

石蒜悬浮细胞系的建立及其生物碱累积的研究

张玉琼¹, 陈娜¹, 周建辉¹, 董召荣^{2*}, 李勇¹, 王梅方¹, 高翠云¹

1. 安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036

2. 安徽农业大学农学院, 安徽 合肥 230036

摘要: 目的 研究由石蒜愈伤组织建立细胞悬浮培养体系的条件及其生物碱的累积。方法 以石蒜鳞茎为外植体进行愈伤组织的诱导, 筛选出优质的愈伤组织进行悬浮培养, 考察了激素、接种量、肌醇和条件培养对石蒜悬浮细胞系建立的影响, 并利用 HPLC 检测石蒜悬浮细胞和培养基中生物碱的量。结果 石蒜悬浮细胞系培养的最佳条件为: MS 为基本液体培养基, 添加 2, 4-D 0.5 mg/L + KT 0.1 mg/L, 肌醇 300 mg/L, 接种量 15%; 对数期的培养基能明显缩短细胞系生长的延迟期; 细胞系和培养基中加兰他敏分别是石蒜鳞茎中的 4.18 和 0.69 倍。结论 利用石蒜愈伤组织建立了较好的细胞悬浮培养体系, 且石蒜悬浮细胞系是一种获取加兰他敏的较好途径。

关键词: 石蒜; 悬浮培养; 加兰他敏; 生物碱; 愈伤组织

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)024-3540-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.024.021

Establishment of cell suspension culture system and its alkaloid accumulation of *Lycoris radiata*

ZHANG Yu-qiong¹, CHEN Na¹, ZHOU Jian-hui¹, DONG Zhao-rong², LI Yong¹, WANG Mei-fang¹, GAO Cui-yun¹

1. School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

2. School of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: Objective To investigate the culture conditions for the establishment of cell suspension culture system for *Lycoris radiata* callus and its alkaloid accumulation. **Methods** Using the bulbs of *L. radiata* as explants for callus induction, calli with good quality were selected for suspension cultivation. The factors influencing the establishment of *L. radiata* cell suspension culture system, such as hormone, inoculum amount, inositol, and conditional culture, were investigated. The alkaloid content in cell suspension culture system of *L. radiata* was determined by HPLC. **Results** The optimal medium for the cell suspension culture was MS + 0.5 mg/L 2, 4-D + 0.1 mg/L KT + 300 mg/L inositol and the inoculum size was 15%. The lag phase of the cell suspension culture system could be evidently shortened by the medium of logarithmic growth. The galanthamine contents in the cell suspension culture system and the medium were 4.18 and 0.69 times of those in the bulbs of *L. radiata*, respectively. **Conclusion** The cell suspension culture system of *L. radiata* is established and it is a feasible way to gain galanthamine.

Key words: *Lycoris radiata* Herb.; suspension culture; galanthamine; alkaloid; callus

石蒜 *Lycoris radiata* Herb. 又名红花石蒜、龙爪花、老鸦蒜、螳螂花, 是石蒜科 (Amaryllidaceae) 石蒜属 *Lycoris* Herb. 的一种多年生草本植物, 具有很高的观赏价值和极高的药用价值。据《本草纲目》等记载, 石蒜具有解毒、祛痰、利尿、催吐等功效, 主治痈疮恶核、咽喉肿痛、水肿等^[1]。石蒜中含有加兰他敏、石蒜碱和力克拉敏等多种生物碱^[2], 大多

具有很高的药用价值, 其中加兰他敏是一种可逆的胆碱酯酶抑制剂, 可以用于阿尔兹海默病 (AD, 老年性痴呆症的主要表现形式)、重症肌无力、肠麻痹和骨髓灰质炎后遗症等的治疗^[3-4]。

现在加兰他敏作为抗 AD 药物已在 25 个国家上市^[5], 国内外对加兰他敏的合成途径的研究也较多。Barton 等^[6]在 1962 年首次利用化学合成的方法合成

