

青花菜与萝卜属间杂种的表型和分子鉴定

蒋振^{1,2}, 张晓辉¹, 蒋磊¹, 邱杨¹, 程斐², 李锡香¹

(¹中国农业科学院蔬菜花卉研究所/农业部蔬菜作物基因资源与种质创制北京科学观测实验站, 北京 100081; ²青岛农业大学园艺学院, 青岛 266109)

摘要:应用形态学、细胞学和分子标记的方法对通过胚挽救获得的青花菜与萝卜属间杂种植株进行了鉴定。结果表明:杂种植株的生长势明显强于父本和母本,大部分形态性状超出了父、母本的范围,部分性状介于父母本之间或偏向于父本或母本一方。表型和细胞学观察显示杂种植株具有类似母本的雄性不育特性。SSR分子标记分析表明,杂种植株包含了双亲的遗传信息。可见,远缘杂种是双亲间的真杂种。远缘杂交种的获得与初步鉴定为促进萝卜属和芸薹属的基因交流提供了桥梁种质,为进一步创制萝卜或芸薹属作物新种质提供了基础材料。

关键词:青花菜;萝卜;属间杂种;形态性状;分子标记

Identification of Intergeneric Hybrids between Broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica* Plenck.) and Radish (*Raphanus sativus* L.) by Morphological Traits and SSR Marker

JIANG Zhen^{1,2}, ZHANG Xiao-hui¹, JIANG Lei¹, QIU Yang¹, CHENG Fei², LI Xi-xiang¹

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Ministry of Agriculture and Research Station of Vegetable Crop Gene Resource and Germplasm Enhancement, Beijing 100081;

² College of Horticulture, Agricultural University of Qingdao, Qingdao 266109)

Abstract: The intergeneric hybrids of broccoli and radish were obtained by embryo rescue and identified by morphological characterization, cytological observation, and molecular marker techniques. The results showed that the hybrids showed stronger growth vigor compared with their parents. Most phenotypic characters of the hybrids were beyond two parents. Cytological observation revealed that the hybrid plants possessed male sterility characteristic as female parent broccoli. According to SSR molecular marker analysis, the hybrids contained genetic information of both parents, which proved that hybrids were real hybrids. The creation and identification of the hybrids could provide basic materials for producing new radish germplasm and useful bridge for gene communication between *Brassica* and *Raphanus*.

Key words: broccoli; radish; intergeneric hybrids; morphological traits; molecular marker

远缘杂交可以打破不同种属间的隔离使之间的基因发生渐渗和交流,在创造新物种或新种质以及研究基因组进化方面具有重要意义。十字花科芸薹属植物遗传类型丰富、变异广泛,这为进行

芸薹属种间杂交或近缘属间杂交培育作物新种质提供了良好的物质基础。萝卜属植物是芸薹族中与芸薹属植物亲缘关系最近的物种^[1]。任成伟等^[2]研究发现萝卜中亦存在芸薹属植物缺乏的抗

收稿日期:2013-11-15 修回日期:2013-12-15 网络出版日期:网络出版日期:2014-06-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140609.1418.011.html>

基金项目:“十二五”国家科技支撑项目(2013BAD01B04-1、2012BAD02B01);农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室

第一作者研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail:jiangzhenzd@163.com

通信作者:李锡香,研究方向为蔬菜种质资源与生物技术。E-mail:lix0612@163.com

虫、抗病、耐寒、耐贫瘠等许多优良基因。尽管芸薹属和萝卜属间的远缘杂交存在很多障碍,已于1914年首次报道了萝卜与甘蓝的远缘杂交,目前在这2个属之间进行了很多杂交研究,获得了萝卜和甘蓝^[3-5]、萝卜与芥蓝^[6]、萝卜与油菜^[7-8]等之间的远缘杂种。I. H. Mcnaughton等^[3]对获得的萝卜甘蓝杂种后代(以甘蓝为母本)进行接种鉴定,结果表明:其部分植株对根肿菌的抗性超过了抗病对照品种。H. Peterka等^[4]发现萝卜甘蓝在抗虫性、抗寒性方面也存在很多优势。潘大仁^[7]以甘蓝型油菜与萝卜的属间杂种加倍,再与甘蓝型油菜回交,经胚胎挽救获得了25%左右的高抗线虫基因BC₂后代。

