

文章编号:1001-6880(2017)8-1290-06

# 两面针的愈伤组织诱导与分化

汤丽云<sup>1</sup>,何蔚思<sup>2</sup>,何国振<sup>3\*</sup><sup>1</sup>华南农业大学生命科学学院,广州 510642;<sup>2</sup>新南威尔士大学理学院,悉尼 NSW2025,澳大利亚;<sup>3</sup>广州中医药大学中药学院,广州 510006

**摘要:**两面针具有很高的药用价值,但资源贫乏。利用组织培养技术获得种苗,为恢复两面针的资源打下基础。研究结果表明,以无根苗的茎段为外植体,MS + 4.0 mg/L KT + 2.0 mg/L NAA 培养基较适宜愈伤组织诱导,诱导率达到 74.84%。适宜的分化培养基是 MS + 6.0 mg/L KT + 0.2 mg/L IBA。经过 2 次分化诱导,芽分化率达到 36.46%,每块愈伤组织平均分化出 3.30 个芽。分化后的芽可以通过增殖培养提高芽的数量和质量。适宜的增殖培养基是 MS + 4.0 mg/L KT + 0.8 mg/L NAA,培养 8 周的芽增殖系数达到 5.00。适宜生根诱导的培养基是 1/2MS + 0.2 mg/L KT + 1.0 mg/L IBA,生根率达到 66.75%。本研究成功地从两面针愈伤组织中分化出芽和根,获得了高繁殖系数的组织培养技术。

**关键词:**两面针;组织培养;外植体;愈伤组织;分化

中图分类号:Q943.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.8.005

## Induction and Differentiation of Calli from *Zanthoxylum nitidum*

TANG Li-yun<sup>1</sup>, HE Wei-si<sup>2</sup>, HE Guo-zhen<sup>3\*</sup><sup>1</sup>College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;<sup>2</sup>Faculty Science, University of New South Wales, Sydney NSW 2052, Australia;<sup>3</sup>College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

**Abstract:** *Zanthoxylum nitidum* is a woody liana plant with high value of medicine, but its resources is shortage. To recover the resources of *Z. nitidum*, germchits should be obtained by tissue culture. The results showed that the optimal medium for callus induction from explant of sterile stem segment was MS + 4.0 mg/L KT + 2.0 mg/L NAA with induction rate of 74.84%. The optimal medium for bud differentiation was MS + 6.0 mg/L KT + 0.2 mg/L IBA. The bud differentiation rate was 36.46% after two times of differentiation culture, and 3.30 buds were regenerated from a piece of callus. The quantity and quality of regenerated bud could be improved and increased by proliferation culture. The optimal medium for bud proliferation was MS + 4.0 mg/L KT + 0.8 mg/L NAA, the rate of bud proliferation reached 5.00 after 8 weeks culture. The optimal medium for root differentiation was 1/2MS + 0.2 mg/L KT + 1.0 mg/L IBA with highest differentiation rate of 66.75%. A tissue culture system with high proliferation rate was established by successfully differentiating buds and roots from calli of *Z. nitidum*.

**Key words:** *Zanthoxylum nitidum*; tissue culture; explant; callus; differentiation

两面针[*Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.]为芸香科花椒属植物,具有很高的药用价值,其干燥根入药,为我国南方地区常见中药,1977 年开始被收入《中国药典》。两面针具有行气止痛、活血化瘀、祛风通络之功效<sup>[1]</sup>。其中的氯化两面针碱可以抗肝癌<sup>[2]</sup>和乳腺癌<sup>[3]</sup>。两面针还是牙膏工业的原料。两面针分布于我国南方各省,生于山野坡地灌木丛中。两面针分布虽然广阔,但资源并不丰富。由于

