

红花悬浮细胞体系的建立及其化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 分析

郭丹丹, 刘 飞, 涂燕华, 高 越*, 郭美丽*

第二军医大学药学院, 上海 200433

摘要: 目的 构建红花悬浮细胞体系, 为进一步研究红花的功能基因搭建平台。方法 用红花无菌子叶作为外植体进行愈伤组织培养, 选择淡黄色、质地疏松、增殖速度快的愈伤组织为材料进行悬浮培养, 考察激素浓度、愈伤起始接种量、pH 值、细胞活力对红花悬浮细胞体系的影响以及不同浓度茉莉酸甲酯 (MeJA) 刺激对悬浮细胞生长曲线的变化。采用 UPLC-Q-TOF/MS 法对红花悬浮细胞培养体系进行初步化学成分分析。结果 红花悬浮细胞培养的最适宜配方是 MS+1.0 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA, 最适宜 pH 值为 5.5~6.0, 最适宜接种量为 0.02 g/mL 培养体系; 不同浓度的 MeJA 刺激对细胞增殖率影响较大, 50 μ mol/L MeJA 能提高悬浮细胞增殖率, 500 μ mol/L MeJA 能对细胞增殖则有明显的抑制作用。从红花悬浮细胞培养体系中初步鉴定出 13 种化合物。结论 利用红花子叶能建立较好的悬浮细胞培养体系, 适宜浓度的 MeJA 刺激可提高悬浮细胞增殖率。

关键词: 红花; 悬浮细胞; 生长曲线; 茉莉酸甲酯; UPLC-Q-TOF/MS

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)24-4439-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.24.024

Establishment of cell suspension culture system of *Carthamus tinctorius* and analysis of compounds by UPLC-Q-TOF/MS

GUO Dan-dan, LIU Fei, TU Yan-hua, GAO Yue, GUO Mei-li

Department of Pharmacognosy, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: Objective To study the establishment of cell suspension culture system and build a platform for exploring the functional genes in the biosynthesis pathway for *Carthamus tinctorius*. **Methods** Using the cotyledon of *C. tinctorius* as explants for callus induction, callus with good quality was selected for suspension cultivation. The factors influencing the establishment of *C. tinctorius* cell suspension culture system were investigated, such as hormone, inoculum amount, pH, and cell activity. The effect of MeJA at different concentration on suspension cell growth rate was studied. Chemical compounds in suspension cell system were preliminary identified by UPLC-Q-TOF/MS. **Results** The optimal medium for the cell suspension culture was MS + 1.0 mg/LTDZ + 0.1 mg/L NAA, the pH was 5.5—6.0, and inoculum amount was 0.02 g/mL. MeJA at different concentration had effects on suspension cell growth rate: 50 μ mol/L MeJA increased cell growth rate, 500 μ mol/L MeJA depressed cell growth rate greatly. Thirteen potential chemical compounds in suspension cell system were preliminary identified. **Conclusion** The cell suspension culture system of *C. tinctorius* is established, and MeJA with optimal concentration has effects on suspension cell growth rate.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; suspension cell; growth curve; MeJA; UPLC-Q-TOF/MS

红花 *Carthamus tinctorius* L. 为菊科草本植物。由于其种子含油率高且油中富含不饱和脂肪酸使得红花成为一类重要的油料作物^[1]。在传统的本草研究中红花还是一类非常有价值的药用植物, 其干燥管状花具有活血通经、散瘀止痛之功效, 是预防和治疗心脑血管疾病的重要中药^[2-5]。花中的黄酮类成分如羟基红花黄色素 A (hydroxy safflor yellow A)、红花胺 (tinctormine)、红花红色素 (carthamin) 等

是发挥药理作用的主要活性成分^[5-7], 但这些活性成分的生物合成机制不明确, 量也很低。因此, 建立红花的细胞悬浮体系、探索其生源合成途径进而利用细胞工程技术生产红花的有效成分, 日益受到人们的关注。

作为植物学研究中的一种精化的模式系统, 植物悬浮细胞因具有材料均一、细胞数量大、增殖速度快、易于控制且不会发生恶性变异^[8]等优点, 成

收稿日期: 2016-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81173484, 81473300); 国家“863”项目 (2008AA02Z137); 上海市自然科学基金资助项目 (13ZR1448200)

