

长鞭红景天细胞悬浮培养体系优化研究

王莉¹, 管江红², 史玲玲³, 刘玉军³

1. 西藏民族学院医学院, 陕西 咸阳 712082

2. 西藏民族学院信息工程学院, 陕西 咸阳 712082

3. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

摘要: 目的 优化长鞭红景天 *Rhodiola fastigiata* 细胞悬浮培养体系及生长条件。方法 研究基本培养基、激素、碳源、氮源等因素对长鞭红景天细胞生长和红景天苷产量的影响, 建立高产红景天苷的细胞悬浮培养体系。结果 MS 培养基+BA 5.0 mg/L+2, 4-D 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L 为长鞭红景天细胞悬浮培养的最适培养条件。结论 对培养条件进行优化, 为利用长鞭红景天细胞大规模生产天然活性成分奠定基础, 为缓解野生长鞭红景天资源的匮乏提供可行途径。

关键词: 长鞭红景天; 细胞悬浮培养; 红景天苷; 培养基; 激素; 碳源; 氮源

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)11-2272-07

Optimization of cell suspension culture system of *Rhodiola fastigiata*

WANG Li¹, GUAN Jiang-hong², SHI Ling-ling³, LIU Yu-jun³

1. College of Medicine, Tibet University for Nationalities, Xianyang 712082, China

2. College of Information Technology, Tibet University for Nationalities, Xianyang 712082, China

3. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: Objective To optimize the cell suspension culture system and growth conditions of *Rhodiola fastigiata*. **Methods** The effects of basic medium and hormone as well as its concentration, carbon, and nitrogen sources on the growth of *R. fastigiata* and the yield of salidroside were investigated and the cell suspension culture system of *R. fastigiata* with high yield was established. **Results** MS + BA 5.0 mg/L + 2, 4-D 0.1 mg/L + sucrose 30 g/L was the optimal medium for obtaining cell suspension culture of *R. fastigiata* with high yield. **Conclusion** Optimization of the culture conditions could lay a good foundation for producing natural active components through a large-scale production of *R. fastigiata* cells and provide a feasible way for alleviating the shortage of its natural resources.

Key words: *Rhodiola fastigiata* S. H. Fu; cell suspension culture; salidroside; medium; hormone; carbon source; nitrogen source

长鞭红景天 *Rhodiola fastigiata* S. H. Fu 为景天科 (Crassulaceae) 红景天属 *Rhodiola* L. 植物, 其根及根茎主要含有红景天苷等次生代谢产物, 具有抗疲劳、抗衰老、抗缺氧、抗微波辐射及抗肿瘤等功效, 是极具开发前景的环境适应药物之一^[1-3], 亦是我国传统名贵药材珍品。由于受到需求递增、生态环境日渐退化双重因素的影响, 红景天野生资源正日益稀竭, 部分物种几近灭绝。为探寻新的资源补偿途径, 本研究以植物细胞培养技术为手段, 以野生长鞭红景天植株的茎、叶为外植体, 首先开展了颗粒状愈伤组织高产无性系和悬浮培养高产细胞系的筛选工作, 并进一步考察培养基构成对长鞭红景

天细胞生长、目标产物生产的影响。

1 材料

样品采自西藏自治区林芝地区色季拉山海拔 4 200 m 以上的高山草甸, 经西藏大学农牧学院鲍隆友教授鉴定为景天科红景天属长鞭红景天 *Rhodiola fastigiata* S. H. Fu。红景天苷对照品, 批号 0818200103, 购自中国药品生物制品检定所; 其他试剂均为国产分析纯。

TU—1901 型双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司)。AE—100 型电子天平。HPLC (Beckman): 110B 溶液输送系统, 166 紫外检测器, 406 数据交换器。

收稿日期: 2012-04-16

基金项目: 教育部重点项目“长鞭红景天悬浮细胞体系对高原典型环境因子应答基因的筛选”(211176); 西藏自治区科技厅项目“长鞭红景天悬浮细胞体系的抗逆性研究”

作者简介: 王莉 (1972—), 女, 副教授, 研究方向为药用植物次生代谢机制及生物技术的研发。Tel: (029)33755247 E-mail: xzmywl@163.com