收稿日期: 2013-07-11

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目 (1208085mc48); 国家科技支撑计划项目 (2013BAJ10B12)

作者简介: 张玉琼 (1965—), 女, 安徽合肥人, 副教授, 主要研究方向为植物细胞工程。Tel: (0551)65786232 E-mail: zhyuqiong.ah@126.com

*通信作者 董召荣 E-mail: d3030@163.com

了加兰他敏,但是关键步骤的收率极低,仅有1.4%;2009年,Magnus等^[7]又报道了另一种合成加兰他敏的方法,总收率达63%。2007年,刘涛等^[8]以力可拉敏为原料催化脱氢半合成加兰他敏,2009年王立升等^[9]优化了加兰他敏中间体的合成工艺并提高了反应收率。多年来,加兰他敏的化学合成已经取得了长足的进步,但其化学合成的工艺复杂、条件苛刻、成本高企,易造成环境污染等,目前尚不能满足工业化生产的要求^[8]。随着社会老龄化的加剧,对加兰他敏的需求日益增大。传统的获取加兰他敏等生物碱的方法都是从野外石蒜科的植物中提取,但是石蒜科植物主要以自然分球繁殖为主,繁殖率低,加之生态环境的制约,野生资源远不能满足市场需求,且传统的依靠野外材料提取加兰他敏的方法给自然生态和野生石蒜资源带来了较大的破坏。

植物组织培养方法生产次生代谢产物不受季节、产地等的限制,是解决植物资源短缺的有效途径之一。且植物细胞悬浮培养不受环境限制,繁殖速度快,细胞团均一性较好,操作方便,且与动物细胞培养相比,植物细胞悬浮培养不会发生恶性变异^[10]。由于这些优势,植物细胞悬浮培养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^[11-12]。于寒松等^[13]在荞麦的悬浮细胞系的研究也表明,悬浮细胞系中黄酮高于野外材料。目前,石蒜组织培养、快速繁殖的研究较多^[14-15],但是石蒜细胞悬浮培养的研究尚未见报道。因此,本实验通过建立石蒜细胞悬浮培养体系,为间接的保护自然生态环境和利用石蒜细胞大规模生产加兰他敏等次生代谢产物提供理论基础。

1 材料与试剂

石蒜 *Lycoris radiata* Herb. 采自安徽农业大学校园,由安徽农业大学生命科学院叶爱华讲师鉴定。加兰他敏、力可拉敏、石蒜碱对照品均购于株洲大有生物技术有限公司(质量分数 $\geq 98\%$)。甲醇、乙腈(色谱级,美国Tedia公司)。三乙胺、三氯甲烷、冰乙酸、盐酸等其他药品均为国产分析纯。植物生长调节剂:6-苄氨基嘌呤(6-BA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、激动素(KT)均为分析纯,购自Sigma公司。

2 方法

2.1 石蒜愈伤组织的诱导与增殖^[15]

以石蒜鳞茎诱导愈伤组织,诱导的培养基为2,4-D 1 mg/L+6-BA 1 mg/L的MS培养基。形成的愈伤组织转接到2,4-D 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L的

MS培养上暗培养条件下继代8~10次,待愈伤组织疏松,呈淡黄色即可用于悬浮培养的研究。

2.2 悬浮培养系的建立

将疏松的愈伤组织夹碎转接到不同处理的MS液体培养基中,每个培养瓶装50 mL培养基,pH 5.8~6.0,105 r/min条件下的摇床暗培养,每组重复3次。

2.2.1 植物激素配比 以MS液体培养基为基本培养基,2,4-D/KT的配比分别为0.1:0.1、0.1:0.25、0.1:0.5、0.5:0.1、0.5:0.25和0.5:0.5(mg/L)。

2.2.2 接种量 选择固体培养基上疏松的愈伤组织分别按1%、5%、10%、15%、20%转入MS液体培养基,激素组合为2,4-D 0.5 mg/L和KT 0.1 mg/L。