G. Olsson等^[9]的研究表明萝卜与白菜或甘蓝远缘杂交产生的杂种植株营养体生长具有很大优势,而且其干物质和粗蛋白的含量明显高于2个亲本植株,因此有作为蔬菜或饲料作物开发的潜力。张小康等^[10]以萝卜不育系为母本,雪里蕻、大头菜和多裂叶芥为父本远缘杂交,最后获得叶片性状遗传稳定、肉质根杂交优势明显的组合,该组合十分适合腌制加工。因此,把萝卜中的优良基因转移到芸薹属作物中,对芸薹属的遗传改良具有重要作用,反之亦然。

目前国内外尚未有详细的关于青花菜与萝卜远缘杂交的研究报道。本研究通过形态学和分子标记方法对前期胚挽救获得的青花菜雄性不育材料(*Brassica oleracea* L. var *italica* Plenck. $2n = CC = 18$)与萝卜(*Raphanus sativus* L. $2n = RR = 18$)的F₁杂种植株进行了鉴定,为进一步开展芸薹属和萝卜属作物的遗传改良、种质创新和起源演化研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

母本为青花菜雄性不育系YX24,父本为萝卜自交系LX63-6和LX58-6,通过胚挽救技术获得的青花菜与萝卜的远缘杂交种包括H63-6和H58-6。所有材料均由中国农业科学院蔬菜花卉研究所种质资源课题组创制和提供。

1.2 方法

1.2.1 形态学比较 在莲座期,对两亲本及其杂种F₁的叶色、叶数、株幅、株高等性状进行观测,其中叶片性状取最大叶片进行测量。在盛花期,观测各材料的花色、花器官大小等性状。结实后,测

量角果大小。所有性状的观测均在各材料不同植株的相同部位取10个样本进行测量、统计,求其平均值。

1.2.2 花粉活力测定 盛花期,取当天开放花朵的新鲜花粉,用1%醋酸洋红染色,置显微镜(Olympus BH-2)下进行观察并拍照。不同材料各取3株的花粉,每株花粉观察10个视野,取其平均值。花粉活力(%) = 着色花粉数/花粉粒总数 × 100%。

1.2.3 SSR鉴定 参照V. M. Williamson等^[11]的方法,采用CTAB法提取参试材料基因组DNA。首先利用崔娜等^[12]设计的27对不同的SSR引物(表1)对青花菜和萝卜双亲基因组间的多态性进行鉴定,然后利用多态性引物对亲本和杂种苗进行SSR分析。PCR反应体系15 uL,含15 ng/uL模板DNA 3 uL,10 × Buffer 1.5 uL, dNTPs 0.2 uL, 10 umol/uL引物0.5 μL, Taq酶0.2 μL。扩增程序为94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 35个循环;最后72℃延伸7 min; 4℃保存。PCR产物经8%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染检测。

2 结果与分析

2.1 杂种植株与亲本的形态学比较

田间观察发现,青花菜与萝卜的远缘杂种1代的生长势较父、母本强,表现出明显的杂种优势。材料间除了角果长和雌蕊长差异不显著外,其他大部分性状超出父母本的范围或介于父母本之间,部分性状偏向于父本,部分性状偏向于母本(表2和图1)。

从表2和图1可以看出,母本青花菜YX24主茎节间明显,叶片椭圆形,叶面有蜡粉,叶缘波状,无叶裂,叶片灰绿,有1对叶耳,花黄色。父本萝卜LX63-6植株无明显茎节,花叶叶片浅绿色,叶面有刺毛,无蜡粉,叶尖钝尖,花叶深裂,花淡蓝紫色;父本萝卜LX58-6植株无明显节间,板叶,叶片绿色,叶片光滑,叶尖圆,叶缘浅齿状,花浅紫色。除了叶片宽、角果长和雌蕊长外,青花菜与萝卜自交系LX63-6的杂种(H63-6)株型、叶片宽和蜡粉介于父母本之间;叶色和叶型偏向父本LX63-6,为花叶、叶裂,叶锐尖,浅齿状;株高、叶片数、叶片长、花蕾长、花蕾宽、花冠直径、花瓣长、萼片长、角果喙长均显著高于双亲;花色不同于父本和母本。除了角果长和雌蕊长外,青花菜与萝卜自交系LX58-6的杂种