2 方法

2.1 细胞悬浮培养体系的建立

以长鞭红景天实生苗幼茎作为外植体诱导产生愈伤组织,生长旺盛的愈伤组织继代培养20 d后转入附加有3.0 mg/L 6-BA、0.1 mg/L 2, 4-D及3%蔗糖的MS液体培养基中,建立细胞悬浮培养体系。该培养体系主要由淡绿色细胞团组成,最大粒径为4 mm。细胞悬浮培养系每隔10 d继代1次。培养基初始pH 5~8。培养室内光周期为15 h/d,培养温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,摇床转速为109 r/min。

2.2 细胞生物量的测定

收获的小细胞团用5倍体积的蒸馏水充分洗涤3次,抽干表面水分,称其鲜质量,后于 60°C 烘箱中烘至恒质量,放入干燥器内冷却,称其干质量。

2.3 红景天苷的提取及测定

长鞭红景天愈伤组织颗粒 60°C 烘干至恒质量,粉碎(过40目筛)。75%乙醇浸提12 h,后于 90°C 水浴中回流提取40 min,加入5倍红景天体积75%乙醇。提取液用4层纱布滤过。滤液减压蒸馏(70°C , 7 kPa)除去大部分乙醇,上AB-8树脂柱,20%乙醇洗脱,洗脱体积流量为5 mL/min,收集洗脱液再经二次减压蒸馏(70°C , 7 kPa)除去大部分乙醇,冷冻干燥,得浅棕色固体,待用。HPLC法^[4]测定红景天苷量。

2.4 基本培养基的选择

选择MS、White、H、B₅、N₆ 5种有代表性且组分差异较大的培养基。处理方法为首先配制上述5种液体培养基,分别添加3.0 mg/L BA, 0.5 mg/L NAA和30 g/L蔗糖,以50 mL分装于100 mL的三角瓶中,初始pH 5.8,灭菌待用。取生长良好、大小均一的悬浮培养细胞颗粒,弃旧液,无菌蒸馏水清洗2次,各组不同培养液清洗3次,弃清洗液,以接种量为 (5.00 ± 0.02) g(干质量)接种于对应各培养液中。摇床转速为109 r/min, $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,弱光条件下培养15 d,收获细胞。测定细胞生物量及红景天苷量。每组每个样品设3个平行试验。

2.5 培养基的优化

2.5.1 蔗糖量 对照组MS液体培养基中蔗糖量设为30 g/L,实验组中的蔗糖量分别为10、20、40、50 g/L。处理方法为首先配制不同碳源量的MS液体培养基,以50 mL分装于100 mL的三角瓶中,初始pH 5.8,灭菌待用。

2.5.2 氮元素量 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 分别设为0/1、1/0、

2/1、1/2、1/1,共5个处理。以MS为基本液体培养基,设其总氮量为对照、试验组氮源总浓度(包括 NH_4^+ 和 NO_3^-)分别为对照组的1/4、1/2和2倍。

处理方法为首先配制不同总氮量或 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 的MS液体培养基,以50 mL分装于100 mL的三角瓶中,初始pH 5.8,灭菌待用。其他细胞培养过程及条件同“2.4”项下操作。

2.5.3 植物激素配比 植物激素配比方案见表1。首先配制液体MS基本培养基,按处理方案调整其植物激素量,以50 mL分装于100 mL的三角瓶中,初始pH 5.8,灭菌待用。其他细胞培养过程及条件同“2.4”项下操作。

表1 植物激素配比方案

Table 1 Design of plant hormone ratios

水 平	激素浓度 / (mg·L ⁻¹)		
	NAA	BA	2, 4-D
1	0.0	0.0	0.0
2	0.1	5.0	0.1
3	0.5	15.0	0.5
4	2.5	30.0	2.0