2.2.3 肌醇 对照组MS液体培养基中肌醇量设为100 mg/L,实验组肌醇量为0、200、300、400 mg/L。

2.2.4 条件培养 在细胞系继代培养的时候,倒去原培养液的2/3,然后在培养基中分别添加等量的延迟期、指数期、静止期的培养液。

2.2.5 石蒜悬浮细胞系再生^[14-15] 挑选悬浮培养中大小一致的细胞团接种到继代培养基培养,然后转接到分化培养基(MS+2,4-D 1 mg/L+6-BA 2 mg/L)上,细胞团可分化出小鳞茎,将诱导出的小鳞茎转接到生根培养基(MS+NAA 3 mg/L)上,小鳞茎可分化出根,经过炼苗种植到沙质土壤中,培养出活的小植株。

2.3 悬浮细胞生长的测定

将细胞培养物在真空泵下抽滤,再用去离子水洗涤2~3次,滤纸吸干表面水分,即为细胞培养物的鲜质量,增长率=(实验后的鲜质量-初始鲜质量)/初始鲜质量。将细胞培养物置于80℃烘箱中烘2 h,60℃干燥至恒质量,冷却称质量为干质量,重复3次。

2.4 TTC法测定细胞活力^[16]

2.4.1 TTC标准曲线的制作 精确称取氯化三苯基四氮唑(TTC)0.5 g,用少量水溶解,定容至100 mL即为浓度0.5%的TTC溶液。取0.5% TTC溶液0.2 mL至100 mL量瓶,加入少量Na₂SO₄粉末,溶液变成红色,用醋酸乙酯定容至刻度线,摇匀。分别取0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL溶液到10 mL量瓶中,用醋酸乙酯定容至刻度线。以醋酸乙酯为参比,在485 nm分别记录上述溶液的吸光度(A)值,绘制标准曲线。

2.4.2 悬浮细胞系活力的测定 称取鲜质量悬浮细胞系 0.5 g, 放入烧杯中, 加入 5 mL 0.5% TTC 溶液和 5 mL 磷酸缓冲液, 摇匀后让溶液完全浸没细胞, 放在 37 °C 水浴锅中, 盖好水浴锅盖让其保持黑暗条件 1 h, 1 h 后在每个样品中加入 2 mL 1 mol/L H_2SO_4 终止反应。空白在加入 TTC 溶液和磷酸缓冲液时先加 H_2SO_4 。取出细胞, 用滤纸吸干后放入研钵中, 加 2 mL 醋酸乙酯和少量的石英砂充分研磨, 将溶液转移至 10 mL 量瓶中, 重复 2 次, 最后加醋酸乙酯至容量瓶刻度线, 摇匀。以空白为对照, 利用分光光度计在 485 nm 测量样品的 A 值, 测出的数值根据上述 TTC 标准曲线算出还原 TTC 的量。

2.5 生物碱的测定

2.5.1 石蒜悬浮细胞生物碱的测定 将烘干的细胞培养物研磨成粉末过 40 目筛, 精密称取 1 g 粉末, 加入 75%乙醇 10 mL, 320 W 微波炉处理 1 min, 浸提 1 h 后滤液减压浓缩至干, 将浓缩物用 10 mL 1 mol/L HCl 溶解, 用无水碳酸钠调 pH 至 9.5 左右, 用三氯甲烷萃取 3 次, 合并萃取液, 减压浓缩至干, 用甲醇溶解浓缩物, 溶液经微孔滤膜滤过即为待测生物碱样品。

将新鲜的鳞茎洗净, 用剪刀剪成片状, 放入 60 °C 烘箱烘干, 将烘干后的鳞茎片用粉碎机粉碎、过筛即可, 提取过程同上。

2.5.2 培养基中生物碱的测定 培养基经过滤后用无水碳酸钠调 pH 至 9.5 左右, 用三氯甲烷萃取 3 次合并萃取液, 减压浓缩至干, 用甲醇溶解浓缩物, 溶液经微孔滤膜滤过即为待测生物碱样品。