表 1 SSR 引物序列

Table 1 SSR primer sequences

引物编号 Primer number	核苷酸重复类型 Nucleotide repeit type	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	退火 温度 (°C)Tm	引物编号 Primer number	核苷酸重复类型 Nucleotide repeit type	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	退火 温度 (°C)Tm
PR015	(AGA)9	TCAATGTGTTTCTCACACCCA GATTCGGGTAGCTTCAGCAG	55	PR100	(CTT)7	CTTTTTAGCGCTTTTGGGTG GCAAATGAAGCTCCAGAGG	55
PR017	(CTC)7	TCTTTAACAGCCCCAGCAGT CGAGAACCAGCATCAACAGA	58	PR103	(AG)9	TCTTCTTCTACTGCGCACAC CTCGCTTTCCTTCCTTCCTT	55
PR032	(ATC)10	TGAGAACTTGATTGCTTGCG TCACTGCTTGCTTTTCAGAGA	55	PR104	(TCA)6	GGGTCCCAATGCTAGTTGTG CAATGCCAGAAGGACAAGGT	55
PR033	(TTGTG)4	TTGGTCTCTTGTTCCTGTG GCAATCATAAACTGTGCTTTTT	55	PR107	(T)20	TTCCTTCCAATCTCCTCCT CTCATCAATCATCATCGGCT	55
PR039	(TCTTCA)3	CCACCCAGTTTGTGGAGAAT ACTGCCCTGCTGAGACTGTT	55	PR109	(GCTCCA)3	AACAAGTGGCGAGAAGGAGA GTCGTCTCAGCTGGTACCGT	55
PR052	(AG)1	AACACAAAACCAGAGAAGGG GAACAAGAAGCAGGGATTGC	57	PR123	(GAG)6	GAAGTGAACCGAAAACCCAA TTCGGACTTCAGCTTGGTCT	55
PR053	(CTC)6	TCGTTTCATAGGCTCAATCCC TGTTACCAACTCCACGTCCA	55	PR124	(CTT)6	CTTCCCTTCTCCGTATCAG TCTGAATCGAGAGAGGCCAT	55
PR054	(GGA)6	ATGTGAACGATCCAGCATCA AGTCCACAGCTGGAGATTGC	55	RS009	(AGA)6	AGAACTCGGCAGATAAAG AAGAGGAATACGCCAAACC	56
PR070	(T)18	GTTACTGGGATGGGGATCT TCCTCAAAAAGGAAATGATGA	55	RS027	(TTGTG)4	TTCTCTGGTCTTGTGAGA GCAATCATAAACTGTGCG	54
PR071	(AG)12	TTCCAGCGTCAAACAGACAG TTGGAGTTCCCATCTTTGCT	55	RS030	(ATG)7	AACTCCGCTCTGATGTCT TTTCTCATATTACCCGATG	54
PR074	(GAA)6attgga (GAT)7	TCTGTCATTAGTGGCGCATC GTGCCCTGGTTTTTCAATGT	55	RS032	(CTG)6	AAACACCATTTCGCTCAG TTCAGGGACGGCTTCTAC	56
PR077	(AGC)8	ATTAACGTGGGTGATGGGAA AATTTAGGCCCGAGAAAACG	55	RS040	(AGA)13	GAGGGACGATAGGAAGGG ATTCTGCTCCGCCAACTC	57
PR085	(TCT)8	TCAAGGGATCTCTTAGCCGA CGATTTTGAGGCCATTAGGA	55	RS046	(CTC)6	GAGGCGGAAAGCCCAATA CTTGAACCTCGCCGTGT	57
PR088	(AGC)6	TTCTGTGCTTCCACGATCAG TTCTCTTCACAGCCATTG	55				

(H58-6)叶色、株型、蜡粉介于父母本之间;叶型、叶片宽和花蕾宽偏向母本青花菜;花瓣长偏向父本 LX58-6,呈倒卵圆、无裂叶、叶缘浅齿状;株高、叶片数、叶片长、花蕾长、萼片长、花冠直径和角果喙长较父母本表现出明显的优势;花色白色,不同于父母本。两杂种植株均具有明显的茎节,生长旺盛,杂种优势显著,花期长,花蕾与花瓣外形均与父本萝卜相似,雄蕊类似母本青花菜呈现雄性不育的特性。

