

药用植物在生物技术领域中的应用

孙科¹ 杨培² 闫微²

(¹江苏省徐州生物工程高等职业学校,江苏徐州 221006; ²江苏省苏科农化有限责任公司)

摘要 生物技术运用为药用植物的研究和中药现代化发展提供了重要机遇。综述近年来生物技术在药用植物研究中的应用进展,包括组织培养技术在药用植物中的应用,植物组织、细胞培养生产次生代谢产物的研究概况,基因工程和分子生物学在药用植物天然产物中的应用。

关键词 药用植物;组织培养技术;基因工程;基因芯片

中国现有药用植物资源383科2309属1146种,占中药资源种类的87%^[1]。目前,在消费者用药选择中,植物药已成为一种新的潮流,植物药发展快于化学药品,越来越多的人喜欢利用天然药物来治疗或预防疾病。如何充分利用中药材资源优势,如何借鉴欧美先进国家经验,走中药现代化、国际化的道路,是我国中药材行业亟待研究解决的问题。

现代生物技术是以基因工程、细胞工程、发酵工业、酶工程、生化工程以及后来衍生出来的第二代、第三代的蛋白质工程、抗体工程和糖链工程等为主体的高新技术,它被看作是21世纪科学技术的核心。纵观这一领域,生物技术的产业化首先是从医药领域开始的,现代生物技术的发展使医药产业发生了革命性的变化^[2]。近10多年来,从天然产物中寻找新的生理活性成分或先导化合物以开发新药已成为全球关注和研究的热点。

1 组织培养技术在药用植物上的应用

1.1 药用植物的快繁

由于野生药材资源日益枯竭,人工栽培品种品质不稳定,生物技术的兴起对传统药材的生产展示了广泛的应用前景。组织培养是现代最先进的植物繁殖技术,通过利用植物细胞再生能力,培育出完整植株。利用植物组织培养技术进行药用植株无性繁殖,解决药用植物天然资源不足的棘手问题,具有成本低、高效率、生产周期短、无性遗传特性一致的优点。通过植物组织或器官的离体培养和形态发生,可实现种苗的大量快速繁殖(见表1),这对于因病毒病害严重影响产量和质量的药用植物、靠有性繁殖提供种子而种子发育不完善或种子成本高的药用植物、靠无性繁殖提供“种子”而无性繁殖系数低且种子需求量大的药用植物、濒危或濒危药用植物的引种驯化及保护植物资源等都具有重要的科研和生产意义。

1.2 胚的离体培养

胚培养可以克服有性杂交中的胚乳败育、早期胚败育和珠心胚干扰等,获得杂种苗,此项技术已进入实用阶段,西洋参、红花、枳壳、长春花、鼓槌石斛、银杏等植物的胚培养已获成功。苏新(1995)^[3]研究了浙贝母种胚,经MS+2,4-D 1.0mg/L+6-BA 0.5mg/L+水解酪蛋白300mg/L和MS+

表1 快繁技术已获得成功的部分药用植物

植物名	拉丁名	文献
白芨	<i>Bletilla striata</i> (Thunb.)Reichb. f.	[3]
白首乌	<i>Cynanchum auriculatum</i> Royle ex wight	[4]
半夏	<i>Pinellia ternat</i> (Thunb.)Breit.	[5]
大蒜	<i>A Uium sativum</i> L.	[6]
丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	[7]
灯盏花	<i>Erigeron breviscapus</i> (Vant.)Hand.	[8]
东北红豆杉	<i>Taxus cuspidata</i> sieb.et Zucc	[9]
宁夏枸杞	<i>L.barbarum</i> L.	[10]
黄芩	<i>ScuteUaria baicalensis</i> ceorgi	[11]
丽江山慈姑	<i>Iphigenia indica</i> Kunth et Benth.	[12]
人参	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.	[13]
三七	<i>Panax notoginseng</i> (Burk.)F.H.Chen	[14]
铁皮石斛	<i>Dendrobium officinale</i> Kimura et Migo	[15]
金钗石斛	<i>Dendrobium nobile</i> Lindl.	[16]
西洋参	<i>Panax quinquefolium</i> L.	[17]