2.6 石蒜主要生物碱的分析

2.6.1 色谱条件: Agilent 1200 高效液相色谱仪, 色谱柱为 ZORBAX ODS- C_{18} (150 mm×4.6 mm, 5

μm , Agilent 公司), 洗脱条件参见文献方法^[17], 柱温 25 °C, 进样量为 10 μL , 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长为 234 nm。

2.6.2 标准曲线的绘制 以加兰他敏 (Y_1)、力克拉敏 (Y_2) 和石蒜碱 (Y_3) 为对照品, 参照文献方法^[17]绘制标准曲线, 得线性回归方程为 $Y_1=0.034\ 2\ X_1-0.878\ 1$, $r_1=0.999\ 5$; $Y_2=0.045\ 8\ X_2+0.173\ 8$, $r_2=0.999\ 5$; $Y_3=0.070\ 2\ X_3+1.595\ 8$, $r_3=0.999\ 6$ 。

2.7 数据处理

实验数据采用 v.7.55 版 DPS 统计软件和 Microsoft Excel 2007 软件处理分析。

3 结果与分析

3.1 激素对石蒜悬浮细胞生长的影响

激素对石蒜悬浮细胞系的影响较大 (表 1), 在低浓度的激素 (2, 4-D 0.1 mg/L+KT 0.1 mg/L) 的条件下, 悬浮细胞分裂较慢, 细胞活力较低。当 2, 4-D 0.5 mg/L 和 KT 0.1 mg/L 的条件下, 细胞增殖较快, 细胞活力较强, 且均一性较好。当激素浓度都达到 0.5 mg/L 时, 细胞增殖较慢, 细胞团比较紧密, 培养基颜色较深。说明高浓度的激素对悬浮细胞系的生长有抑制作用。

3.2 接种量对石蒜悬浮细胞的影响

植物细胞悬浮培养生长的启动需要有一个最低的起始密度, 即临界值, 当接种量大于临界值时细胞增殖才比较明显, 而当接种量较小时, 细胞容易自溶^[18], 细胞分裂困难, 生长较慢。当石蒜愈伤组织接种量为 1% 时 (图 1), 细胞适应期比较长, 悬浮细胞到了第 8 天才有比较快的增殖速度, 并且增殖较小, 只有 104.4%。随着接种量的增加, 细胞增长率提高, 当接种量为 15% 时, 细胞增长率可达

表 1 不同激素浓度对石蒜悬浮细胞生长的影响

Table 1 Effects of hormones at different concentration on suspension cell growth of *L. radiata*

激素		悬浮愈伤增长率 / %	细胞活力 (TTC 还原量) / ($\mu g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$)
2,4-D / ($mg \cdot L^{-1}$)	KT / ($mg \cdot L^{-1}$)		
0.1	0.10	99.20±18.45 ^c	3 559.55±243.15 ^c
0.1	0.25	118.73±14.29 ^c	4 506.82±389.66 ^b
0.1	0.50	152.80±15.51 ^b	4 411.51±126.82 ^b
0.5	0.10	213.33±12.73 ^a	5 319.61±708.09 ^a
0.5	0.25	200.33±17.02 ^a	3 435.07±191.44 ^c
0.5	0.50	149.53±22.31 ^b	3 090.78±186.76 ^c

同列中用不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著, 下同

Different lowercase letters in the same column mean significant difference at 0.05 level, same as below

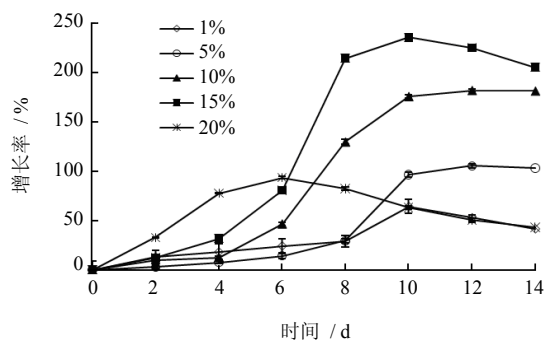


图 1 接种量对石蒜悬浮细胞生长的影响

Fig. 1 Effects of inoculums on suspension cell growth of *L. radiata*

233.33%，培养周期大约为 10 d，生长曲线呈 S 型。当接种量继续增加时，虽然细胞的适应期减短，但是细胞的增长率下降，而且细胞和培养基颜色变深，细胞活力下降。可能是随着细胞密度的增加，营养物质消耗速度加快，营养物质成为影响细胞生长的重要因素。