两面针用量巨大<sup>[4]</sup>,其野生资源几近枯竭,市场上两面针药材的伪品因此也较多<sup>[5]</sup>。恢复两面针的资源首先需要种苗。可以通过种子萌发、扦插繁殖<sup>[6]</sup>和组织培养<sup>[7-10]</sup>获得种苗。组织培养的研究集中在两面针的快速繁殖,即采用带腋芽的茎段为外植体,通过丛生芽的诱导来实现增殖。芽诱导培养基采用 MS 附加 6-BA + NAA<sup>[7,9]</sup>,或者 MS 附加 6-BA + IBA<sup>[8,10]</sup>;根再生培养基采用 1/2MS 附加 ABT<sub>1</sub> + IBA<sup>[8,10]</sup>或 1/2 MS + IBA + NAA<sup>[9]</sup>,均成功获得了再生苗。这些研究中没有经过愈伤组织的诱导和分化。本研究利用两面针无根苗茎段为外植

体,通过诱导形成愈伤组织,并使其分化,获得再生苗。目前未见两面针愈伤组织的诱导和分化的研究报道。

## 1 植物材料

两面针无根苗茎段。带腋芽的两面针幼嫩茎段采自广州中医药大学药用植物园,用70%乙醇浸泡30 s,再用0.1% HgCl<sub>2</sub>浸泡8 min,用0.5% NaClO浸泡10 min,最后用无菌水冲洗3次,接种于MS + 2.0 mg/L KT + 0.4 mg/L NAA中培养,12 d后开始生长,约12周后可长成3~4 cm的无根苗。

## 2 实验方法

### 2.1 培养基的配制

以MS培养基为基本培养基,添加蔗糖30 g/L,卡拉胶8.0 g/L,pH5.8~6.0。各种培养基是在基本培养基中分别添加α-萘乙酸(α-naphthalene acetic acid,NAA)、吲哚丁酸(indole-3-butyric acid,IBA)、糠基腺嘌呤(kinetin,KT)等。各种植物生长物质的浓度参考表1~5。

### 2.2 愈伤组织的诱导

在无菌条件下将无根苗的茎切成约6 mm的小段,水平放置在愈伤组织诱导培养基的表面(表1);每瓶接种3段;每种培养基各接种25瓶。培养条件:温度(25±2)℃,相对湿度40%~60%,光照强度为(33.6±0.7) μmol/m<sup>2</sup>·s,光周期为光照与黑暗时间各半。一个月继代1次。

分别在茎段愈伤诱导培养第10、20、30 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%]。

### 2.3 愈伤组织的分化

将继代1次的愈伤组织块切成5 mm×5 mm大小,接种于分化培养基中(表2),每瓶接种4块,每种培养基各接种50瓶。培养1个月后,将在培养基B3上产生的愈伤组织再转移到另4种分化培养基中培养(表3),每个培养皿接种8块,每种培养基各接种12个培养皿。培养条件与2.2的相同。

愈伤组织分化培养4周或8周,统计愈伤组织分化率[分化率=(分化出芽的愈伤组织块数/接种的愈伤组织总块数)×100%]。

### 2.4 芽的增殖

将来自分化培养基B4的带芽愈伤组织转接到芽增殖培养基中(表4),每个培养皿接种6块愈伤

组织,每块愈伤组织带1~2个芽,每种培养基各接种8个培养皿。4周后继代1次,接种到培养瓶中,每瓶接种3块带1~2个芽的愈伤组织,每种培养基各接种16瓶。培养条件与2.2的相同。

芽分化培养8周后,转接至增殖培养基中培养。培养4周或8周统计芽增殖系数(芽增殖系数=全部增殖芽数/接种芽数)。

### 2.5 生根培养

增殖培养后,将来自培养基B6的高于2 cm的芽块(带少量愈伤组织)转接到1/2 MS培养基中进行生根诱导(表5),每瓶接种4块愈伤组织,每块带1~3个芽,每种培养基接种20瓶。培养条件与2.2的相同。

生根培养8周,统计生根率[生根率=(生根的芽数/接种的芽数)×100%]。

### 2.6 数据处理

用SPSS 20.0软件对数据进行统计和One-Way ANOVA方差分析。数据表示为means±SE。

## 3 结果与分析

### 3.1 愈伤组织的诱导

将无根苗茎段接种到三种培养基中进行愈伤组织诱导,结果见表1和图1A1~A3。两面针茎段在三种不同植物生长物质组合构成的诱导培养基中都能产生愈伤组织,说明适当浓度的KT和NAA配比,能够诱导产生愈伤组织。比较三种培养基产生愈伤组织的效果,在A3培养基中的诱导率最高,达到74.84%;其次是A1培养基,诱导率为66.84%;最差的是A2培养基,诱导率只有58.76%。产生的愈伤组织的质量也有不同,在A3和A1上产生的愈伤组织的颜色是淡黄色、颗粒状、质地疏松而且湿润的;而在A2上产生的愈伤组织的颜色是淡黄色、块状、质地干硬的。A3和A1上产生的愈伤组织比较适宜作为愈伤组织分化的材料。由于A3培养基上的诱导率最高,所以选取A3培养基诱导的愈伤组织进行分化实验。