作者简介: 郭丹丹 (1991—), 女, 硕士在读, 研究方向为药用植物代谢工程。Tel: (021)81871312 E-mail: gdd19910810@163.com

*通信作者 高 越 E-mail: gaoyue2000@hotmail.com

郭美丽 E-mail: mlguo@126.com

为广泛使用的实验材料^[9], 在研究细胞以及分子生物学过程中有着巨大的优势。植物悬浮细胞常用于研究次生代谢产物、遗传转化、原生质体的分离与融合等研究^[10-11], 而且在体外去分化的植物细胞悬浮体系非常有利于利用生物反应容器大规模地生产需要的产物。不同的植物种类, 其愈伤组织和悬浮细胞生长条件都不同^[12]。

茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 作为一种诱导子常用于刺激悬浮细胞产生相应的化合物, 目前已经用于多种植物的悬浮细胞体系研究中, 如石蒜、紫茉莉、苍术、白桦、白木香等^[13-17], 用于研究相应代谢成分变化或者基因表达变化^[18-21]。研究结果表明, MeJA 刺激可以提高悬浮细胞的次生代谢产物量, 高浓度的 MeJA 会抑制细胞的生长, 甚至引起褐化死亡, 低浓度的 MeJA 对悬浮细胞的生物量影响有差异, 在贯叶连翘、怀槐、甘草、肉苁蓉、黄芩等中已有报道^[22-31]。虽然植物悬浮细胞的研究报道已经很多, 但有关红花的悬浮细胞研究至今少有报道。本研究以红花无菌子叶为外植体, 从细胞形态、培养基 pH 值、细胞接种量等方面研究红花悬浮细胞培养条件以及 MeJA 刺激对红花悬浮细胞生长的影响, 为红花悬浮细胞体系的应用提供技术支撑。

1 材料和仪器试剂

红花 *Carthamus tinctorius* L. 来自第二军医大学药用植物园, 由第二军医大学郭美丽教授鉴定。基础培养基、蔗糖、植物琼脂购自北京索莱宝公司, MeJA、植物激素 *N*-苯基-*N'*-1,2,3-噁二唑-5-基脒 (TDZ)、萘乙酸 (NAA) 购自 Sigma 公司, BD-PGX-250C 智能光照培养箱购自南京贝帝实验仪器有限公司, 光照摇床购自安竟公司, Leica DFC500 荧光显微镜, 安捷伦 G6538 四极杆-飞行时间串联质谱仪 (QTOF), 安捷伦 1290 超高效液相色谱仪。

2 方法

2.1 红花无菌愈伤组织的获得

按照薛英茹等^[32]的方法诱导培养红花愈伤组织。从 -80 °C 取饱满无皱缩的种子, 用自来水冲洗后放入灭菌培养瓶中, 75% 乙醇处理 30 s, 无菌水冲洗 2 次, 5 min/次, 加入 0.1% HgCl₂, 均匀摇晃 25 min, 无菌水冲洗 4~5 次, 5 min/次, 镊子取出置于无菌滤纸上, 吸干水分, 接种到高压灭菌 MS 固体培养基上, 每瓶 5~6 粒。4 °C 放置 48 h 春化后, 于组培箱中培养 [(25±2) °C, 16 h 光照, 8 h 黑暗, 光照强度 8 800 lx], 培养约 10 d 即可获得无

菌子叶。将无菌子叶切成约 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 无菌刀片在叶表面划线, 接种于 MS+1 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 8 g/L 培养基上, 光照条件同上。继代培养 4~6 次后, 选取淡黄色、疏松的愈伤组织用于红花悬浮细胞的培养^[33]。

2.2 红花悬浮细胞系的建立

选取质地疏松、分散性好、胚性好的愈伤组织接种到液体培养基中 (MS+愈伤组织继代培养的激素最佳浓度配方)。25 °C 培养, 光照摇床转速为 100 r/min。起初 3 d 继代 1 次, 继代 5 次后每隔 7 d 继代 1 次, 愈伤组织成团块并大量繁殖后, 悬浮液用 50 目金属细胞筛过滤, 收集滤液补充新鲜培养液进行培养。培养过程中采用 Leica DFC500 荧光显微镜观察悬浮细胞生长情况, 并显微摄影。不同处理组重复 3 次。