3.3 肌醇对石蒜悬浮细胞的影响

肌醇对生物体的生长发育有重要的作用，它能促进细胞的新陈代谢及生长和分化^[19]。在实验中发现，石蒜悬浮细胞系在低浓度的肌醇中细胞增长较慢，300 mg/L 肌醇的生长条件下，细胞增长率较高，细胞活力较好，细胞分散度较好（表 2）。随着肌醇浓度的增加，细胞增长率减慢，细胞成块状较多，活力下降。范美华等^[20]在半夏的悬浮细胞系的研究表明，高质量浓度的肌醇会抑制悬浮细胞的增殖，这与本实验研究结果相同。

表 2 肌醇对石蒜悬浮细胞生长的影响

Table 2 Effects of inositol on suspension cell growth of *L. radiata*

肌醇 / (mg·L ⁻¹)	悬浮愈伤增 长率 / %	细胞活力 (TTC 还 原量) / (μg·g ⁻¹ ·h ⁻¹)
0	158.13 ± 22.62 ^c	2 157.13 ± 328.87 ^d
100	191.16 ± 20.21 ^{bc}	4 613.39 ± 568.79 ^c
200	204.40 ± 17.11 ^b	5 706.98 ± 360.96 ^b
300	243.16 ± 21.19 ^a	7 335.71 ± 827.08 ^a
400	188.04 ± 14.37 ^{bc}	6 054.85 ± 685.05 ^b

表 3 不同材料中生物碱量的比较

Table 3 Comparison on alkaloid contents in different materials

材料	加兰他敏		力克拉克敏		石蒜碱	
	平均值 / (mg·g ⁻¹)	RSD / %	平均值 / (mg·g ⁻¹)	RSD / %	平均值 / (mg·mL ⁻¹)	RSD / %
野外鳞茎	1.40	9.3	3.20	8.1	0.153	3.3
悬浮细胞系	5.85	3.4	0.51	7.8	0.029	13.1
培养基	0.97	6.2	0.11	7.3	0.017	2.3

添加延迟期和静止期培养液的细胞生长周期也较对照组缩短。因此推断，细胞分泌的这类条件因子随着悬浮细胞系的生长而增加，在对数期达到最大值，而静止期效果减弱，可能是条件因子分解或者抑制条件因子的物质分泌造成的。因此在细胞系继代的时候，添加对数期的培养液有利于石蒜细胞系下个周期的生长。

3.4 条件培养对石蒜悬浮细胞系生长的影响

在培养基中添加不同生长时期的培养液，细胞的生长周期发生了明显的变化（图 2），对数期的培养基能明显缩短细胞延迟期，细胞很快的进入对数期，细胞系的生长周期由原来的 10 d 减少到 7 d，周期减短 30%，但是对细胞的最大增殖影响不大。