### 3.2 愈伤组织的分化

将来源于A3的愈伤组织进行芽分化培养。结果见表2和图1B1~B3。在培养基B1中没有芽的分化。而在培养基B2和B3上可以分化出芽,但分化率低,只有4.50%和12.50%,每块愈伤组织的芽平均数为1.00和1.30。在培养基B1上没有分化出芽的原因可能是KT的浓度太低。从表2的结果

表 1 不同植物生长物质组合对两面针茎段愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different plant growth substance combinations on the callus induction from stem segments of *Z. nitidum*

培养基 Medium	植物生长物质 Plant growth substance		愈伤组织诱导率 Callus induction rate (%)	愈伤组织块的大小 Size of callus mass (cm)	愈伤组织的性状 Callus characters
	KT (mg/L)	NAA (mg/L)			
A1	1.0	1.0	66.84 ± 3.87 ab	0.6 ~ 0.9	淡黄色, 颗粒状, 疏松, 湿润 Primrose, granulate, friable, wet
A2	2.0	1.0	58.76 ± 4.03 b	0.2 ~ 0.5	淡黄色, 块状, 硬, 干燥 Primrose, lump, compact, dry
A3	4.0	2.0	74.84 ± 3.98 a	0.6 ~ 0.9	淡黄色, 颗粒状, 疏松, 湿润 Primrose, granulate, friable, wet

注: 表中数值后面标有相同字母表示在 0.05 水平上差异不显著。不具或具不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Note: Values in column followed by the same letters were not significantly different while those without or with different letters were significantly different at 5% level.