2.2.1 植物激素配比 以 MS 为基本培养基, 本课题组对红花愈伤组织的激素配比做过系统的优化分析, 最终得出 MS+TDZ+NAA 的浓度配比是最适宜红花胚性细胞生长的条件。

2.2.2 培养基 pH 值 50 mL 体系培养基, 用 NaOH/HCl 调节培养基的 pH 值, 2、3、4、5、5.5、6、7、8、9、10, 愈伤组织接种量为 1.0 g, 置于光照摇床中培养。观察胚性组织成长状况。

2.2.3 愈伤组织接种量 取愈伤组织 0.5、1.0、2.0、3.0 g 接种在 50 mL 体系液体培养基上。待细胞达到指数增长期时, 采用 TTC 法检测各处理组的细胞活力及生长状况。

2.3 悬浮细胞生长的测定

将稳定的红花悬浮细胞培养物真空抽滤, 每隔 6 d 取样 1 次, 滤出愈伤组织, 再用去离子水洗涤 2~3 次, 滤纸吸干表面水分。将细胞培养物置于 60 °C 烘箱中烘 3 h, 40 °C 干燥至恒定质量, 冷却称质量为干质量, 重复 3 次。

增长率=(不同生长时间干质量-初始干质量)/初始干质量

2.4 TTC 测定细胞活力

2.4.1 TTC 标准曲线的制作^[34] 取 0.4% TTC 溶液 0.2 mL 放入 10 mL 量瓶中, 加少许 Na₂S₂O₄ 粉, 摇匀后溶液立即产生红色的 MTT formazan, 用 95% 乙醇定容至刻度, 摇匀。然后分别取 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用 95% 乙醇定容, 即可得到含 MTT formazan 25、50、100、150、200 μg 的标准比色系列。以 95% 乙醇为参比, 在 485 nm 波长下测定吸光度, 绘制标准曲线。

2.4.2 悬浮细胞活力的测定 取 1 g 真空抽滤的悬

浮细胞,去离子水洗涤 2~3 次,滤纸吸干表面水分,放入 50 mL 锥形瓶中,加入 5 mL 0.4% TTC 和 5 mL 磷酸缓冲液,空白组加入 2 mL H_2SO_4 后加入 TTC 和磷酸缓冲液,摇匀后,37 °C 暗孵育 2 h,实验组样品加入 2 mL H_2SO_4 终止反应,真空抽滤,去离子水清洗 3 次,取出细胞加入 5 mL 95%乙醇,置于 60 °C 避光摇床振荡,转速为 50 r/min 取上清,在 485 nm 波长下测定吸光度。

2.5 MeJA 对红花悬浮细胞生长增殖率的影响

2.5.1 MeJA 的配制 自 Sigma 购置 100 mmol/L MeJA 溶液置于 4 °C,用乙醇稀释成 50、500、5 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度现配现用。

2.5.2 MeJA 对悬浮体系生长率的影响 将稳定的悬浮细胞体系以合适的接种量转移到新的液体培养瓶中进行继代时,加入稀释好的 MeJA,使终浓度分别为 50、500、5 000 $\mu\text{mol/L}$,封上封口膜,置于光照培养箱中培养。生长增殖率计算同“2.3”项。

2.6 悬浮细胞培养体系化学成分初步鉴定

2.6.1 悬浮细胞样品制备 取真空抽滤的新鲜悬浮细胞,称质量,加入 1/5 体积的 70%甲醇,150 W 超声提取 6 min,再以 1:1 体积加入上述新鲜细胞的滤液,6 000 r/min 离心 10 min,取上清,微孔滤膜过滤即为待测样品。

2.6.2 UPLC-QTOF/MS 检测悬浮细胞体系化学成分

(1) 色谱条件: Agilent 1290 高效液相色谱仪,色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm),柱温 40 °C,二极管阵列检测器,进样量为 4 μL ,梯度洗脱,流动相为 0.1%甲酸水(A)-0.1%乙腈(B),0~2 min,95% A; 13~15 min,5% A; 体积流量 0.4 mL/min。