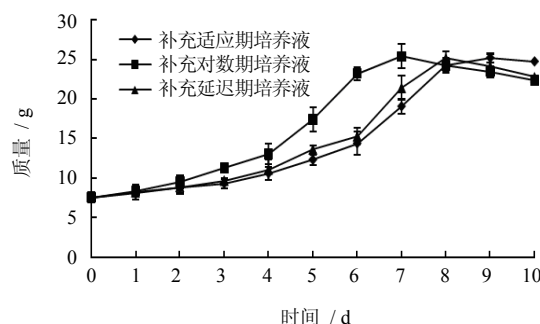


图 2 条件培养对石蒜细胞系生长的影响

Fig. 2 Effects of conditional culture on suspension cell growth of *L. radiata*

3.5 不同材料中生物碱量的比较

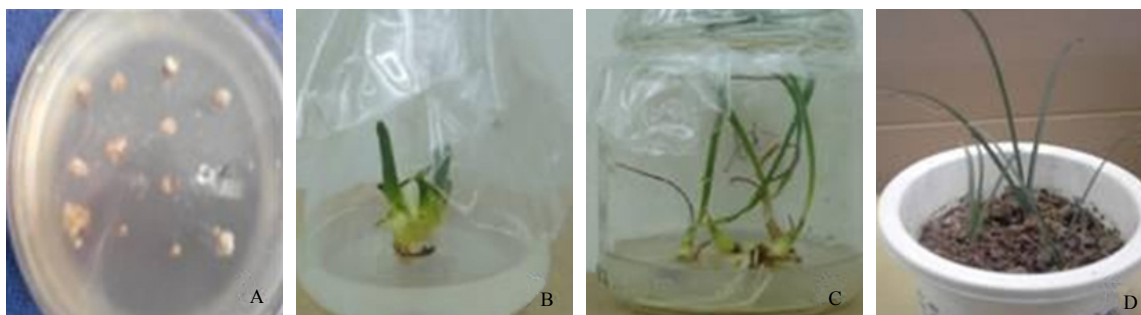
加兰他敏是一种胆碱酯酶的抑制剂，是治疗阿尔兹海默病的重要药物，是石蒜中的一种重要利用资源。HPLC 检测结果表明（表 3），与野外鳞茎相似，悬浮细胞系中含有加兰他敏、力克拉克敏和石蒜碱等有效生物碱成分。其中加兰他敏质量分数可达 5.85 mg/g，是野外鳞茎的 4.18 倍，培养基中也有石蒜类生物碱的存在。因此，利用石蒜悬浮培养细胞系来获得加兰他敏是一种好的方法。

3.6 石蒜悬浮细胞系再生

悬浮培养系的愈伤组织在分化培养基上可诱导

出小鳞茎,诱导率可达46.21%,而小鳞茎转在生根培养基上的出根率可高达100%,说明所建立的悬浮细胞系是胚性的。由于自然状态下石蒜属植物分

球繁殖系数和结实率很低,所以建立高效的石蒜再生体系能够有效的解决植物的繁育问题。悬浮细胞系的再生见图3。



A-悬浮细胞系固体培养 B-细胞分化出芽 C-小鳞茎分化出根 D-小植株
A-suspension cell in solid culture B-budding from cell differentiation C-rooting from small bulbs differentiation D-plantlets

图3 悬浮细胞分化成植株图

Fig. 3 Suspension cell differentiation of plants

4 讨论

为充分利用悬浮培养体系生产其药用的次生代谢产物,必须优化其悬浮培养体系。本实验研究了影响石蒜悬浮培养的几种重要因素,建立了较好的悬浮细胞系。

悬浮培养体系的建立过程中,由于用于接种的悬浮培养材料是由单细胞和细胞团所组成,植物细胞在悬浮培养过程中具有群聚效应,细胞密度太低,细胞生长缓慢;细胞密度过高,细胞生长速度过快,细胞液泡变大,容易积累有害物质,不利于悬浮细胞系的生长和次生代谢产物的合成^[21-22],因此在悬浮培养过程中,初始接种量的多少直接关系到悬浮细胞的生长以及悬浮细胞系的建立。本实验中接种量15%时,细胞增长率最大。

在植物细胞过程中,植物生长调节剂的种类和质量浓度对细胞的生长、分化以及次生代谢产物的合成都会产生重要影响。在植物细胞悬浮培养过程中,根据不同的材料,添加适宜的激素种类和浓度,不仅能够有效的促进植物细胞的增殖分化,也有利于促进植物次生代谢产物的合成。本实验室的前期研究结果表明,2,4-D和KT两种激素对愈伤组织的培养最佳。在石蒜细胞的悬浮培养中,2,4-D 0.5 mg/L和KT 0.1 mg/L是悬浮培养系的最佳激素组合。