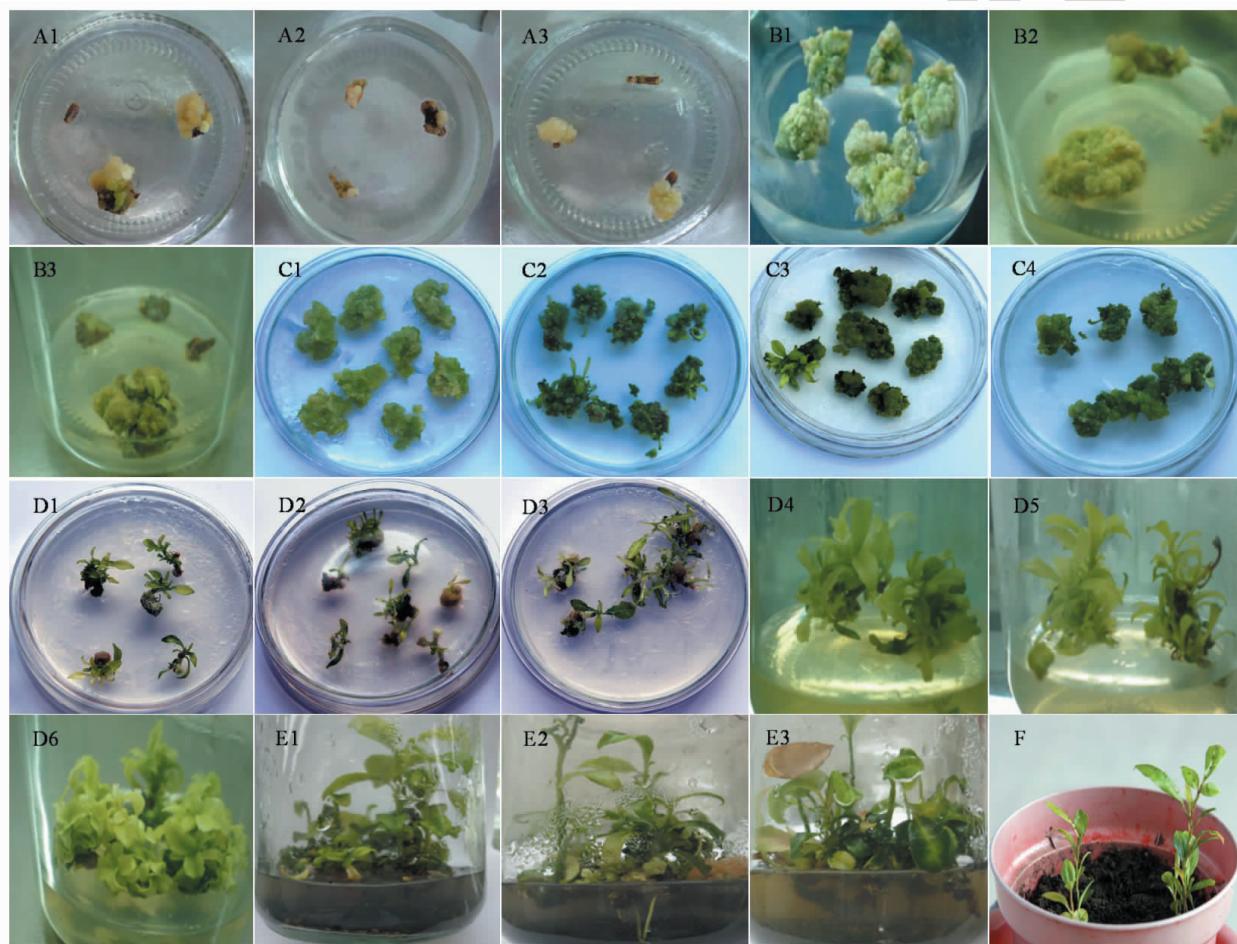


图 1 两面针愈伤组织的诱导和植株再生

Fig. 1 The callus induction and plant regeneration of *Zanthoxylum nitidum*

(A) 茎段愈伤组织:(A1) 培养基为 A1;(A2) 培养基为 A2;(A3) 培养基为 A3。(B) 愈伤组织分化出芽(I):(B1) 培养基为 B1;(B2) 培养基为 B2;(B3) 培养基为 B3。(C) 愈伤组织分化出芽(II):(C1) 培养基为 B3;(C2) 培养基为 B4;(C3) 培养基为 B5;(C4) 培养基为 B6。(D) 再生芽的增殖:(D1) 培养基为 B3, 培养 4 周;(D2) 培养基为 B5, 培养 4 周;(D3) 培养基为 B6, 培养 4 周;(D4) 培养基为 B3, 培养 8 周;(D5) 培养基为 B5, 培养 8 周;(D6) 培养基为 B6, 培养 8 周。(E) 生根培养:(E1) 培养基为 C1;(E2) 培养基为 C2;(E3) 培养基为 C3。(F) 移栽的两面针幼苗

(A) Calli induced from stem segments:(A1) A1 medium;(A2) A2 medium;(A3) A3 medium.(B) Buds differentiated from calli (I):(B1) B1 medium;(B2) B2 medium;(B3) B3 medium.(C) Buds differentiated from calli (II):(C1) B3 medium;(C2) B4 medium;(C3) B5 medium;(C4) B6 medium.(D) Bud proliferation:(D1) B3 medium, culturing for 4 weeks;(D2) B5 medium, culturing for 4 weeks;(D3) B6 medium, culturing for 4 weeks;(D4) B3 medium, culturing for 8 weeks;(D5) B5 medium, culturing for 8 weeks;(D6) B6 medium, culturing for 8 weeks.(E) Roots differentiated from calli:(D1) C1 medium;(D2) C2 medium;(D3) C3 medium.(F) Regenerated plantlets

可以看出,三种培养基中,含 4 mg/L KT + 0.2 mg/L IBA 的 B3 培养基对愈伤组织分化有一定的效果,但效果还不够理想。为了进一步提高芽的分化率,将

在 B3 进行过分化培养的不含芽的愈伤组织,转移到另外四种分化培养基中继续进行芽的分化培养(表 3)。

表 2 不同植物生长物质组合对两面针茎段愈伤组织芽分化的影响(I)