(2) 质谱条件: 质谱离子化方式: 电喷雾离子化(ESI); 在正负离子模式下分别采集数据。质谱全长扫描范围 m/z 100~2 000。离子源参数: 毛细管电压 4 000 V,雾化气压力 310.2 kPa (45 psi),干燥器体积流量 11 L/min (温度 350 °C),碎片电压 120 V。每天实验前 TOF/MS 通过参比溶液的实时注入实现自动校正质量坐标轴,参比液体积流量为 100 $\mu\text{L/min}$,正离子模式下的参比离子包括 121.050 9、922.009 8。数据采集和处理使用 Agilent Mass Hunter Workstation 软件。

2.7 数据处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用 SPSS 21 软件处理。

3 结果与分析

3.1 不同激素质量浓度对红花悬浮细胞的影响

以 MS 作为基础培养基,比较了 NAA、2,4-D、TDZ 3 种激素及其不同的浓度组合,结果表明 MS+1 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA 优于其他的激素组合,能促进红花悬浮细胞的快速增殖。TDZ 浓度过高,会使愈伤组织快速成团,培养基营养物质消耗过快,影响细胞的增殖。

3.2 不同 pH 值对红花悬浮细胞的影响

pH 值对植物细胞体内的稳态环境起着重要的调节作用,并且影响着细胞的增殖和形态特征。pH 值在 2.0~10.0 有明显的变化,pH 值过低或过高都会抑制细胞的生长分裂。在 pH 值 6.0 左右时,红花悬浮细胞形状及增殖状态最为适宜。结果见表 1。

表 1 不同 pH 对红花悬浮细胞的影响

Table 1 Influence of different pH of safflower suspension cells

pH 值	细胞形态	细胞增长率/%
2.0	培养基浑浊,细胞少	112.64 $\pm$ 16.29
3.0	培养基浑浊,细胞少	156.67 $\pm$ 10.83
4.0	培养基较浑浊,细胞少	166.61 $\pm$ 12.52
5.0	培养基较清,细胞多	190.99 $\pm$ 5.60
5.5	培养基清,细胞多	234.79 $\pm$ 5.43
6.0	培养基清,细胞较多	236.88 $\pm$ 6.89
7.0	培养基较清,细胞少	196.13 $\pm$ 8.61
8.0	培养基较浊,细胞少	170.71 $\pm$ 10.40
9.0	培养基浑浊,细胞少	136.07 $\pm$ 9.75
10.0	培养基浑浊,细胞少	106.11 $\pm$ 13.26

3.3 不同接种量对红花悬浮细胞的影响

植物悬浮细胞生长需要适宜的起始密度,接种量过小时,细胞分裂缓慢,容易发生细胞自溶现象,而接种量过大时,胚性细胞容易成团成长,难以形成均匀分散的细胞系。只有当接种量大于起始密度时,细胞才会呈现明显的增殖生长。当红花悬浮细胞接种量为 0.02 g/mL 时(表 2),细胞在指数增长期(第 12 天)增长率最大,且细胞活力最强。随着接种量的增加,细胞活力和增长率都有所下降。

3.4 红花悬浮细胞生长曲线

选取继代 5 次且生长旺盛、组织疏松的胚性愈

表 2 不同接种量对红花悬浮细胞的影响

Table 2 Influence of different inoculation quantity of safflower suspension cells

接种量/(g $\cdot$ mL $^{-1}$)	增长率/%	细胞活力/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
0.01	176.40 $\pm$ 9.45	101.83 $\pm$ 6.03
0.02	233.73 $\pm$ 11.41	163.08 $\pm$ 9.50
0.04	161.30 $\pm$ 8.64	62.63 $\pm$ 7.00
0.06	144.82 $\pm$ 9.81	35.61 $\pm$ 1.96