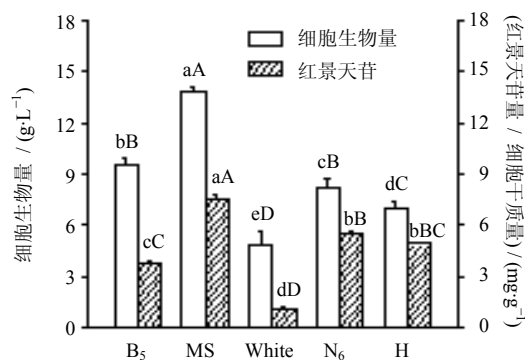
3 结果与分析

3.1 基本培养基筛选

不同种类的基本培养基对细胞的生长和次生代谢产物的形成有很大的影响^[5],因此选择MS、White、H、B₅、N₆ 5种组分差异较大的培养基进行试验,每组每个样品设3个平行。结果见图1。可知,基本培养基的种类对长鞭红景天悬浮细胞生物量有明显的调控作用,且各处理间有一定差异性。方差分析得知MS培养基有利于长鞭红景天悬浮细胞生物量的大幅增加;B₅对细胞生物量的影响也明显强于N₆和H培养基;在White培养基中,细胞生物量最低,且与其他各组差异达到了极显著水平。在红景天苷的生物合成诱导上,各组之间也有差异性。其中MS培养基的作用力最高,与其他各种间差异极显著。其次为H和N₆培养基。最不利于长鞭红景天悬浮细胞生产红景天苷的基本培养基为White培养基。结果表明基本培养基MS较利于长鞭红景天悬浮培养细胞生长及次生代谢物的产生。

3.2 培养基碳源和氮源的优化

培养基的营养成分一方面要满足植物细胞的生物量增长,另一方面要使细胞能合成和积累次生代



a~d 表示在 0.05 水平差异显著 A~D 表示在 0.01 水平差异显著, 下同

a—d-significant difference at 0.05 level

A—D-significant difference at 0.01 level, same as below

图 1 不同类型基本培养基对悬浮培养细胞生长及红景天苷形成的影响

Fig. 1 Effects of various media on growth of suspension-cultured cells and form of salidroside

谢产物。一般来说, 增加培养基的 N、P 和 K 的质量浓度能促进细胞的生长, 而适当增加糖的质量浓度则有利于次生代谢产物的合成^[6]。

3.2.1 碳源优化 在植物细胞培养中, 细胞的生长受培养基中碳源的制约^[7]。碳源的形式和质量浓度对愈伤组织细胞的生长和次生代谢产物的量有明显影响^[8]。一般采用蔗糖、果糖和葡萄糖作为碳源。研究表明, 蔗糖是植物细胞培养中适宜使用的碳源^[7-8]。故本实验选用蔗糖为基本碳源, 考察培养基中初始蔗糖浓度对长鞭红景天细胞生长及次生代谢能力的影响, 结果见图 2、3。