IBA 0.5mg/L+6-BA 1.0mg/L等培养基分化和脱分化后,形成小鳞茎和正常植株。李志良^[9]对中国红豆杉和短叶红豆杉的离体胚培养特性进行了研究,发现适宜的条件下2种胚萌发率与成苗情况没有明显的差异,离体胚培养是实现大规模种植的一条快捷途径。

1.3 单倍体和多倍体育种

通过花粉或花药培养获得单倍体植株,然后利用单倍体植株经过染色体加倍来选择和培养新品种,这就是不同于常规杂交育种的花培育种。单倍体植株虽然高度不育,通常矮小,生长衰弱,本身无大的价值,但是通过加倍后可获得纯合二倍体,在育种上有独特的用途。多倍体植株通常具有形态特征的巨型性、抗逆性强及药用活性成分含量高特性,这是中药材的优质、高产育种所期望达到的目的。因此,药用植物的多倍体育种具有较高的应用价值和增产潜力。而利用组织培养技术诱导多倍体是近几年发展起来的一种诱导多倍体的方法,具有广阔的应用前景。在组织培养过程中,用秋水仙碱等诱变剂处理培养的愈伤组织胚状体或丛生芽,获得多倍体植株,是诱发产生多倍体的较好方法。目前人工加倍的药用植物已有几十种,如黄芪、杜仲、福寿考、牛膝、丹参、菘蓝、党参、枸杞、百合、当归、三叉蝶豆、莨菪、胜红蓟、具苞罂粟、茺蒿、鹰嘴豆和飞燕草等^[23]。

1.4 药用植物离体种质保存

用生物技术进行药用植物种质保存有2种方法:一种是以抑制细胞生长来保存种质,另一种是超低温的种质保存。用抑制细胞生长的方式来保存,其主要手段是控制培养基的成分及培养温度。在培养基中加入脱落酸等生

作者简介 孙科(1977-),男,江苏睢宁人,主要从事生物技术研究。

收稿日期 2007-07-30

长减速剂,或提高细胞激动素、赤霉素的浓度,减缓培养物的生长速度,使继代周期延长,继代次数减少,以保存种质。降低培养温度,使培养物的分化代谢活动减弱,加长继代周期,也是种质保存的可行办法。例如,杜仲的花粉在液氮(-196℃)中保存良好,并实现了花粉粒的萌发^[1]。药用植物种质的超低温保存研究,在我国近10年才开始,目前已有铁皮石斛、新疆紫草、浙贝母超低温保存研究的报道,取得一些初步的成果。

2 生物技术在药用植物次生代谢产物方面的应用

2.1 植物组织、细胞培养生产次生代谢产物

从远古时代起,人类已经利用植物的次生代谢产物,用的就是植物的粗提取物。但直接从植物体内提取次生代谢产物含量太低,例如,用东北红豆杉生产紫杉醇,全世界每年需250kg紫杉醇,需要2500t干树皮,相当于75万株树龄60a以上的红豆杉树皮的总量,而红豆杉属植物生长十分缓慢,仅靠自然资源远远不能满足需要。但利用组织培养技术进行次生代谢物的生产,产量明显增加,如紫草根中的紫草宁含量为干重的1%~5%,而培养细胞积累的紫草宁在14%左右,人参培养细胞产生的皂甙可达11.2%,已经进入用发酵罐生产的工厂化生产阶段。而现在主要采用两步培养技术、固定化细胞培养技术和两相培养技术来提高药用植物次生代谢产物的产量。如丹参悬浮培养采取两步培养法时,在整个培养期间,可以连续产生隐丹参酮和铁锈醇^[2]。在硬紫草固定化培养过程中,培养30d的紫草色素产量达到4.2mg/g鲜重,相对色素分泌量达到70%^[3]。

