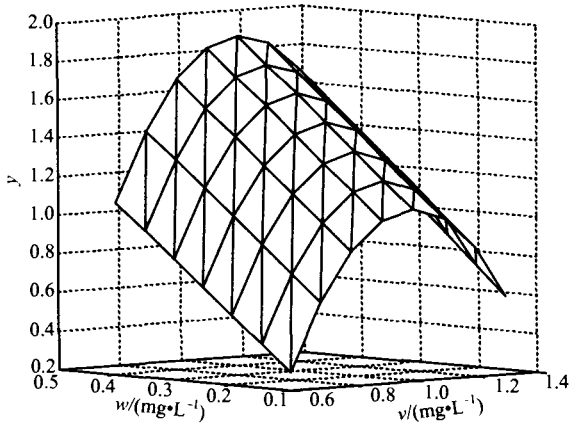

图3　v-w 对西洋参试验指标的影响

Fig.3　Effect of variables v and w on test index of America ginseng

图4、图5、图6为与两种不因素的交互作用对胡萝卜试验指标的影响方程及影响趋势。由图

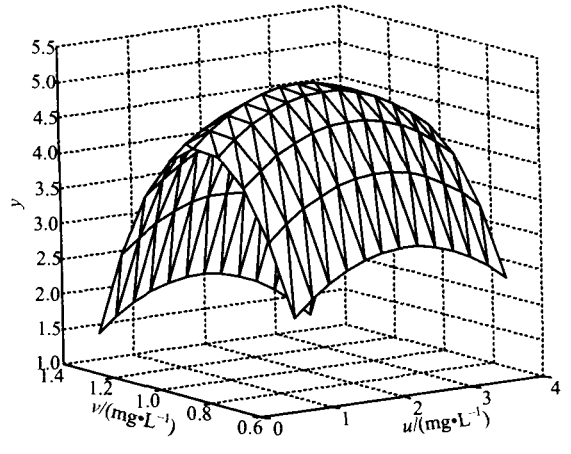

图4　u-v 对胡萝卜试验指标的影响

Fig.4　Effect of variables u and v on test index of carrot

维普资讯 http://www.cqvip.com

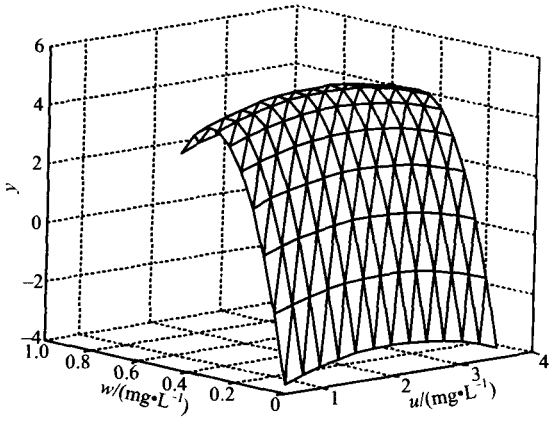

图5 u-w 对胡萝卜试验指标的影响

Fig. 5 Effect of variables u and w on test index of carrot

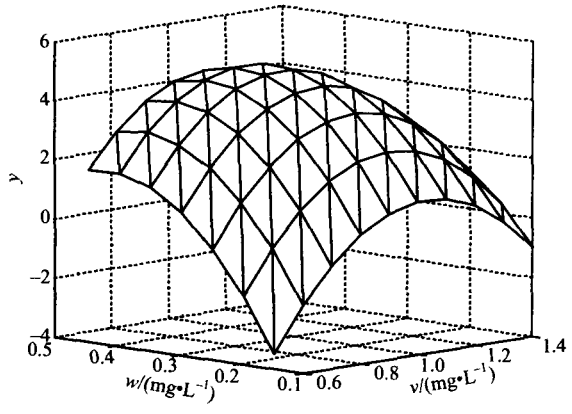

图6 v-w 对胡萝卜试验指标的影响

Fig. 6 Effect of variables v and w on test index of carrot

4可见,当2,4-D为2mg/L、IAA为0.96 mg/L时生长率最高($y=5.0843$)。由图5可见,当2,4-D为2 mg/L、ZT为0.33 mg/L时生长率最高($y=5.1776$)。由图6可见,当IAA为0.95 mg/L、ZT为0.33 mg/L时,生长率最高($y=5.1696$)。从图4、图5和图6还可知,当2,4-D为2 mg/L、ZT为0.33 mg/L和IAA为0.95~0.96 mg/L时,胡萝卜的愈伤组织生长率最高。

2.4 共同培养基质的筛选

利用式(1)和式(2)在约束条件下求满意解的方法,求出对两种植物的愈伤组织诱导与生长有良好影响的3种试验因素的取值区间。在3个区间构成的区域内选择4个试验点 Pub_1、Pub_2、Pub_3 和 Pub_4 进行试验,基本培养基为MS,每种重复处理5次。对照处理的西洋参为试验组3(MS+2,4-D 3.40 mg/L+IAA 0.63 mg/L+ZT 0.45 mg/L),对照处理的胡萝卜为试验组10(MS+2,4-D 0.1 mg/L+IAA 1.0 mg/L+ZT 0.3 mg/L),采用第二次继代培养物,生长率结果见表5。