由图 2 可知, 悬浮培养长鞭红景天细胞的生物量随着初始蔗糖质量浓度的增加而增加, 当培养液中蔗糖的初始质量浓度达到 30 g/L 时, 生物量达到

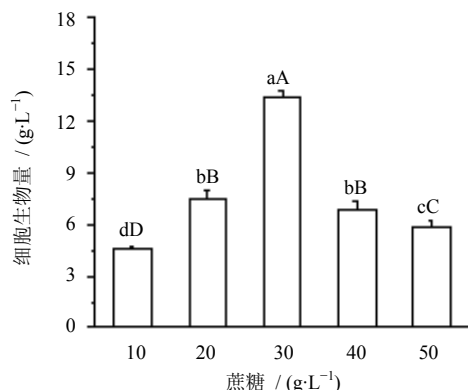


图 2 蔗糖质量浓度对悬浮细胞生物量的影响

Fig. 2 Effects of sucrose concentration on biomass of suspension-cultured cells

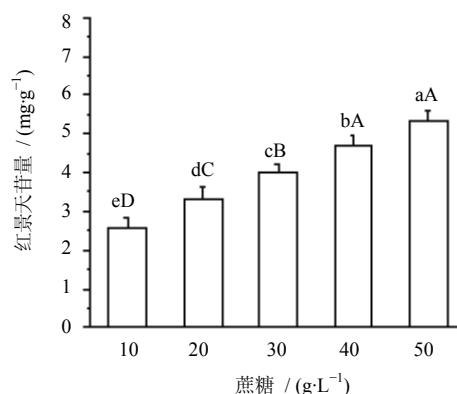


图 3 蔗糖质量浓度对悬浮培养细胞红景天苷累积的影响

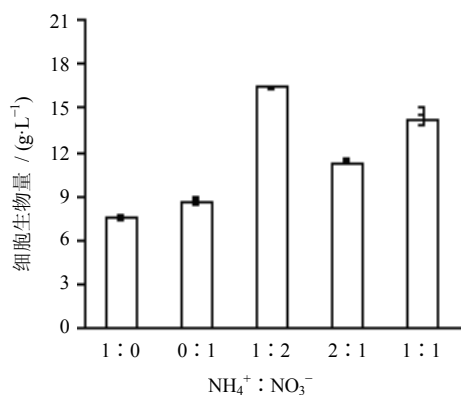
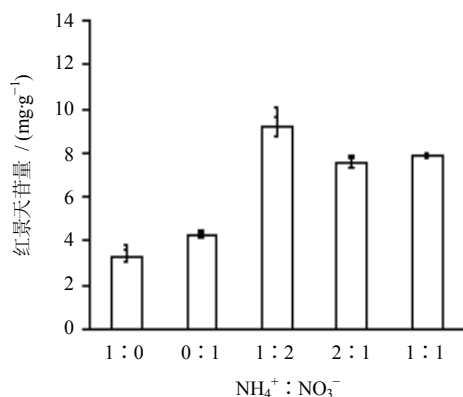
Fig. 3 Effects of sucrose concentration on salidroside accumulation of suspension-cultured cells

最大, 且与其他各处理间差异达极显著水平。进一步增加蔗糖的质量浓度时, 细胞生长开始受到抑制。由此可知, 30 g/L 的蔗糖添加量是维持长鞭红景天细胞大量增殖的最适质量浓度。

由图 3 可知, 悬浮培养的长鞭红景天细胞红景天苷累积量与蔗糖质量浓度成正相关 ($r=0.9985$), 即当蔗糖初始质量浓度增大时, 细胞合成红景天苷的累积量上升, 以 50 mg/L 初始蔗糖质量浓度为最高, 但增长速度开始减缓, 与 40 mg/L 的诱导之间未达到极显著差异。当碳源质量浓度进一步增大时, 外界环境就会对颗粒型愈伤组织的生长产生负面效应, 如渗透压增大, 影响细胞的分化, 细胞失水引发质壁分离现象, 酶钝化失活等。在长鞭红景天悬浮培养细胞的次生代谢产物合成方面, 碳源也能表现出一定的调节作用, 如酶生物合成的诱导作用, 以及分解代谢物的阻遏作用等^[9]。

3.2.2 氮源优化 氮元素不仅是植物细胞的重要组成部分元素, 也是一些次级代谢产物的组成元素, 如生物碱。虽然, 红景天苷中不直接含有 N 元素, 但因其为苯丙氨酸的衍生物, 故氮素供应的形式以及作用质量浓度从理论上讲都可以影响红景天苷的代谢。早期研究表明, 培养基中氮元素量的减少往往刺激次生代谢物产量增加^[10]; 氮源的形式、 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 的比值和量与植物细胞生长和次生代谢累积关系密切^[11]。不同的植物细胞对氮源的要求不同^[12-13]。本实验研究了长鞭红景天细胞悬浮培养的 MS 培养基中 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 的添加量, 以及 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 与细胞生物量 and 生产能力的相关性。结果见图 4、5。

由图 4、5 可知, 在仅含有铵盐或硝酸盐的 MS

图 4 不同 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比值对悬浮培养细胞生物量的影响Fig. 4 Effects of various $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratios on biomass of suspension-cultured cells图 5 不同 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比值对悬浮培养细胞红景天苷累积的影响Fig. 5 Effects of various $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratios on salidroside accumulation of suspension-cultured cells

液体培养基中, 细胞的最大生物量相对最小, 次生代谢产物累积量也最低; 在 NH_4^+ 盐与 NO_3^- 盐混合存在的培养体系中, 对细胞生物量的提高和次生代谢产物红景天苷的累积都有刺激作用, 当 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为 1:2 时, 生长量和红景天苷的量均为最大。