2.2 发状根培养生产次生代谢产物

由于发根农杆菌及其Ri质粒转化产生的发状根比较容易再生出新植株,而且很多植物的发状根在离体培养条件下都表现出原植株次生代谢产物的合成能力,因此发状根培养又被称为转基因器官培养,是一条利用生物技术生产次生代谢产物的新的有效途径,很适用于有价值的次生代谢产物的生产。目前,我国研究学者已经对大量的药用植物进行发状根培养的研究,例如刘俊等^[4]用A4,R1601菌株对盾叶薯蓣的根在1/2M液体培养基和28℃弱光条件下培养,建立发状根快速繁殖技术,转基因获得的发状根其薯蓣皂甙元的含量分别是微块茎、愈伤组织和植物体合成量的5.68倍、6.12倍和2.68倍。孙敏等^[5]用A4和R100对长春花叶片在MS培养基黑暗的条件下培养,结果发状根中的总生物碱高于长春花的原植株和愈伤组织。目前世界上许多国家如美国、英国、日本、韩国及中国等都都对中药植物和农用植物进行了大量深入的发根培养的基础理论研究。实验证明,转化的发状根大部分都能检测到与原植株含量相当或高于原植株含量的次生代谢产物,有些发状根中的药物成分甚至大大高于原植株的含量。

2.3 植物细胞生物反应器在药用植物次生代谢物生产中的应用

药用植物细胞生物反应器技术以药用植物细胞或组织的大规模培养为基础,它根据“植物培养细胞次级代谢全能

性”的理论,将药用植物细胞培养技术引入有用化学物质生产,把细胞作为一个“活的工厂”^[6],通过对细胞进行固体或液体悬浮培养,大量生产次生代谢产物。我国药用植物细胞培养的大规模研究是在20世纪70年代中期以后,大量培养直接生产药用物质的研究工作取得了很大的成绩。一些重要的药用植物如人参、西洋参、黄连、长春花等植物细胞培养都十分成功,经过筛选,产生出相对几倍或几十倍于该植物完整植株所产生的代谢产物。据统计,有40余种化合物在细胞培养中的含量超过了原植物。目前,已建立适于不同植物组织培养及大量生产的新型生物反应器并进行优化控制。Ushiyama等^[7]在2000L搅拌式生物反应器上进行了人参根组织培养生产人参细胞,随后又在20000L生物反应器上成功地进行了每月100kg的人参愈伤组织的培养。采用20L气升式生物反应器培养西藏红豆杉,反应器中紫杉醇总量(细胞内+细胞外)最高达20.84mg/L(第二十三天),约为摇床培养(10.37mg/L,第二十八天)的2倍。

3 基因工程在药用植物中的应用

3.1 转基因药用植物

植物转基因的方法主要有农杆菌介导的基因转移、种质系统的基因转移和外源基因直接导入法等。国内学者主要采用农杆菌介导的基因转移法。人工改造过的农杆菌Ti质粒或Ri质粒是一种很好的植物基因工程载体,同时Ri质粒和Ti质粒还可以配合使用,建立二元载体系统,有利于质粒在植物基因工程中的应用。Hamada等^[8]用根癌农杆菌B0542和C58感染成年短叶红豆杉和欧洲红豆杉幼茎切断,诱导出可在不含植物激素培养基上快速生长的冠瘿瘤。经质谱和酶联免疫证明,瘤状组织中含有紫杉醇及其类似物,紫杉醇含量为干重的0.00008%~0.0004%。王慧中等^[9]已成功地将外源卡那霉素抗性基因通过根癌农杆菌介导的基因转移技术导入了宁夏枸杞的幼茎外植体,所获得的再生植株经胭脂碱检测、NPT-II活性测定及Southern分子杂交,证明外源基因NPT-II及胭脂碱合成酶基因,已整合到枸杞细胞的核基因组上,并能在植株水平上表达出相应的性状。到目前为止,转基因已获成功的药用植物(毛状根和畸形芽除外)有烟草、羽扁豆、辣根、颠茄、菊苣、茴香、埃及茛苳、龙葵、骆驼蓬、毛地黄、天仙子、长春花、菘蓝及甘草等。

3.2 基因芯片技术在药用植物研究中的应用

基因芯片技术DNA芯片,又称微阵列(microarrays),属于生物芯片(biochips)的一种。DNA芯片技术的分子识别与Southern和Northern杂交一样,都是利用碱基配对和序列互补的原理。芯片和芯阵是将大约1cm²的玻片分割成6400个小方格,在此片上制备千百万个寡核苷酸探针,按顺序阵列并以荧光标记,以光电化学和激光扫描相结合的方法,对数以百万记的数据进行处理,用来检测靶序列、量变和相应表达水平及靶序列和参考序列的差异等。可以说,DNA芯片是分子生物学、微加工技术、光学、检测技术和计算机技术等多学科相互结合的产物。一次DNA芯片实验,

