

· 药材与资源 ·

南方红豆杉愈伤组织培养条件的优化及紫杉醇积累的基因表达效应分析

张芳芳, 王 鹏, 姬丹丹, 向凤宁*

(山东大学生命科学院 细胞工程及种质创新教育部重点实验室, 山东 济南 250100)

摘要:目的 优化南方红豆杉愈伤组织诱导与继代培养条件, 获得含紫杉醇量高的红豆杉愈伤组织, 明确紫杉醇合成相关基因的表达模式与紫杉醇量的关系。方法 探讨了适合南方红豆杉的愈伤组织诱导及继代培养的激素组成及浓度。比较了南方红豆杉(种胚、幼茎、幼芽)、曼地亚红豆杉(种胚)和太平洋红豆杉(种胚)不同外植体来源的愈伤组织的生长特点和紫杉醇的量, 分析了不同愈伤组织紫杉醇合成相关基因的表达差异。结果 添加 3.0 mg/L 2,4-D 的 Murashige & Skoog (MS) 培养基有利于南方红豆杉的诱导, 诱导率高于 92%。添加 2.0 mg/L 2,4-D 与 1.0 mg/L 6-苄基腺嘌呤(6-BA)的继代培养基有利于南方红豆杉的紫杉醇积累。同一培养条件下, 南方红豆杉种胚来源的愈伤组织紫杉醇量最高, 达到干质量的 0.027%。含紫杉醇量高的愈伤组织, 其紫杉醇合成途径中的= 牛儿基= 牛儿基焦磷酸合成酶(GGPPS)、紫杉二烯合成酶(TASY)、紫杉烷 10 β -羟化酶(T10 β H)、10-去乙酰巴卡亭 III β -O-乙酰转移酶(DBAT)、苯丙氨酸氨基变位酶基因(PAM)、去苯甲酰紫杉 N-苯甲酰转移酶(DBTNBT)等酶基因的表达水平高。结论 从南方红豆杉的种胚为外植体源获得了含紫杉醇量高的愈伤组织, 提高 GGPPS、TASY、T10 β H、DBAT、PAM、DBTNBT 的表达水平将促进紫杉醇的合成。

关键词: 红豆杉属; 愈伤组织诱导; 紫杉醇; 基因表达

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)12-2058-05

Optimization of callus culture conditions for *Taxus chinensis* var. *mairii* and effect of gene expression of Taxol accumulation

ZHANG Fangfang, WANG Peng, JI Dandan, XIANG Fengning

(Key Laboratory of Plant Cell Engineering and Germplasm Innovation, Ministry of Education, College of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Objective The callus induction and subculture condition of *Taxus chinensis* var. *mairii* were optimized in the experiment. High Taxol-yielding callus was obtained, and the correlation between expression patterns of Taxol biosynthesis related genes and Taxol content was defined. **Methods** Optimal hormone composition and concentration for induction and subculture of callus derived from *T. chinensis* var. *mairii* were briefly studied. The growth characteristics and Taxol content of calli derived from *T. chinensis* var. *mairii* (including vitro embryos, juvenile stems, and juvenile buds), *T. media* (vitro embryos) and *T. brevifolia* (vitro embryos) were compared. Expression of Taxol biosynthesis related genes in the above different calli was analyzed. **Results** MS Medium supplemented with 3.0 mg/L 2,4-D was suitable for callus induction of *T. chinensis* var. *mairii*, the induced rate is up to 92%. Subculture medium supplemented with 2.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L 6-BA was suitable for Taxol biosynthesis of *T. chinensis* var. *mairii*. Under the same culture conditions, Taxol content of calli derived from vitro embryos of *T. chinensis* var. *mairii* was the highest and had reached 0.027% of callus dry weight. The genes of Taxol biosynthesis related enzymes — geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS), taxadiene synthase (TASY), taxane 10 β -hydroxylase (T10 β H), 10-deacetylbaicatin III β -10-O-acetyltransferase (DBAT), phenylalanine aminomutase (PAM), and 3'-N-debenzoyltaxol N-benzoyltransferase (DBTNBT), were expressed at the high level in the high Taxol-producing callus. **Conclusion** Vitro embryos can be used as the first choice explant source to obtain high Taxol-yielding callus. To improve gene expression level of GGPPS, TASY, T10 β H, DBAT, PAM, and DBTNBT would promote Taxol biosynthesis.

Key words: *Taxus* L.; callus induction; Taxol (paclitaxel); gene expression

收稿日期: 2010-05-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30771116, 30970243), 山东省杰出青年基金(QJ200810)

作者简介: 张芳芳(1986—), 女, 江西上饶人, 硕士, 主要从事药用植物细胞工程和基因工程研究。E-mail: Zhangfangfang010@sina.com

* 通讯作者 向凤宁, 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物细胞工程和基因工程研究。

Tel: (0531) 88363639 E-mail: xfn0990@sdu.edu.cn

紫杉醇 (Taxol) 是存在于红豆杉属植物中的一种四环二萜酰胺类化合物, 是国际公认的广谱、强活性天然抗癌药物之一^[1-3]。目前紫杉醇主要从红豆杉树皮中提取或通过半合成途径获得^[4]。但由于红豆杉生长缓慢, 因而原料供应极度匮乏。目前红豆杉组织培养已成为生产紫杉醇的一条重要途径^[5-7]。