进一步调控培养基中总氮量水平, 分析其对长鞭红景天细胞悬浮培养体系性状的影响, 结果见图 6、7。当 MS 总氮量 (1N) 水平不变 (NH_4NO_3 为 1 650 mg/L, KNO_3 为 1 900 mg/L) 时, 长鞭红景天颗粒型愈伤组织的生物量最大; 当总氮量减少为原量的 1/2 (NH_4NO_3 为 825 mg/L, KNO_3 为 850 mg/L)、1/4 (NH_4NO_3 为 412.5 mg/L, KNO_3 为 425 mg/L), 或增大为原量的 2 倍 (NH_4NO_3 为 3 350 mg/L, KNO_3 为 3 800 mg/L) 时, 细胞生物量反而较原氮素水平低。但是, 在 1/2 水平的总氮量条件下, 能刺激长鞭红景

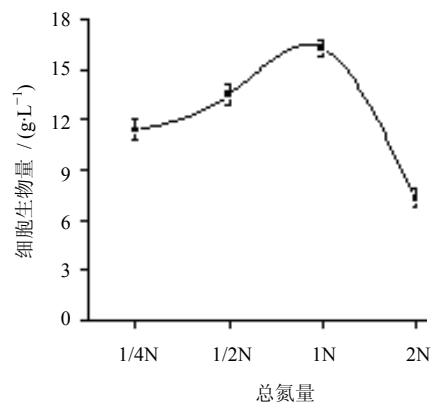


图 6 总氮量对悬浮培养细胞生物量的影响

Fig. 6 Effects of total nitrogen on biomass of suspension-cultured cells

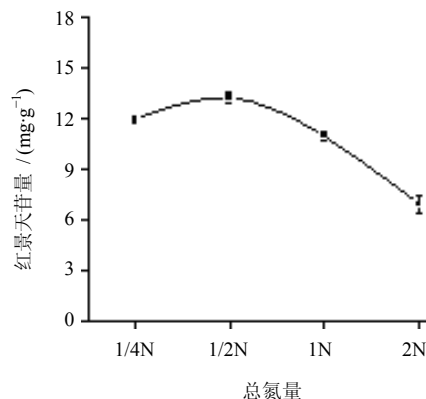


图 7 总氮量对悬浮培养细胞红景天苷累积的影响

Fig. 7 Effects of total nitrogen on salidroside accumulation of suspension-cultured cells

天细胞红景天苷的累积, 然而, 在更低水平 (1/4 N) 或高水平条件下 (2 N) 则未表现出诱导效应。

3.3 激素筛选

本实验考察了常用生长素 NAA、2, 4-D 与 BA 不同组合对长鞭红景天颗粒型愈伤组织悬浮培养体系的影响。结果见图 8。

根据长鞭红景天愈伤组织诱导培养基中 BA 与 NAA 的质量浓度, 先固定 NAA 质量浓度在 0.5 mg/L, 考察外源 BA 质量浓度对颗粒型愈伤组织悬浮培养体系的影响, 结果见图 8-A。

当外源 BA 质量浓度在 5 mg/L 时, 颗粒型愈伤组织的生物量最大, 且低质量浓度条件下, 生物量更高, 随着 BA 质量浓度的进一步增大, 悬浮培养的细胞生长被抑制。但当 BA 质量浓度高达 30 mg/L 时, 细胞生长被明显抑制, 其生物量仅为最高值的 1/2 左右, 同时, 细胞的一些外表特征也发生改变, 高水平 BA 条件下, 组织颗粒小, 由绿色转向褐色,