条件培养是动物细胞培养中常用的一种方法,De Ropp 1954年在植物细胞培养中加以利用。在植物细胞的培养过程中,细胞会向培养基中分泌一类称为条件因子的物质(Conditioning Factors, CFs),其对细胞的生长分裂有很大的促进作用。在悬浮培

养过程中,保持条件培养基与新鲜培养基适当的比例是重要因素之一。在悬浮培养基中添加对数期的培养液有利于石蒜细胞的生长。在植物的悬浮培养过程中,添加合适的条件培养基,如酵母提取液等,能够促进细胞的生长发育。

对比石蒜的悬浮细胞系和野外鳞茎中生物碱的量,结果显示悬浮细胞系的加兰他敏量远高于野外材料,所以石蒜悬浮细胞培养体系建立,为进一步研究石蒜次生代谢途径和石蒜次生代谢产物的大规模生产奠定基础,同时有利于高产植株的选育。

参考文献

- [1] 李时珍. 本草纲目 [M]. 上海: 商务印刷社, 1954.
- [2] 谢峻, 谈锋, 冯巍, 等. 石蒜属植物分类鉴别、药用成分及生物技术应用研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(12): 1902-1905.
- [3] Wang H. Benzylphenethylamine alkaloids from Bulbs and flowers of *Lycoris radiata* [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(1): 60-63.
- [4] Dodart J C, Mart R A. Gene delivery of human apolipoprotein E alter brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(4): 1211-1216.
- [5] 唐军波, 彭六保, 崔巍, 等. 加兰他敏市场前景浅析 [J]. 中国药房, 2006, 7(22): 1690-1692.
- [6] Barton D, Kirby G W. The synthesis of galanthamine [J]. *J Chem Soc*, 1962, (2): 806-817.
- [7] 房雷, 苟少华, 张奕华. 加兰他敏全合成研究进展 [J]. 有机化学, 2011, 31(3): 286-296.
- [8] 刘涛, 钱超, 陈新志. 外消旋加兰他敏的半合成研

- 究 [J]. 化学学报, 2007, 65(8): 711-714.
- [9] 王立升, 张青, 黄喜寿, 等. 加兰他敏中间体的合成工艺 [J]. 广西大学学报: 自然科学版, 2009, 34(2): 164-167.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 于寒松, 于亚桐, 胡耀辉, 等. 利用悬浮细胞培养方法提高荞麦中总黄酮含量的研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(22): 37-39.
- [14] 朱景存, 张玉琼, 刘春滢, 等. 石蒜组织培养和植株再生的研究 [J]. 生物学杂志, 2010, 27(6): 46-48.
- [15] 周建辉, 张玉琼, 李明凯, 等. 石蒜愈伤组织的诱导及其继代培养 [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(12): 1215-1218.
- [16] 白宝璋, 金锦子, 白崧, 等. 玉米根系活力 TTC 测定法的改良 [J]. 玉米科学, 1994, 2(4): 44-47.
- [17] 李明凯, 张玉琼, 董召荣, 等. 高效液相色谱法测定石蒜中加兰他敏、力可拉敏及石蒜碱 3 种生物碱 [J]. 分析测试学报, 2012, 31(8): 957-961.
- [18] 颜日明, 张志斌, 朱筠, 等. 高产绿原酸杜仲细胞悬浮培养体系优化研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 301-304.
- [19] Myung J O, Hye R N, Choi H K, *et al.* High frequency plant regeneration system for *Nymphoides coreana* via somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived embryogenic cell suspension cultures [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2010, 4(2): 125-128.
- [20] 范美华, 冯玲玲, 彭瑜. 几种营养因子对半夏悬浮细胞生长及总生物碱形成的影响 [J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2004, 38(4): 283-286.
- [21] 欧阳杰, 武彦文, 王晓东, 等. 肉苁蓉细胞悬浮培养体系的建立 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 426-429.
- [22] 方文娟, 韩烈保, 曾会明. 植物细胞悬浮培养影响因子研究 [J]. 生物技术通报, 2005(5): 11-15.