可对上千种基因的表达、突变和多态性进行快速、准确的检测。

3.2.1 中药的鉴定。中药材通常经过处理而成为干药材,一般凭性状辨别不同的类别,有时连专家也感到困难。尤其是要鉴别外观类似但药性及价值均差别很大的草本药材,更为棘手。利用这一技术的前提是应用分子生物学技术找出待鉴定中药的特定寡核苷酸序列,并将其集成在芯片上。然后提取样本 DNA 进行扩增,荧光标记后与芯片杂交。若样本中存在与之互补的序列即可检测出来。李绍平等^[9]对川贝母、浙贝母、皖贝母和湖北贝母 4 种主要贝母品种进行 5SrRNA 的序列分析时发现,川贝母有一特异性的碱基序列 CTITFGTCGCATCA,以此序列为探针制成芯片,将待测样品提取 DNA 并经扩增和荧光标记后与芯片上的探针进行杂交,然后通过荧光检测即可准确鉴定出川贝母。

3.2.2 检测转基因药用植物。一般在转基因植物中装入了基因表达所需要的启动子、终止子序列。为方便筛选,还整合了报告基因和抗性基因等标志序列。针对这些特点,即使对转入的目的基因并不了解,通过检测这些标志基因序列便可对转基因植物进行鉴定。黄迎春等人选用常用的 2 种报告基因、2 种抗性基因、2 种启动子序列和 2 种终止子序列为探针制成基因芯片,对 4 种转基因植物水稻、木瓜、大豆、玉米进行了检测。Bordoni 等用微阵列技术结合 LDR (ligation detection reaction)对转基因玉米进行了检测。

4 DNA 指纹图谱技术

中药指纹图谱就是利用现代信息采集技术和质量分析手段得到的能够显现中药材或中成药性质的图像、图形、光谱的图谱及其数据。由于系统分析药用植物的化学成分,阐明有效部位和活性成分的种类是可行的,建立全面反映所含活性成分的指纹图谱,将更加有效地体现药用植物活性成分的整体性和综合作用,从而更好地评价药用植物的质量。药用植物提取物包含了药用植物的主要化学成分,因此建立药用植物提取物的指纹图谱将为药用植物鉴定和其质量控制提供依据。这些技术包括 RAPD^[10]、AFLP^[11]、PCR-RFLP、DNA 探针杂交^[12]、小卫星 (minisatellite)^[13]、微卫星指纹分析^[14]等。DNA 指纹技术的建立是植物资源学研究方法的重大突破,为药用植物种质资源的分类与鉴定开辟了一条新途径。姬可平等(2002)对大黄种子中提取的 DNA 中 rRNA 基因内转录间隔区进行 PCR 扩增,并对 PCR 扩增产物进行碱基序列测定,rRNA 基因内转录间隔区的碱基序列可作为分子水平鉴定植物中药材的又一有效途径。例如用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术对石斛属内 26 个种和金石斛属的 1 个种进行了基因组 DNA 多态性分析,设计成的特异性引物能方便快捷地鉴别出铁皮石斛^[15]。

5 DNA 分子标记在药用植物种质资源研究中的应用

DNA 分子标记 (DNA molecular markers) 是以基本遗传物质脱氧核糖核酸 (DNA) 的分子差异为基础的一种标记。“药用植物的种质资源”泛指一切可用于药物开发的植物遗传资源,是所有药用植物物种的总和。DNA 分子标记技术

已被广泛应用于药用植物的遗传多样性研究、品种鉴别、良种选育、基因定位及资源分类等方面。

5.1 种质资源鉴定与道地性研究

目前研究较多的主要是药用植物特别是中药材的真伪鉴别或道地性的研究。通过应用 RAPD、RFLP、AFLP 标记等分子标记技术,为中药种质鉴定开辟了一条新路。此外,通过对名优道地药材 DNA 分子的鉴定,还能找到划分中药材种质档次的分子标记。日本的 Nakai 等^[16]用 RAPD 和 PCR-RFLP 方法对淫羊藿属 8 种植物进行了 DNA 分析,结果发现 RAPD 指纹较易区别中国特有种箭叶淫羊藿和日本其他 7 种淫羊藿,表明日本 7 种淫羊藿属内变异较大,与形态学结果不符。