伤组织, 夹碎后接入 MS + 1.0 mg/mL TDZ + 0.1 mg/mL NAA 的液体培养基中, 进行悬浮培养及细胞生长曲线的绘制。细胞刚开始密度很低 (图 1-A), 第 6 天 (图 1-B) 各种形状的胚性细胞开始增殖, 到第 12~18 天 (图 1-C、D), 悬浮细胞大量存在, 形成稳定的悬浮细胞系。红花悬浮细胞生长曲线如图 2 所示。由图 2 所示, 红花悬浮细胞的生长量类似“S”型, 细胞在生长的第 12 天进入指数增长期, 细胞增殖迅速, 18 d 前后处于平台期。

3.5 MeJA 对红花悬浮细胞生长曲线的影响

50 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 诱导的红花悬浮细胞呈现出

和未诱导条件下近似的生长趋势, 而且增加了红花悬浮细胞的增殖率, 增加趋势不明显。500 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 抑制了悬浮细胞的增殖, 如图 2 所示。

3.6 红花悬浮细胞体系化合物成分的积累

在 UPLC-QTOF/MS 分析工作站中, 本实验建立了红花的化合物数据库, 基于红花悬浮细胞体系中化合物的一级质谱数据特征, 经分子式匹配, 对体系中的特征组分进行分子峰提取, 进而对化合物进行推测, 从总离子流图中可见, 13 个可能存在的特征化合物被标记, 结果见图 3 和表 3。

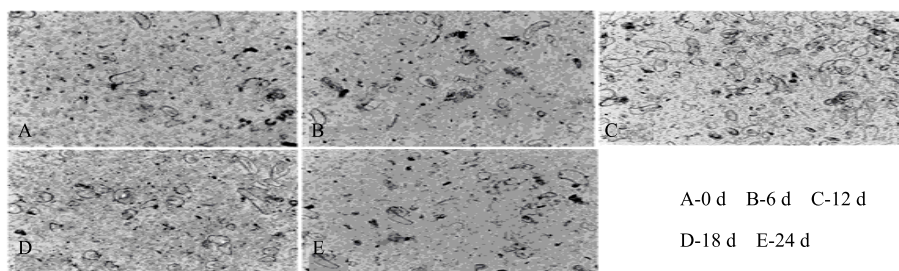


图 1 显微镜下观察到的红花悬浮细胞图

Fig. 1 Micrograph of suspension cells for growth cycle

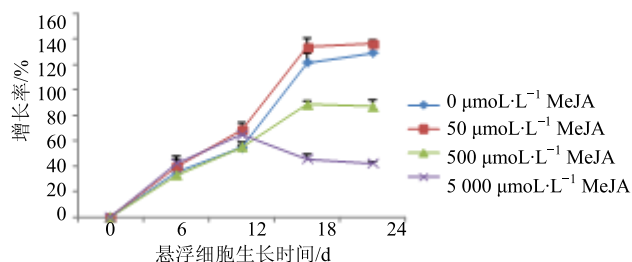


图 2 MeJA 诱导的红花悬浮细胞生长曲线

Fig. 2 Effect of MeJA at different concentration on growth curves of suspension cells