由表5的方差分析表明,在这几种培养基上,两种植物愈伤组织的 F 值分别为1.448和1.76,均小于 $F_{0.05}=2.87$。这说明两种植物材料在各处理之间生长差异不显著,与对照差异也不显著,可以选用其中任何一个配方进行共同培养。

用此方法,也可以选出促进西洋参愈伤组织生长而相对抑制胡萝卜愈伤组织生长的培养基ProA和促进胡萝卜愈伤组织生长而相对抑制西

表5 在共同培养基上的西洋参、胡萝卜愈伤组织生长结果

Table 5 Growths of America Ginseng and carrot callus on the co-culture medium

材料	培养基	接种(g·F·W/瓶)	收获量(g·F·W/瓶)	生长率(47 d)(g·F·W/g·F·W·d)	
西洋参	Pub_1	0.373	3.81	0.196	$F=1.448$ $F<F_{0.05}=2.87$
	Pub_2	0.345	4.17	0.236	
	Pub_3	0.292	3.34	0.222	
	Pub_4	0.376	5.17	0.271	
	对照③J②	0.250	3.28	0.258	
胡萝卜	Pub_1	0.571	2.42	0.069	$F=1.76$ $F<F_{0.05}=2.87$
	Pub_2	0.565	4.02	0.130	
	Pub_3	0.569	4.50	0.147	
	Pub_4	0.529	3.94	0.137	
	对照⑩J②	0.478	3.74	0.145	

注:数据为5次重复结果的平均值。对照③J②、⑩J②分别为表1中试验号3、10用第二次继代培养的愈伤组织为材料取得的实验结果。J为继代培养,②为第二次继代培养,以下同。

维普资讯 http://www.cqvip.com

洋参愈伤组织生长的培养基 ProC。在 ProA 区域选择4个试验点 $ProA_1$、$ProA_2$、$ProA_3$ 和 $ProA_4$;在 ProC 区域选择3个试验点 $ProC_1$、$ProC_2$ 和 $ProC_3$。对各试验点进行验证性试验,结果见表6和表7。

表6　在 ProA 区域试验点上西洋参、胡萝卜愈伤组织生长结果及愈伤组织生长率多重比较(SSR 法)

Table 6　Multi-comparison(SSR) on growth rate and growth result of America ginseng and carrot callus at alternative tests of medium ProA

材　料	培养基	接种量 (g·F·W/瓶)	收获量 (g·F·W/瓶)	生长率(47 d) (g·F·W/g·F·W·d)		显著性 0.05	显著性 0.01
西洋参	$ProA_1$	0.202	3.780	0.2530	$F=0.687$ $F<F_{0.05}=3.06$	a	A
	$ProA_2$	0.231	4.020	0.2343		a	A
	$ProA_3$	0.298	4.450	0.1990		a	A
	$ProA_4$	0.213	3.180	0.1989		a	A
	对照(③J②)	0.141	2.370	0.2258			A
胡萝卜	$ProA_1$	0.785	3.140	0.0428	$F=161.77$ $F>F_{0.01}=4.89$	c	C
	$ProA_2$	0.809	3.730	0.0516		c	C
	$ProA_3$	0.579	4.710	0.1019		b	B
	$ProA_4$	0.481	3.810	0.0988		b	B
	对照(⑩J②)	0.506	5.880	0.1517		a	A

注:数据为4次重复结果的平均值。

表7　在 ProC 区域试验点上西洋参、胡萝卜愈伤组织生长结果及愈伤组织生长率多重比较(SSR 法)

Table 7　Multi-comparison(SSR) on the growth rate of America ginseng and carrot callus at alternative tests of medium ProC

材　料	培养基	接种量 (g·F·W/瓶)	收获量 (g·F·W/瓶)	生长率(47 d) (g·F·W/g·F·W·d)		显著性 0.05	显著性 0.01
西洋参	$ProC_1$	0.745	5.304	0.0901	$F=455.90$ $F>F_{0.01}=5.95$	c	C
	$ProC_2$	0.703	6.726	0.1259		b	B
	$ProC_3$	0.794	7.435	0.1233		b	B
	对照③J②	0.541	8.929	0.2280		a	A
胡萝卜	$ProC_1$	0.855	8.244	0.1271	$F=86.33$ $F>F_{0.01}=5.95$	b	A
	$ProC_2$	0.897	6.099	0.0853		d	C
	$ProC_3$	0.819	6.394	0.1001		c	B
	对照⑩J②	0.629	6.506	0.1374		a	A