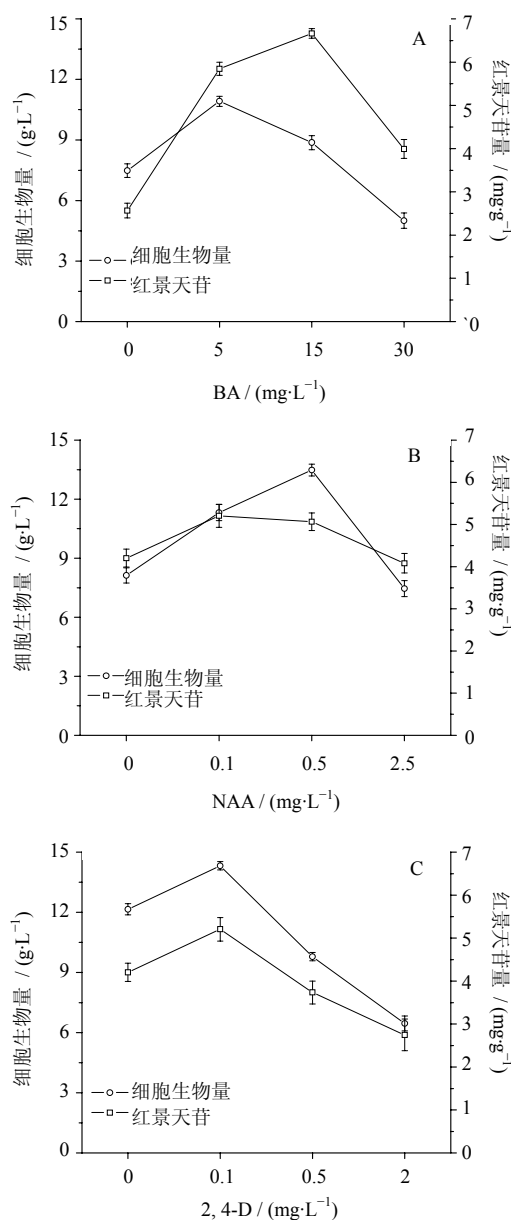


图 8 外源植物激素水平对悬浮培养细胞生长及红景天苷累积的影响

Fig. 8 Effects of phytohormone levels on biomass and salidroside accumulation of suspension-cultured cells

质地紧实。当 BA 质量浓度为 5~15 mg/L 时,有利于红景天苷的累积,但是在未添加 BA 或高质量浓度 BA 环境下对红景天苷的生物合成亦同样表现出抑制作用。这可能是因一定质量浓度的 BA 可促进愈伤组织的形态调控,促进分化,促进其次生代谢。为此,选用 5 mg/L 为最适质量浓度。

在考察外源 NAA 质量浓度的试验中(图 8-B),发现其对长鞭红景天悬浮培养体系颗粒型愈伤组织细胞生长的影响亦表现出“低质量浓度促进,高质

量浓度抑制”的现象。低质量浓度下细胞增殖快,高质量浓度时,因生长素的“双重作用”而产生抑制效应,使得生物量下降。对比 NAA 各质量浓度下的红景天苷量,发现 NAA 为 0.1 mg/L 时,红景天苷量最高,并随着外源 NAA 质量浓度增大而呈现下降的趋势。

当 BA 固定在 5 mg/L 时,悬浮培养体系中细胞的生长速率与高质量浓度的 2, 4-D 呈负相关,即在高质量浓度条件下,不利于细胞干质量的提高。当 2, 4-D 处于低质量浓度范围时,对细胞的增殖效应更明显,其中,以 2, 4-D 为 0.1 mg/L 为最大值。但是,在对红景天苷累积量的考察中发现,添加质量浓度的提高可显著刺激细胞次生代谢产物的合成。

各因素对细胞生长量及红景天苷累积效应的方差分析显示 BA 对红景天生物合成影响效应高于 NAA 和 2, 4-D (表 2、3)。这可能是 BA 在细胞分化阶段的调控作用所致。

综上所述,将长鞭红景天颗粒型愈伤组织悬浮培养体系的植物生长调节剂组合或激素配比设计为 BA 5 mg/L+2, 4-D 0.1 mg/L,可使筛选出的长鞭红景天颗粒型愈伤组织细胞系既有较高水平的生物量,也保持一定的次生代谢产物的合成能力,以便于开展其次生代谢的调控因子研究,以及关键酶性质的研究。

4 讨论

1998 年 Crawford 等^[14]提出 NO_3^- 既可以作为植物生长的营养物质又可以作为氮同化的最初信号,并参与内源信号的调节,如诱导有机酸的代谢,诱导氮代谢关键酶硝酸还原酶基因、亚硝酸还原酶基因,以及胞质谷氨酰胺合成酶基因转录本的变化。所以,在低水平 NO_3^- 培养条件下,不利于 N 素的吸收和转化,从而反馈到细胞的生长和次生代谢产物生物合成水平的提高上。同时,在低水平 NO_3^- 的条件下提高 NH_4^+ 的量,将会导致高质量浓度的 NH_4^+-N 在胞内富积,导致胞内 NH_3 中毒,影响其生物和代谢。Phillips 和 Endress 等^[15-16]相继提出了培养基中磷元素和氮元素量的减少往往可刺激次生代谢产物的产量增加。