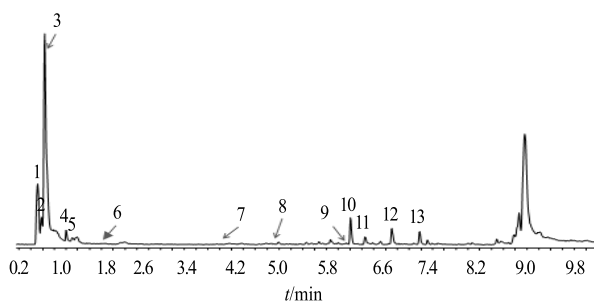


图 3 红花悬浮细胞 UPLC-QTOF/MS 总离子流图

Fig. 3 UPLC-QTOF/MS-positive-ion for suspension cells of *C. tinctorius*

表 3 红花悬浮细胞体系中推测的化学成分

Table 3 Predicted compounds for suspension cell system of *C. tinctorius*

峰号	化合物	响应时间/min	<i>m/z</i>
1	芹菜素	0.485	270.05
2	β -谷甾醇	0.518	414.39
3	柚皮素	0.624	272.07
4	<i>N</i> -[2-[3-[2-(<i>p</i> -coumaramide) ethyl]-5,5'-dihydroxy-4,4'-bi-1 <i>H</i> -indol-3-yl]-ethyl] ferulamide	1.007	514.20
5	4-羟基肉桂酸	1.039	164.05
6	对羟基苯甲酰香豆酸酐	1.781	284.07
7	阿魏酸	3.779	194.06
8	山柰酚/6-羟基芹菜素/木犀草素	4.586	286.05
9	cartormin	5.751	575.16
10	红花胺	5.833	593.17
11	山柰酚-3- <i>O</i> - β -槐糖苷/芦丁/6-羟基山柰酚-3- <i>O</i> - β -芸香糖苷	6.126	610.15
12	异鼠李素-3- <i>O</i> -芸香糖苷	6.518	624.17
13	硬脂酸	6.999	284.27

4 讨论

本研究用红花无菌子叶作为外植体进行悬浮培养,通过考察激素浓度、愈伤组织起始接种量、pH值对红花悬浮细胞体系的影响,建立了较好的红花悬浮细胞培养体系。

本研究中红花悬浮细胞的生长曲线早期生长缓慢,在第12天进入指数增长期,在第18天前后处于平台期。50 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 诱导后,细胞增殖率有所上升,高浓度刺激后则抑制细胞增长,这与文献报道研究结果一致^[22,24,26,28]。经 UPLC-QTOF/MS 分析,发现红花悬浮细胞体系中可能存在红花花冠中的部分化合物,但尚有一些化合物没有检测到。红花悬浮细胞的培养条件有待进一步探索,其悬浮细胞体系的建立将为红花的基因工程和次生代谢产物的生源合成途径研究提供重要平台。

参考文献

- [1] Gecgel U, Demirci M, Esendal E, *et al.* Fatty acid composition of the oil from developing seeds of different varieties of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. *J Amer Oil Chem Soc*, 2007, 84(1): 47-54.
- [2] Koyama N, Kuribayashi K, Seki T, *et al.* Serotonin derivatives, major safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed antioxidants, inhibit low-density lipoprotein (LDL) oxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient Mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(14): 4970-4976.
- [3] Tian Y, Yang Z F, Li Y, *et al.* Pharmacokinetic comparisons of hydroxysafflower yellow A in normal and blood stasis syndrome rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 129(1): 1-4.
- [4] Asgarpanah J, Kazemivash N. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19(2): 153-159.
- [5] Sun L, Yang L, Fu Y, *et al.* Capacity of HSYA to inhibit nitrotyrosine formation induced by focal ischemic brain injury [J]. *Nitric Oxide*, 2013, 35(6): 144-151.
- [6] Feng Z M, He J, Jiang J S, *et al.* NMR solution structure study of the representative component hydroxysafflower yellow A and other quinochalcone C-glycosides from *Carthamus tinctorius* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(2): 270-274.
- [7] Wang C, Huang Q, Zhu X, *et al.* Hydroxysafflower yellow A suppresses oleic acid-induced acute lung injury via protein kinase A [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272(3): 895-904.
- [8] 罗建平, 郑光植. 人参培养细胞单细胞克隆的条件培养 [J]. 生物工程学报, 1995, 11(1): 58-62.
- [9] Ogawa Y, Dansako T, Yano K, *et al.* Efficient and high-throughput vector construction and agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells for functional genomics [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(2): 242-250.
- [10] Fukuda H, Ito M, Sugiyama M, *et al.* Mechanisms of the proliferation and differentiation of plant cells in cell suspension systems [J]. *Int J Dev Biol*, 1994, 38(2): 287-299.
- [11] Meyer A J, Fricker M D. Control of demand-driven biosynthesis of glutathione in green *Arabidopsis* suspension culture cells [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(4): 1927-1937.
- [12] Moscatiello R, Baldan B, Nanazio L. Plant cell suspension cultures [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 953: 77-93.
- [13] 张玉琼, 陈娜, 周建辉, 等. 石蒜悬浮细胞系的建立及其生物碱累积的研究 [J]. 中草药, 2013, 44(24): 3540-3545.
- [14] 赵倩, 林景卫, 冯雅萍, 等. 紫茉莉悬浮细胞培养体系的建立 [J]. 热带亚热带植物学报, 2013, 21(5): 453-458.
- [15] Kathryn K, Janet C, Roger L. The establishment of cell suspension culture of gladiolus that regenerate plants [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990, 26: 425-430.
- [16] 常志凯, 朱珠, 董恒, 等. 茉莉酸甲酯结合高温胁迫对白桦悬浮细胞三萜合成的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2333-2340.
- [17] Liu J, Han X M, Liang L, *et al.* Establishment of a cell suspension culture system of endangered *Aquilaria sinensis* (Lour. Gilg) [J]. *Acta Pharm Sin*, 2014, 49(8): 1194-1199.
- [18] 王和勇, 罗恒, 孙敏. 诱导子在药用植物细胞培养中的应用 [J]. 中草药, 2004, 35(8): 959-963.
- [19] Suzuki H, Reddy M S, Naoumkina M, *et al.* Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula* [J]. *Planta*, 2005, 220(5): 696-707.
- [20] Naoumkina M, Farag M A, Sumner L W, *et al.* Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(46): 17909-17915.
- [21] 韩娟, 杨艳, 祝传书, 等. 茉莉酸甲酯处理雷公藤悬浮细胞的基因差异表达分析 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(12): 2398-2404.
- [22] 王保军, 张秀清, 孙立伟, 等. 茉莉酸甲酯 (MeJA) 对