5.2 亲缘关系及分类研究

随着中药资源及分类鉴定研究的不断深入,新种不断被发现,新种的确立常有异议,同一物种分类地位经常变动,给正本清源及一系列的研究带来困难。通过 DNA 水平的分析研究确定药用植物间的亲缘关系,使植物分类和资源的研究更加科学化。孟丽等^[17]利用 RAPD 技术对芍药属牡丹组的 11 个野生牡丹类群和 12 个栽培牡丹品种间的亲缘关系进行了研究。

5.3 遗传图谱构建

遗传图谱是植物基因的档案,对育种工作有极大的参考价值。从种质资源利用的角度讲,一个高密度的遗传图谱能有效地用于控制重要经济(或农艺)性状基因的定位,大大加快育种进程。分子标记的迅速发展是遗传图谱构建的基础,在 2000 年前已完成了几乎所有重要作物 RFLP 遗传连锁图。目前只有一些研究深入的药用植物或具有其他研究价值的药用植物,如红豆杉、甘草、银杏遗传图谱已经建成或正在构建之中^[18]。

5.4 遗传多样性研究

用于药用植物遗传多样性分析的 DNA 分子标记主要为 RAPD。近两年来,随着各种分子标记的发展和成熟,AFLP、ISSR 也逐渐被应用于药用植物遗传多样性分析。崔光红等^[19]应用 RAPD 对荒漠肉苁蓉 2 个野生居群和管花肉苁蓉 4 个野生居群进行遗传多样性分析。得出荒漠肉苁蓉和管花肉苁蓉在居群间均有一定的分化,荒漠肉苁蓉的遗传多样性明显高于管花肉苁蓉,并已明显分化成 2 个生态型。

6 参考文献

- [1] 丁建,夏燕莉.中国药用植物资源现状[J].资源开发与市场,2005,21(5):453-454.
- [2] 张金国,刘翔.我国生物技术药物研究现状和展望[J].安阳工学院学报,2006(2):22-25.
- [3] 彭丽丽,刘祥东,刘华,等.白芨的组培快繁(简报)[J].中国野生植物资源,2004,23(5):65.
- [4] 陈秀惠,符文英.白首乌离体快速繁殖的研究[J].海南大学学报(自然科学版),1995,13(2):134-137.
- [5] 朱鹏飞,毛文岳,王殿久,等.三叶半夏组织培养获得再生植株[J].植物生理学通讯,1985(3):28.
- [6] 石河子农学院蔬菜组.大蒜组织培养研究初报[J].新疆农业科技,(下转第 119 页)

试验结果表明,不同水温处理对提高不育系异交结实率较为显著(见表1),并且能明显降低包颈率。在每穗的穗长和总粒数变化不大的情况下,每穗实粒数增加8.1~16.5粒,每穗包颈粒降低4.1~13.7粒,异交结实率提高至7%~13.4%。