在植物细胞培养中,外源植物激素的种类和质量浓度对细胞的生长、分化和次生代谢产物的合成起着十分重要的作用。在外源激素组合中,生长素的影响通常较大^[17]。如不同类型的生长素对次生代谢物的合成有着不同的影响,而且这种影响随着次生代谢产物的种类不同而有很大的变化。

表 2 植物激素水平对悬浮培养细胞生物量影响的方差分析

Table 2 Variance analysis on effects of phytohormone levels on biomass in suspension-cultured cells

处 理	方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
BA	组间	3	55.549 4	18.516 5	18.26**	0.000 6
	组内	8	8.116 5	1.014 6		
	总计	11	63.665 9			
NAA	组间	3	71.513 6	23.837 9	66.13**	<0.000 1
	组内	8	2.883 7	0.360 5		
	总计	11	74.397 3			
2, 4-D	组间	3	102.190 3	34.063 4	70.41**	<0.000 1
	组内	8	3.870 3	0.483 8		
	总计	11	106.060 6			

表 3 植物激素水平对悬浮培养细胞红景天苷累积效应的方差分析

Table 3 Variance analysis on effects of phytohormone levels on salidroside accumulation in suspension-cultured cells

处理	方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
BA	组间	3	21.490 9	7.163 6	25.07	0.000 2
	组内	8	2.286 4	0.285 8		
	总计	11	23.777 3			
NAA	组间	3	3.022 3	1.007 4	4.87	0.032 7
	组内	8	1.655 8	0.206 9		
	总计	11	4.678 1			
2, 4-D	组间	3	9.408 9	3.136 3	15.66	0.001 0
	组内	8	1.602 5	0.200 3		
	总计	11	11.011 4			

Teyssendier dela serve B^[18]指出,生长素的作用是使细胞脱分化、抑制细胞的衰老进程,并使大量的原生代谢产物用于次生代谢物质的生产中。Endress^[16]指出细胞分裂素能导致植物组织培养细胞的生理年龄差异,引起细胞间化学梯度,刺激次生代谢物质的积累。其作用机制是能捕获细胞内自由基或降低细胞内自由基的水平,保证细胞膜的完整性,间接地影响重要氨基酸的运输。细胞分裂素的复壮作用,可以使 RNA 酶和蛋白酶失活,并促进蛋白质的生物合成,同时也影响到某些特定酶的表达^[19-20]。

建立良好的细胞悬浮培养体系是进行大规模细胞培养的的必要准备。单因素变化法考察了基本培养基、初始蔗糖质量浓度、氮源质量浓度及氮源组成等对长鞭红景天悬浮培养细胞体系的生物量和红景天苷合成能力的影响。确定了 MS 为长鞭红景天细胞悬浮培养体系生长及生产的基本培养基。碳源质量浓度方面,利于颗粒型愈伤组织生物量增加的蔗糖质量浓度以 30% 为最优,而对于红景天苷的累积

而言,则可在较高质量浓度条件下得到诱导表达。

当 MS 总氮质量浓度维持原水平时,颗粒型愈伤组织生物量相对最高,但是有利于红景天苷生物累积的总氮水平则为原 MS 的 1/2。在氮素形式上,颗粒型愈伤组织生长和生产都要求 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为 1:2 时可达到最高水平。

有研究表明外源 2, 4-D 有利于愈伤组织的诱导^[21],但在对次生代谢物的合成上往往有抑制作用^[17]。如司徒琳莉等^[22]在东北红豆杉细胞培养研究中表明,培养基添加一定质量浓度的 2, 4-D 可以显著提高细胞的生长速率,增加生物量,另添适当质量浓度的 BA 和 KT 则可以提高紫杉醇的积累。植物激素水平对颗粒型愈伤组织生长和红景天苷的合成影响效应存有差异,方差分析得知,BA 对红景天苷的累积效应较 NAA 和 2, 4-D 更强,而在生物量的累积方面则以 2, 4-D 的效果明显。