2.2 杂种与亲本的花粉活力

通过对不同材料花粉活力的比较可知,母本青花菜雄性不育,花粉活力为 0,2 个父本的花粉活力分别为 94.7% 和 92.8% (图 1,14-15;表 3);2 个杂种的花粉活力分别为 0.45% 和 0.64% (图 1,16-17;表 3),这一方面可能是因为母本的雄性不育特性为胞质不育所致,另一个原因可能是因为亲缘关系较远造成的。

表 2 属间杂种植株和亲本的主要形态性状比较

Table 2 Comparison of Morphological Traits among the hybrids and their parents

性状 Characters	青花菜 Broccoli	杂种 F ₁ Hybrids F ₁		萝卜 Radish		性状 Characters	青花菜 Broccoli	杂种 F ₁ Hybrids F ₁		萝卜 Radish	
	YX24	H58-6	H63-6	LX58-6	LX63-6		YX24	H58-6	H63-6	LX58-6	LX63-6
株型 Plant architecture	直立	半直立	半直立	开展	开展	花冠直径 (cm)	1.60b	2.07a	2.06a	1.76b	1.68b
株高 (cm) Plant height	14.06c	24.35a	24.08a	18.15b	19.21b	Corolla diameter					
叶色 Leaf color	灰绿色	浅绿	浅绿	绿色	浅绿	花瓣长 (cm) Petal length	1.47c	1.74a	1.76a	1.62ab	1.50bc
叶面蜡粉 Leaf wax	有	少量	少量	无	无	雌蕊长 (cm) Pistil length	0.016a	0.012a	0.010a	0.011a	0.011a
叶片数 Leaf blade number	6.5b	11.5a	14.0a	7.0b	8.0b	萼片长 (cm) Sepal length	1.25b	1.48a	1.53a	0.75c	0.71c
叶片长 (cm) Leaf blade length	16.86b	23.96a	22.71a	18.53b	18.63b	花蕾长 (cm) Flower bud length	1.80b	2.18a	2.20a	1.76b	1.80b
叶片宽 (cm) Leaf blade width	12.44a	12.38a	11.20ab	7.27c	10.22b	花蕾宽 (cm) Flower bud width	0.363bc	0.403ab	0.433a	0.300d	0.317cd
叶型 Leaf type	板叶	板叶	花叶	板叶	花叶	角果长 (cm) Silique length	1.31a	1.40a	1.38a	1.32a	1.33a
花色 Flower color	黄色	白色	白色	浅紫色	淡蓝紫色	角果喙长 (cm) Silique beak length	0.28c	0.86a	0.86a	0.51b	0.55b

小写字母表示材料间性状值的差异显著水平 ($P < 0.05$)

Small letters mean significant difference at 0.05 level

表 3 杂种与亲本的花粉活力比较

Table 3 Comparison of pollen viability between the hybrids and their parents

材料 Materials	花粉数 Pollen number	有活力花粉数 Viabile pollens number	无活力花粉数 Unvital pollens number	花粉活力 (%) Pollen viability
YX24	845	0	845	0
H63-6	670	3	667	0.45
H58-6	783	5	778	0.64
LX63-6	658	623	35	94.70
LX58-6	765	710	55	92.80

2.3 杂种植株与亲本的 SSR 分子鉴定

利用 27 对 SSR 引物对两亲本 DNA 进行扩增, 其中 10 对引物在两亲本间表现出多态性。用这 10 对引物分别对亲本 YX24、LX58-6 和扩繁的 11 株 H58-6 杂种 1 代植株及亲本 YX24、LX63-6 和扩繁的 13 株 H63-6 杂种一代植株进行鉴定, 其中 8 对引物 (编号分别为 PR017、PR039、PR070、PR088、PR103、PR124、PR030、PR032) 扩增出清晰且能较好反应亲本与杂种之间遗传关系的条带。以引物编号 PR039 为例 (图 2), 在母本中扩增出一条明显约 150 bp 的片段, 在父本中扩增出约 200 bp 左右的片段, 杂种植株同时扩增出母本与父本的特异条带, 说