3 结论与讨论

在秋季杂交稻制种喷施九二〇期间,遇到气候条件的变化,尤其是受到低温的影响,适当加大九二〇用量的同时,提高喷施九二〇的水温,有助于减轻不育系包颈,提高

穗粒外露率,还能够拉长上部节位,提高植株高度,有利于抽穗扬花授粉,增加每穗实粒数8.1~16.5粒,提高7%~13.4%异交结实率。

4 参考文献

- [1] 肖国樱,袁隆平.模拟盛夏低气温条件下水温对水稻温敏不育系育性的影响[J].中国水稻科学,1997,11(4):241-244.
- [2] 肖国樱,邓晓湘,唐俐,等.不同水温处理对水稻光温敏核不育系培矮64S繁殖效果的影响[J].杂交水稻,2001(3):28-29.
- [3] 侯杰夫.田间水层深度对制种田不育系开花习性的影响[J].杂交水稻,2001(5):20-21.
- [4] 周青,陈风华,张国良,等.施氮时期对弱筋小麦产量和品质的调节效应[J].麦类作物学报,2005,25(3):67-70.
- [5] 冯伟,郭天财,李晓,等.氮肥运筹对两种穗型小麦品种品质及产量性状的效应[J].麦类作物学报,2005,25(2):57-60.
- [6] 赵广才.提高小麦品质的氮肥运筹技术[J].作物杂志,2004(2):44-46.
- [7] 杨延兵,高荣歧.氮素与品种对小麦产量和品质性状的效应[J].麦类作物学报,2005,25(6):78-81.
- [8] 赵广才,何中虎,刘利华,等.肥水调控对强筋小麦中优9507品质与产量协同提高的研究[J].中国农业科学,2004,37(3):351-356.
- [9] 赵广才,张艳,刘利华,等.施肥和密度对小麦产量及加工品质和影响[J].麦类作物学报,2005,25(5):56-59.
- [10] 张军,戴其根,张洪程,等.追氮时期对中筋小麦群体质量及品质的调节效应[J].江苏农业科学,2003(5):56-59.
- [11] 曹宏鑫,赵锁芳,王世敬,等.基肥结合喷氮对冬小麦产量和品质及植株氮素状况的影响[J].麦类作物学报,2005,25(5):44-50.
- [12] 黄绍敏,宝得俊,皇甫湘荣,等.不同栽培因子对河南潮土上小麦产量的影响[J].麦类作物学报,2005,25(5):69-74.
- [13] 樊虎玲,郝明德,李志西.黄土高原旱地长期施用化肥对小麦品质的影响[J].麦类作物学报,2005,25(5):51-55.
- [14] 李春燕,封超年,张容,等.密度、氮素对优质弱筋小麦宁麦9号旗叶早衰的调控效应[J].麦类作物学报,2005,25(5):60-64.
- [15] 王曙光,许钊,戴其根,等.氮肥运筹对太麦区弱筋小麦宁麦9号产量与品质的影响[J].麦类作物学报,2005,25(5):65-68.
- [16] 王东,于振文,贾效成.播期对优质强筋冬小麦籽粒产量和品质的影响[J].山东农业科学,2004(2):25-26.
- [17] 陈爱苹,赵玉山.影响小麦品质的因素及提高小麦品质对策[J].山西农业科学,2003,31(3):7-10.
- [18] 孙敏,曾建军.长春花毛状根培养及抗癌生物碱产生的研究[J].中国中药杂志,2005,30(10):741-743,755.
- [19] 雷光富,朱西儒,张云开,等.添加剂和激素对印楝脱分化及印楝素含量的影响[J].中国科学院研究生院学报,1998(1):21-25.
- [20] 邢建民,查丽杭,李佐虎,等.植物细胞大规模培养生物反应器研究机制概况[J].生物工程进展,1997,17(5):49-53.
- [21] HAMADA H,MIKUNI k,TAKAHASHI H,et al. Tran sformation of Taxus revifolia[J]. Japanese kokai Tokkyokoho Japan,1995:289,248.
- [22] 王慧中,黄发灿,李安生,等.枸杞转基因植株的再生[J].生物工程学报,1991,7(3):230-223.
- [23] 李绍平.生物芯片技术在中药鉴定研究中的应用展望[J].世界科学技术,2000,2(3):158.
- [24] WILLIAMS J G.KUBELIK A R LIVAK K J,et al.DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers[J]. Nud Acids Res,1990(18):6531.
- [25] PLETER VOS,RCUE HOGERS,MARJO BLEEKER,et al.AFLP:A New Technique For DNA Fingerpringting[J].Nude Acids Res,1995,23(21):407.
- [26] 刘树俊.DNA 指纹技术中所用的探针及其发展[J].遗传,1993(1):4.
- [27] KRCISOVICH S.Abundantee and Characterizationof Simple-sequence repeats (SSRs)Isolated from A Size-fractiona ed Ge-nomic Library of Brassica napu[J].TheorApplGenel,1995(91):201.
- [28] GUSTAVO CAETANO · ANOLLES.DNA Amplification Finger- printing Using Very Short Ar-bitrary Oligonucleotide Plimers[J].Bio/ Technology,1991(9):55.
- [29] 张铭,黄华荣,廖苏梅,等.石斛属 RAPD 分析及鉴定铁皮石斛的特异性引物设计[J].中国中药杂志,2002,26(7):442-448.
- [30] NAKAIR ,SHOYAMAY ,SHIRASHIS. Genetic characterization of epimedium species using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) diagnosis[J]. Biol Pharm Bull,1996(19):67-71.
- [31] 孟丽,郑国生.部分野生与栽培牡丹种质资源亲缘关系的 RAPD 研究[J].林业科学,2004,40(5):110-115.
- [32] 黄璐琦.分子生药学[M].北京:北京医科大学出版社,2000.
- [33] 崔光红,陈敏,黄璐琦,等.药用肉苁蓉的遗传多样性 RAPD 分析[J].中国中药杂志,2004,29(8):727-730.