Table 2 Effects of different plant growth substance combinations on the bud differentiation from stem segment calli of *Z. nitidum* (I)

培养基 Medium	植物生长物质 Plant growth substance		芽分化率 Callus differentiation rate (%)	芽的数量 (每块愈伤组织) Bud number (per callus mass)	芽生长状况 Growth status of buds
	KT (mg/L)	IBA (mg/L)			
B1	1.0	0.1	0	0	-
B2	2.0	0.1	4.50 ± 1.55	1.00 ± 0.14 a	黄绿色,叶片小 Flavogreen, smaller leaves
B3	4.0	0.2	12.50 ± 2.17	1.30 ± 0.13 a	绿色,叶片大 Green, larger leaves

注:表中数值后面标有相同字母表示在 0.05 水平上差异不显著。不具或具不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Note: Values in column followed by the same letters were not significantly different while those without or with different letters were significantly different at 5% level.

继续分化培养的结果见表 3 和图 1C1-C3。从表 3 结果可以看出,四种含植物生长物质组合的培养基都可以促进芽的分化,在培养基 B4 中的愈伤组织的分化效果较好,芽分化率为 36.46%,显著高于在其它三个培养基中的分化率,且每块愈伤组织的平均芽数达到 3.30。在培养基 B3、B5 和 B6 的中

的愈伤组织芽分化率分别为 20.83%、16.67% 和 23.96%,它们之间没有显著性差异。四种培养基中,B4 的 KT 含量最高,分化出的芽较小、颜色偏黄、叶片细小,说明芽的质量较差。表 3 的结果表明,高浓度的 KT 对芽的分化有利,但 KT 的浓度太高,会使芽的质量变差。

表 3 不同植物生长物质组合对两面针茎段愈伤组织芽分化的影响(II)

Table 3 Effects of different plant growth substance combinations on the bud differentiation from stem segment calli of *Z. nitidum* (II)

培养基 Medium	植物生长物质 Plant growth substance			芽分化率 Callus differentiation rate (%)	芽的数量 (每块愈伤组织) Bud number (per callus mass)	芽生长状况 Growth status of buds
	KT (mg/L)	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)			
B3	4.0	0.2	-	20.83 ± 4.44 a	1.21 ± 0.09 a	绿色 Green
B4	6.0	0.2	-	36.46 ± 3.59 b	3.30 ± 0.19 b	黄绿色 Flavogreen
B5	2.0	-	0.4	16.67 ± 3.87 a	1.31 ± 0.12 a	绿色 Green
B6	4.0	-	0.8	23.96 ± 4.47 a	1.76 ± 0.09 c	绿色 Green

注:表中数值后面标有相同字母表示在 0.05 水平上差异不显著。不具或具不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Note: Values in column followed by the same letters were not significantly different while those without or with different letters were significantly different at 5% level.

综合表 2 和表 3 的结果分析,在芽分化培养中,除了 KT 的浓度不能过低外,生长素的浓度对芽的分化率也有影响,在 KT 浓度相同的处理中,生长素浓度高,则有芽分化率高的趋势。另外,表 3 的 B3 培养基的芽分化率高于表 2 中的 B3 培养基的芽分化率,原因可能是表 3 的愈伤组织的培养时间较长。

### 3.3 再生芽的增殖

B4 培养基中芽的分化率明显高于其它培养基的,但芽的质量较差,可能的原因是 B4 培养基的 KT

浓度过高。为了获得高的芽分化率而又得到好质量的芽,将 B4 培养基上的芽重新转接到低 KT 浓度的 B3、B5 和 B6 培养基中进行增殖培养。结果见表 4 和图 1D1-D6。从表 4 可以看出,培养 4 周和 8 周后,芽增殖效果最好的是 B6 培养基,其芽增殖系数分别是 3.33 和 5.00。其次是 B3 培养基,培养 4 周和 8 周后,芽增殖系数分别是 2.66 和 3.50。增殖系数较高的这两个培养基的 KT 浓度都是 4.0 mg/L,它们的芽生长速度较慢,芽稍短,但芽的颜色较