长鞭红景天悬浮细胞培养体系的建立,为进一步进行高产细胞株选育、次生代谢途径及逆境因子

研究奠定了基础,同时为利用生物工程技术获取药用植物的有效成分,缓解天然资源压力提供新的研究思路。

参考文献

- [1] Darbinyan V, Aslanyan G, Amroyan E, *et al.* Clinical trial of *Rhodiola rosea* L. extract SHR-5 in the treatment of mild to moderate depression [J]. *Nord J Psychiatr*, 2007 (61): 343-348.
- [2] Mattioli L, Funari C, Perfumi M. Effects of *Rhodiola rosea* L. extract on behavioural and physiological alterations induced by chronic mild stress in female rats [J]. *J Psychopharmacol*, 2009, 23: 130-142.
- [3] Wiegant F A C, Surinova S, Ytsma E, *et al.* Plant adaptogens increase lifespan and stress resistance in *C. elegans* [J]. *Biogerontology*, 2009, 10: 27-42.
- [4] Shih-Shen C L, Lengsu W C, Pei-Chun C, *et al.* *In vivo* Th1 and Th2 cytokine modulation effects of *Rhodiola rosea* standardised solution and its major constituent, salidroside [J]. *Phytother Res*, 2011, 25: 1604-1611.
- [5] Fujita Y, Hara Y, Suga C, *et al.* Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Plant Cell Rep*, 1981(1): 61-63.
- [6] 谢从华, 柳俊. 植物细胞工程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [7] Aloni R. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures [J]. *Plants*, 1980, 150: 255-263.
- [8] Smith B G, Rubery P H. Modifications of wound-induced changes in phenylalanine ammonia lyase activity in potato tuber tissue [J]. *Plant Sci Lett*, 1979, 15(1): 29-33.
- [9] 郭勇, 崔堂兵, 谢秀桢. 植物细胞培养技术与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [10] Knobloch K H, Berlin J. Influence of phosphate on the formation of the indole alkaloid and phenolic compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, I. Comparison of enzyme activities and product accumulation [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1983(2): 333.
- [11] Lindsey K, Yeoman M M. Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures [A]. Mantell S H, Smith H. *Plant Biotechnology* [M]. London: Cambridge University Press, 1983.
- [12] 许明淑, 黄璐琦, 付梅红, 等. 几种理化因子对贯叶金丝桃细胞培养中的细胞生长和总金丝桃素合成的影响研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(10): 921-923.
- [13] 陈永勤, 朱蔚华, 吴蕴祺, 等. 不同种类红豆杉愈伤组织的诱导及紫杉醇量的差异 [J]. 中草药, 2000, 31(3): 216-218.
- [14] Crawford N M, Glass A D M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 1998, 3(10): 389-395.
- [15] Phillips R, Henshaw G G. The regulation of synthesis of phenolics in stationary phase cell cultures of *Acer pseudoplatanus* L. [J]. *J Exp Bot*, 1977, 28: 785.
- [16] Endress R. *Plant Cell Biotechnology* [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1994.
- [17] Marion-Poll A, Caboche M. Relationship between auxin and amino acid metabolism of tobacco protoplast-derived cells [J]. *Plant Physiol*, 1984(75): 1048-1053.
- [18] Teyssendier dela serve B, Axelos M, Peaud-Lenoel C. Cytokinins modulate the expression of genes encoding the protein of the light-harvesting chlorophylla $\alpha\beta$ complex [J]. *Plant Mol Biol*, 1985(5): 155-163.
- [19] Xiong Y, Li W M, Wang S F, *et al.* Promotino of the expression of rbcS gene by cytokinins on both the mRNA and the protein level [J]. *Acta Sci Nat Univ Nank*, 2003, 36(3): 97-102.
- [20] Bhojwani S S, Razdan M K. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition* [M]. Amsterdam: Elsevier, 1996.
- [21] 司徒琳莉, 李振山. 培养基成分对东北红豆杉细胞生长和紫杉醇产量的影响 [J]. 遗传, 2001, 23(4): 325-328.