- 贯叶连翘悬浮细胞生长和贯叶金丝桃素产量的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(4): 669-672.
- [23] 罗建平, 夏 宁, 沈国栋. 茉莉酸甲酯、水杨酸和一氧化氮诱导怀槐悬浮细胞合成异黄酮及细胞结构变化 [J]. 分子细胞生物学报, 2006, 39(5): 438-442.
- [24] 杨 英, 郑 辉, 李 赞, 等. 茉莉酸甲酯与二氢茉莉酮酸甲酯对悬浮培养的甘草细胞生长和黄酮积累的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(5): 903-906.
- [25] 徐亮胜, 薛晓锋, 付春祥, 等. 茉莉酸甲酯与水杨酸对肉苁蓉悬浮细胞中苯乙醇甙合成的影响 [J]. 生物工程学, 2005, 21(3): 402-406.
- [26] 龙小凤, 郑丽屏, 赵培飞, 等. 葡萄细胞悬浮培养生产白藜芦醇 [J]. 生物加工过程, 2013, 11(5): 16-20.
- [27] 曹英杰, 贾景明. 一氧化氮、茉莉酸甲酯与水杨酸对肉苁蓉悬浮细胞生长及苯乙醇甙生物合成的影响 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(14): 1069-1073.
- [28] 张进杰, 徐茂军. NO 和茉莉酸甲酯对黄芩悬浮细胞生长及黄芩甙合成的影响 [J]. 植物学通报, 2006, 23(4): 374-379. .
- [29] Jacinda T J, Fidele T, Paul A, *et al.* Metabolomic analysis of methyl jasmonate-induced triterpenoid production in the medicinal herb *Centella asiatica* (L.) Urban [J]. *Molecules*, 2013, 18(4): 4267-4281.
- [30] Rohan A P, Sangram K L, Jennifer N, *et al.* Methyl jasmonate represses growth and affects cell cycle progression in cultured *Taxus* cells [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(9): 1479-1492.
- [31] Fan X, Hu G S, Li N, *et al.* Effects of lovastatin, clomazone and methyl jasmonate treatment on the accumulation of purpurin and mollugin in cell suspension cultures of *Rubia cordifolia* [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(4): 396-400.
- [32] 薛英茹, 李东巧, 高 越, 等. 基于植物调节剂苯乙酸和 6-苄氨基嘌呤组合的红花组织培养体系的优化 [J]. 药学服务与研究, 2015, 15(2): 91-94.
- [33] Shilpa K S, Kumar V D, Sujatha M. Agrobacterium-mediated genetic transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2010, 103: 387-401.
- [34] 李建安, 胡芳名, 谭晓风. 拟南芥悬浮细胞及其愈伤组织对潮霉素的反应 [J]. 中南林学院学报, 2006, 26(3): 42-46.