(上接第114页)

- [19] 曹宏鑫,赵锁芳,王世敬,等.基肥结合喷氮对冬小麦产量和品质及植株氮素状况的影响[J].麦类作物学报,2005,25(5):44-50.
- [20] 黄绍敏,宝得俊,皇甫湘荣,等.不同栽培因子对河南潮土上小麦产量的影响[J].麦类作物学报,2005,25(5):69-74.
- [21] 樊虎玲,郝明德,李志西.黄土高原旱地长期施用化肥对小麦品质的影响[J].麦类作物学报,2005,25(5):51-55.
- [22] 李春燕,封超年,张容,等.密度、氮素对优质弱筋小麦宁麦9号旗叶早衰的调控效应[J].麦类作物学报,2005,25(5):60-64.
- [23] 王曙光,许钊,戴其根,等.氮肥运筹对太麦区弱筋小麦宁麦9号产量与品质的影响[J].麦类作物学报,2005,25(5):65-68.
- [24] 王东,于振文,贾效成.播期对优质强筋冬小麦籽粒产量和品质的影响[J].山东农业科学,2004(2):25-26.
- [25] 陈爱苹,赵玉山.影响小麦品质的因素及提高小麦品质对策[J].山西农业科学,2003,31(3):7-10.

(上接第117页)

- [1] 解晓红,李江辉,冯文龙,等.丹参组培快繁技术研究[J].中药材,2004,27(7):474-475.
- [2] 林春,刘鸿高,苏友波,等.灯盏花快速繁殖研究简报[J].云南农业大学学报,2003,18(3):323-326.
- [3] 浩仁塔本,赵颖.东北红豆杉的组织培养技术研究[J].内蒙古林业科技,2004(3):11-13.
- [4] 曹有龙,陈放,罗青,等.枸杞髓组织离体培养及高频率植株再生的研究[J].广西植物,1999,19(3):239-242.
- [5] 高山林,陈柏君.黄芩组织培养快速繁殖技术的优化[J].中草药,2004,35(3):312-315.
- [6] 马玉芳,许继宏.丽江山慈姑的组织培养及育种技术研究[J].中草药,2003,34(5):463-465.
- [7] 苗淑侠,杨继祥.人参组织培养成苗[J].植物生理学通讯,1987(1):30-31.
- [8] 刘瑞驹,蒙爱东,李春霞,等.三七胚状体发生和植株再生[J].植物生理学通讯,1991,27(3):210.
- [9] 陈薇,寸守铣.铁皮石斛茎段离体快繁[J].植物生理学通讯,2002,38(2):145.
- [10] 孙廷,杨玉珍,胡如善.金钗石斛的组织培养和快繁技术[J].河南科技大学学报(农学版),2004,24(3):35-41.
- [11] 阳建国.西洋参的组织培养及其应用前景[J].湖南农业科学,1999(1):31-32.
- [12] 苏新.浙贝母种胚的离体培养[J].中药材,1995,18(2):62-63.
- [13] 李志良.中国红豆杉和短叶红豆杉的胚胎培养[J].植物资源与环境学报,2001,10(1):62-63.
- [14] 宋智梁,梁运章,李玉峰,等.药用植物的多倍体育种[J].生物学通报,2006,41(7):13-14.
- [15] 陈品良,贺善安,金炜.杜仲、秤锤树花粉的超低温贮藏研究[J].植物学报,1990,32(4):188-191.
- [16] 姜广备.丹参组织和细胞培养研究概况[J].中草药,1994,25(3):156-157.
- [17] 吕华,赵群华,曹日强,等.固定化培养和产物释放促进刺对硬草细胞代谢的影响[J].植物生理学报,1995,21(1):111-116.
- [18] 刘俊,刘选明,秦玉芝,等.Ri T-DNA 对盾叶薯蓣的遗传转化及薯蓣皂甙元产生的影响[J].天然产物研究与开发,2005,17(1):59-64.