绿,说明芽的质量是好的。B5 培养基上的增殖效果最差,它的 KT 浓度为 2.0 mg/L。所以,在增殖培养中,KT 的浓度过低不利于芽的增殖。

比较 B5 和 B6 培养基中的植物生长物质组成,它们的 KT 与 NAA 的浓度比值都是 5,但两者芽的增殖效

果却不同,这说明当细胞分裂素和生长素比值相同,而它们的绝对浓度不同时,芽的分化能力也有差异,也就是说,芽的分化能力不但受细胞分裂素与生长素的比值的影响,还受两种激素的绝对浓度影响。4.0 mg/L KT 和 0.8 mg/L NAA 的组合更有利芽的增殖。

表 4 不同植物生长物质组合对再生芽增殖系数的影响

Table 4 Effects of different plant growth substance combinations on the bud proliferation coefficient

培养基 Medium	植物生长物质 Plant growth substance			芽增殖系数 Proliferation coefficient		芽生长状况 Growth status of buds	
	KT (mg/L)	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)	4 周 4 weeks	8 周 8 weeks	4 周 4 weeks	8 周 8 weeks
B3	4.0	0.2	-	2.66 ± 0.20 ab	3.50 ± 0.27 a	绿色,叶片较小 Green, Smaller leaves	绿色,叶片中等 Green, Median leaves
B5	2.0	-	0.4	1.75 ± 0.31 a	2.83 ± 0.22 a	黄绿色,叶片较小 Flavogreen, Smaller leaves	黄绿色,叶片中等 Flavogreen, Median leaves
B6	4.0	-	0.8	3.33 ± 0.45 b	5.00 ± 0.35 b	绿色,叶片中等 Green, Median leaves	绿色,叶片较大 Green, larger leaves

注:表中数值后面标有相同字母表示在 0.05 水平上差异不显著。不具或具不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Note: Values in column followed by the same letters were not significantly different while those without or with different letters were significantly different at 5% level.

### 3.4 生根培养

取生长在 B6 培养基中高于 2 cm 的芽进行生根培养。培养 4 周后发现芽下部开始分化形成根。培养 8 周后的生根情况见表 5 和图 1E1-E3。三种生根诱导培养基中,生根效果较好的是 C1 和 C2,它们

的生根率分别是 66.75% 和 46.85%,根多且长;而 C3 培养基的生根率较低,为 25.30%,根也较短。表 5 的结果表明,随着 KT 浓度的升高,生根率下降。生根诱导最好的培养基是 C1。

表 5 不同植物生长物质组合对两面针茎段愈伤组织根分化的影响

Table 5 Effects of different plant growth substance combinations on the root differentiation from stem segment calli of *Z. nitidum*

培养基 Medium	植物生长物质 Plant growth substance		生根率 Root differentiation rate (%)
	KT (mg/L)	IBA (mg/L)	
C1	0.2	1.0	66.75 ± 5.50
C2	1.0	1.0	46.85 ± 4.30
C3	2.0	1.0	25.30 ± 3.32

注:表中数值在 0.05 水平上差异显著。

Note: Values in column were significantly different at 5% level.

### 3.5 炼苗与移栽

将 C1 中获得的再生苗进行锻炼。把培养瓶放置在室内靠窗处接受散射的自然光照射 3 d,然后打开培养瓶盖,在相同位置又放置 3 d。之后取出再生苗,用清水洗净植株基部的培养基,移栽到含 1/3 砂 2/3 土的培养基质中。除了注意在苗期时遮荫外,不需要特别护理。移栽后的两面针幼苗生长良好(图 1F),移栽成活率为 91%。

## 4 讨论与结论

两面针的干燥根因为有消炎止痛的功效,是一

种重要的药用植物,被收录在《中国药典》(2015 年版)中<sup>[11]</sup>。野生两面针虽然分布较广,但由于它的种皮坚硬,在自然条件下难以萌发;加上人们对两面针的需求日益增加,造成野生资源贫乏。要想得到大量的两面针,就要大量种植。种植两面针首先需要种苗。利用组织培养技术获取种苗是一种高效率的方法。本研究成功地获得了两面针再生苗,为大量种植两面针打下了基础。