注:数据为4次重复结果的平均值。

从表6的结果可知,西洋参愈伤组织在 ProA 及对照培养基上的生长率无显著差异。4个试验点均满足要求,可选用任意一个处理。胡萝卜愈伤组织在 ProA 及对照培养基上的生长率,各处理间差异很显著。通过 SSR 法可知,处理与对照间的差异达到显著性水平。所以,试验的4个处理均符合要求,其中 $ProA_1$ 和 $ProA_2$ 对胡萝卜愈伤组织的抑制作用最明显。

表7的结果表明,在 ProC 培养基上除胡萝卜0.01置信水平外,两种材料的对照与处理间差异达到显著水平。在 ProC 的3种处理中,$ProC_1$ 对西洋参愈伤组织的抑制作用最明显。

3　结束语

利用二次回归正交组合设计试验方法对植物愈伤组织培养中2,4-D、IAA 和 ZT 的交互作用进行了研究。利用统计分析方法对试验结果进行了回归系数的计算和统计检验。在 MS+2,4-D 2.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L+ZT 0.5 mg/L(或0.3 mg/

维普资讯 http://www.cqvip.com

L)的培养基上,西洋参愈伤组织的诱导率和生长率均高;在 MS+2,4-D 3.4 mg/L+IAA 1.37 mg/L+ZT 0.15 mg/L 和 MS+2,4-D 2.0 mg/L+IAA1.0 mg/L+ZT 0.5 mg/L 的培养基上,胡萝卜愈伤组织的诱导率和生长率均很高。MS+2,4-D 1.14 mg/L+IAA 1.37 mg/L+ZT 0.47 mg/L 的培养基(记为 $ProA_1$),有利于西洋参愈伤组织生长,不利于胡萝卜愈伤组织生长;MS+2,4-D 3.30 mg/L+IAA 0.55 mg/L+ZT 0.29 mg/L 培养基(记为 $ProC_1$),有利于胡萝卜愈伤组织生长,不利于西洋参愈伤组织生长。MS+2,4-D1.67 mg/L+IAA 0.98 mg/L+ZT 0.47 mg/L 培养基(记为 Pub_4)可满足两种植物愈伤组织的生长要求。二次回归正交组合设计能够增强试验的可靠性、选择性,减少试验工作量。采用传统设计,3 因子 5 水平需要做 $5^3=125$ 次试验,而组合设计最少只做 15 次试验。通过有效控制试验过程干扰,可以提高试验精度,获得完整的有代表性的试验数据。

参考文献:

[1] 郭晓才,吴伯骥,蒋辉,等.离体细胞共培养中科间细胞共质体的形成[J].植物学报,1995,37(5):339-345.
Guo Xiao-cai, Wu Bo-ji, Jiang Hui, et al. Formation of interfamilial cell symplast during cell co-Culture in vitro [J]. Acta Botanica Sinica, 1995, 37(5):339-345.

[2] 郭晓才,郑国锠,吴伯骥.GUS 基因转入烟草细胞通过科间细胞共培养在胡萝卜再生植株中的表达[J].山西农业科学,1995,23(4):3-9.
Guo Xiao-cai, Zheng Guo-chang, Wu Bo-ji. GUS gene can be transferred from transgenic tobacco callus cell into carrot callus cell via interfamilial plant cell co-culture and expressed in the carrot regeneration plants[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 1995, 23(4): 3-9.

[3] Waara S, Glimelius K. The potential of somatic hybridization in crop breeding[J]. Eophytica, 1995, 85:217-223.

[4] Skarzhinskaya M, Landgren M, Glimelius K. Production of intertribal somatic hybrids between Brassica napus and *Lesquerella fendleri* (*Gray*) *Wats* [J]. Theor Appl Genet, 1996, 93:1242-1250.

[5] Kisaka H, Kisaka M, Kanno A. Production and analysis of plants that are somatic hybrids of barley (*Hordeum vulgare L*) and carrot (*Daucus carota L*) [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94:221-226.

[6] Zhu Yan-ming, Hoshino Yoichiro, Nakano Masaru. Highly efficient system of plant regeneration from protoplasts of grapevine (*Vitis vinifera L*) through somatic embryogenesis by using embryogenic calls [J]. Plant Science, 1997, 123(1):151-157.

[7] Evans D A. Plant tissue culture: methods and applications in agriculture[M]. New York : Academic Press, 1981.

[8] 韩秀慧,尹伟伦,王华芳.二次回归正交设计在微型月季组织培养中的应用[J].林业科学,2004,40(4):189-192.
Han Xiu-hui, Yin Wei-lun, Wang Hua-fang. Application of quadratic regressive factorial experiment to in vitro culture of miniature rose[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2004, 40(4):189-192.

[9] 赵露.西洋参、胡萝卜体细胞杂交基础条件的研究[D].长春:吉林农业大学中药材学院,1997.
Zhao Lu. Study of base condition of somatic hybridization between Panax quinquefolium linne and *Daucus carota*[D]. Changchun: College of Traditional Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, 1997.