明杂种植株既有来自母本的遗传信息, 也有来自父本的遗传信息, 证明其为真杂种。

3 讨论

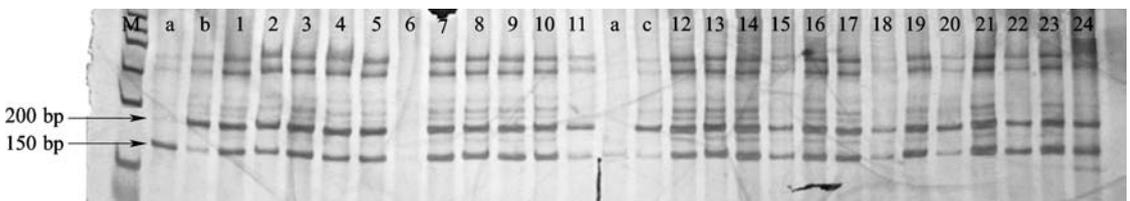
在芸薹属种间杂交及其近缘属间杂交研究中, 为克服生殖障碍, 子房培养和胚挽救是常用的方法。日本学者首次通过子房培养成功地获得了白菜和绿色甘蓝的种间杂种; 赵德培等^[13]采用幼胚培养技术获得了结球甘蓝与大白菜的种间杂种; 顾爱侠等^[14]利用子房培养技术, 获得了四倍体大白菜与二倍体结球甘蓝的异源三倍体。H. Y. Qiao 等^[15]通过连续的蕾期授粉和胚挽救技术获得了大白菜与甘蓝的种间杂种。在芸薹属甘蓝类作物与萝卜属间, 也有很多远缘杂交的成功报道。胡大有等^[16]研究表明萝卜与甘蓝型油菜的属间杂交存在高度不亲和, 但采用子房培养能够提高杂种的获得频率。扈新民等^[17]以甘蓝显性雄性不育系为母本, 以萝卜自交系为父本进行属间杂交, 在筛选适合甘蓝与萝卜属间杂种胚挽救的适宜取材时间、培养基及外源添加物的基础上, 获得了 29 株杂种植株。王冰等^[18]以萝卜为母本, 芥蓝为父本, 通过杂交和胚抢救成功得到 F₁ 植株。X. L. Li 等^[19]通过萝卜与芥蓝的杂交得到了异源多倍体。但是, 在青花菜和萝卜之间的远缘杂交鲜有报道。



植株和叶片性状:1. 母本青花菜 YX24 2. 父本萝卜 LX58-6 3. 父本萝卜 LX63-6 4. 杂种 H58-6 5. 杂种 H63-6
11. 叶片 12. 角果 13. 花蕾;花器官性状:6. 青花菜 YX24 7. 萝卜 LX58-6 8. 萝卜 LX63-6 9. 杂种 H58-6
10. 杂种 H63-6;花粉活力:14. 萝卜 LX58-6 15. 萝卜 LX63-6 16. 杂种 H58-6 17. 杂种 H63-6
Plant and leaf characteristics;1. YX24 2. LX58-6 3. LX63-6 4. H58-6 5. H63-6 11. Leaves 12. Siliques
13. Flower bud, Flower organ characteristics;6. YX24 7. LX58-6 8. LX63-6 9. H58-6 10. H63-6,
Pollen viability;14. LX58-6 15. LX63-6 16. H58-6 17. H63-6

图 1 杂种和亲本的形态特性

Fig. 1 Morphology characteristics of the hybrids and their parents



M;DL2000 Marker, a;P₁ YX24, b;P₂ LX58-6, c;P₂ LX63-6, 1-11;H58-6, 12-24;H63-6

图 2 引物 PR039 对亲本和杂种 DNA 的扩增结果

Fig. 2 SSR analysis on parents and hybrids by primer PR039

本试验前期种质资源课题组采用扈新民等^[17]介绍的方法,以雄性不育材料为母本,利用胚挽救技术获得了青花菜与萝卜的远缘杂交种。本试验仅对通过胚挽救技术获得的青花菜与萝卜的远缘杂交种进行鉴定,形态学观察发现远缘杂种在生长势、株高、叶片数、叶片大小、花大小等诸多性状上都表现明显的杂种优势,也有部分性状介于父母本之间,部分性状偏向父本或母本。分子鉴定也证明其是真杂种。青花菜和萝卜有着各自不同的特征特性,如青花菜富含菜菔硫烷^[20],萝卜富含萝卜子素^[21]等。青花菜和萝卜远缘杂交真杂种的创制为促进青花菜与萝卜间的基因交流和性状改良提供了桥梁种质。