本研究首次从两面针的愈伤组织中分化出芽和根。虽然有报道研究两面针的组织培养<sup>[7-10]</sup>,但还没有两面针愈伤组织诱导和分化的报道。本研究用

KT 和 NAA 两种植物生长物质配比诱导产生了愈伤组织, 愈伤组织呈淡黄色、颗粒状、疏松、湿润, 是有利于芽分化的类型<sup>[12]</sup>。NAA 对愈伤组织的诱导有重要作用, 对某些植物而言其诱导率可以达到 100%, 效果优于 2,4-D<sup>[12]</sup>。利用愈伤组织分化成苗, 可以更大地提高繁殖系数。本研究成功地从愈伤组织分化出芽和根, 获得了再生苗。愈伤组织的分化与细胞分裂素和生长素的比例有关, 如果该比值高则促进芽分化<sup>[13]</sup>, 而细胞分裂素的 KT 的效力远大于腺嘌呤<sup>[12]</sup>。本研究的结果表明, 高浓度 KT 可以促进芽的分化, 但分化的芽质量不好; 适宜浓度 KT 分化的芽质量较好, 但比高浓度 KT 的芽分化率低。本研究采用了先提高芽分化率, 再改善芽的质量的方案, 从而获得了高繁殖系数且质量好的种苗。

## 参考文献

- 1 Liu HG (刘华钢), Huang QJ (黄秋洁), Lai MX (赖茂祥). A review of studies of Chinese medicine *Zanthoxylum nitidum*. *Lishizhen Med Mat Med Res* (时珍国医国药), 2007, 18(1):43-44.
- 2 Lin JM, Shen A, Chen HW, et al. Nitidine chloride inhibits hepatic cancer growth via modulation of multiple signaling pathways. *BMC Cancer*, 2014, 14: 729. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/729>.
- 3 Sun MJ, Zhang N, Wang XL, et al. Nitidine chloride induces apoptosis, cell cycle arrest, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin in breast cancer cells. *Tumor Biol*, 2014, 35: 10201-10212.
- 4 Lai MX (赖茂祥), Rao WY (饶伟源), Yan KJ (严克俭), et al. Pharmacognostical identification on stem of *Zanthoxylum nitidum* and its adulterants. *J Chin Med Mat* (中药材), 1994, 17(3):18-21.
- 5 Liu SH (刘绍华), Qin QY (覃青云), Tang XL (唐献兰), et al. A review of studies and developments of *Zanthoxylum nitidum*. *J Guangxi Acad Sci* (广西科学院学报), 2005, 21: 130-132.
- 6 Sun SR (孙世荣), Jiang YY (蒋永元), Hu YZ (胡永志), et al. Study on propagation technique of *Zanthoxylum nitidum*. *J Anhui Agri Sci* (安徽农业科学), 2008, 36: 6787-6789.
- 7 Wang XM (王小敏), Jiang B (蒋波), Xu MH (徐敏慧), et al. Tissue culture and rapid propagation of *Zanthoxylum nitidum*. *J Yulin Teachers Coll, Nat Sci* (玉林师范学院学报, 自科版), 2005, 26(5):70-73.
- 8 Wei DQ (韦大器), Wu HY (吴红英), He GZ (何贵整), et al. Tissue culture and rapid propagation of *Zanthoxylum nitidum*. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2006, 42(1):73.
- 9 Mo YS (莫勇生), Sun WB (孙文波), Zhang HY (张红岩). Study on tissue culture of *Zanthoxylum nitidum*. *Agric Res Appl* (农业研究与应用), 2012, 143(6):16-20.
- 10 Shi Q (时群). The tissue culture technique of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. *China Forest Sci Technol* (林业科技开发), 2013, 27:117-120.
- 11 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 169-170.
- 12 Zhou YJ (周宜君), Zhou SC (周生闯), Liu Y (刘玉), et al. Influences of plant growth regulations on induction and differentiation of plant callus. *J Central Univ Nation, Nat Sci* (中央民族大学学报, 自科版), 2007, 16(1):23-28.
- 13 Pan RC (潘瑞炽). *Plant Physiology* (植物生理学). Beijing: China Higher Education Press, 2012.