在本研究中,远缘杂种不育性的存在使得无法从花粉发育情况上判断其是异源单倍体还是天然加倍的异源双倍体,所以,有必要采用细胞学方法和流式细胞仪进一步对获得的远缘杂种的染色体组成和倍性进行鉴定。在必要的情况下,通过加倍获得异源双倍体,提高该远缘杂种的利用价值。

参考文献

- [1] Warwick S L, Black L D. Molecular systematics of *Brassica* and allied genera (subtribe Brassicinae, Brassiceae) chloroplast Genome and cytodeme congruence [J]. TAG, 1991, 82: 81-92
- [2] 任成伟, 曹寿椿. 萝卜细胞质芸薹属作物雄性不育材料研究概况 [J]. 中国蔬菜, 1992(2): 42-45
- [3] Mcnaughton I H. Resistance of *Raphanobrassica* to clubroot disease [J]. Nature, 1973, 243(5409): 547-548
- [4] Peterka H, Budahn H, Schrader O, et al. Transfer of resistance against the beet cyst nematode from radish (*Raphanus sativus*) to rape (*Brassica napus*) by monosomic chromosome addition [J]. TAG, 2004, 109: 30-41
- [5] 程雨贵, 吴江生, 陈洪高, 等. 萝卜和甘蓝远缘杂交研究 [J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(1): 1-6
- [6] 魏丽华, 李象松, 李炫丽, 等. 萝卜-芥蓝杂种 F₁ 代创制及杂种鉴定 [J]. 武汉植物学研究, 2010, 28(2): 243-245
- [7] 潘大仁. 甘蓝型油菜与萝卜杂交产生的杂种 BC-2 代株系抗线虫病分析 [J]. 福建农业大学学报, 1999, 28(4): 402-406
- [8] 胡大有, 王爱云, 李梅. 萝卜与甘蓝型油菜和黑芥的远缘杂交亲和性研究 [J]. 作物研究, 2006, 20(2): 124-126
- [9] Olsson G, Ellerstrom S, Tsunoda S, et al. Polyploidy breeding in Europe [M]. // Brassica crops and wild allies. [II]. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1980: 167-190
- [10] 张小康, 熊秋芳, 李世升, 等. 萝卜与芥蓝远缘杂交新品种的选育研究 [J]. 江西农业学报, 2012, 24(11): 1-4
- [11] Williamson V M, Ho J Y, Wu F, et al. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, *Mi*, in tomato [J]. TAG, 1994, 87: 757-763
- [12] 崔娜, 邱杨, 李锡香, 等. 萝卜 EST 资源的 SSR 信息分析及 EST-SSRs 标记开发 [J]. 园艺学报, 2012, 39(7): 1303-1312
- [13] 赵德培, 张纪增. 通过幼胚培养获得结球甘蓝与大白菜的种间杂种 [J]. 中国农业科学, 1981(2): 46-51
- [14] 顾爱侠, 申书兴, 陈雪平, 等. 大白菜与结球甘蓝杂交获得异源三倍体及其生殖特性的研究 [J]. 园艺学报, 2006, 33(1): 73-77
- [15] Qiao H Y, Li F, Zhang S J, et al. Production and identification of interspecific hybrids between chinese cabbage and purple cabbage [J]. J Plant Sci, 2012, 30(4): 407-414
- [16] 胡大有, 王爱云. 甘蓝型油菜与萝卜属间杂种的获得及分子鉴定 [J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(4): 476-479
- [17] 扈新民, 李锡香, 梁燕, 等. 甘蓝与萝卜属间杂交及其胚挽救技术优化 [J]. 中国蔬菜, 2009(10): 7-12
- [18] 王冰, 龙鸿. 萝卜芥蓝远缘杂交诱发的 rRNA 基因沉默现象 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011
- [19] Li X L, Guo W, Wang B, et al. Instability of chromosome number and DNA methylation variation induced by hybridization and amphidiploid formation between *Raphanus sativus* L. and *Brassica albobolabra* Bailey [J]. Plant Biol, 2010, 10: 20-22
- [20] 李占省, 刘玉梅, 方智远, 等. 青花菜不同营养器官中菜菔硫烷含量的 HPLC 检测与分析 [J]. 园艺学报, 2009, 36(S): 1971
- [21] 刘浩. 萝卜细胞系的建立及萝卜硫素的提取与检测 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010