红豆杉属植物全世界共有 11 种, 主要分布在北半球。曼地亚红豆杉 *Taxus media* Rehd. 是东北红豆杉与欧洲红豆杉的天然杂交种, 太平洋红豆杉 *T. brevifolia* Nutt. 又称短叶红豆杉, 这两种红豆杉均分布在北半球。在中国分布的红豆杉属植物共有 4 种和 1 变种, 其中南方红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. var. *mairei* (Lemee et Lévl.) Cheng et L. K. Fu 是中国红豆杉的一个重要变种^[8], 其树皮中含紫杉醇的量为 0.0178%^[9]。有关南方红豆杉愈伤组织诱导的外植体研究也有较多报道^[10], 主要集中在 1~2 年生的枝条、叶、幼嫩茎段^[11-16], 但从种胚来源的愈伤组织诱导及继代培养报道甚少^[17-19]。

紫杉醇的骨架合成是从二萜共同前体= 牛儿基 = 牛儿基焦磷酸 (geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP) 开始, 从 GGPP 到紫杉醇需要 19 个酶促步骤。首先 GGPP 在紫杉二烯合酶的催化下生成紫杉二烯; 接着, 通过下游的 8 步细胞色素 P450 介导的氧化反应, 3 步 CoA 依赖的酰化反应, C9 位上的一步氧化反应, 以及 C5 位上的氧环化反应, 形成了中间产物巴卡亭 III, 最后通过 5 步侧链合成途径形成紫杉醇^[20]。本实验以南方红豆杉种胚、嫩茎和幼茎为材料, 进行了南方红豆杉愈伤组织诱导和继代培养的条件优化。分析了南方红豆杉、曼地亚红豆杉和太平洋红豆杉愈伤组织生长、紫杉醇合成相关基因表达与紫杉醇量的相关性, 为大规模生产紫杉醇及揭示紫杉醇代谢的分子调控机制提供了依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料: 南方红豆杉当年生的嫩茎、幼茎和成熟种子于秋季采自江西修水县黄港镇垅港, 海拔 430 m 山谷林中的野生南方红豆杉植株。材料由九江森林植物标本馆 (JJF) 谭策铭鉴定。曼地亚红豆杉、太平洋红豆杉种子由茂县春回农业科技产业开发有限责任公司提供。紫杉醇对照品购自 Sigma 公司, 甲醇为色谱级。高效液相为岛津 LC-10AT 型高效液相色谱系统。

1.2 外植体的处理: 取南方红豆杉外植体, 用洗衣粉清洗干净, 流动的自来水下冲洗 2 h, 再用体积分

数为 75% 乙醇浸泡 30 s, 然后在质量分数为 0.1% 的升汞溶液中处理 10 min, 最后用无菌水冲洗 3~4 次。外植体分为 3 种类型: (1) 去外种皮的成熟种子, 在无菌滤纸上将胚剥离; (2) 茎段, 切成 0.5~1.5 cm 长的小段; (3) 侧芽, 剥去少数外鳞后, 用剪刀稍剪碎。曼地亚红豆杉和太平洋红豆杉成熟种子的处理同(1)。

1.3 愈伤组织的诱导培养条件: 愈伤组织诱导培养基以 MS 为基本培养基, pH 5.8, 并添加 3% 蔗糖、0.8% 琼脂、500 mg/L 水解干酪素、146 mg/L 谷氨酰胺。诱导培养基添加不同浓度的 2,4-D (表 1)。将南方红豆杉的 3 种外植体材料分别接种到各诱导培养基上, 每一种诱导培养基上每种材料接种 10 瓶, 每瓶 5 块外植体, 25 °C 黑暗条件下培养。35 d 后统计各培养基中出现的愈伤组织块数, 计算愈伤组织的诱导率。曼地亚红豆杉、太平洋红豆杉成熟种子的剥离胚接种到添加 3.0 mg/L 2,4-D 的诱导培养基上, 25 °C 黑暗条件下培养。

表 1 不同浓度 2,4-D 对南方红豆杉种胚、茎段、幼芽愈伤组织诱导率的影响

Table 1 Effect of different concentration of 2,4-D on callus induction rate of embryos, stem segments, and juvenile buds from *T. chinensis* var. *mairei*

诱导培养基 (mg·L ⁻¹)	2,4-D/	愈伤组织形成率/%			愈伤组织污染率/%		
		种胚	茎	芽	种胚	茎	芽
MS 1	1	68.8	55.4	65.5			
MS 2	2	80.5	85.7	80.0	2.5	25.4	15.8
MS 3	3	96.1	95.7	92.0			

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

1.4 愈伤组织的继代培养条件: 愈伤组织继代培养基的基本培养基同诱导培养基, 但各添加不同种类和浓度的激素 (表 2)。所有材料每隔 28 d 转入新鲜培养基中。愈伤组织的生长情况用生长指数表示。

生长指数 = (愈伤组织收获鲜质量 - 愈伤组织接种鲜质量) / 愈伤组织接种鲜质量

1.5 紫杉醇定量测定: 样品中紫杉醇定量测定采用高效液相色谱法^[21-22]。采用 VenusilTM C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇水 (65:35), 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 每次进样 20 μL, 检测波长为 227 nm。取紫杉醇对照品 1 mg, 溶于 1 mL 甲醇中, 配成 1 mg/mL 对照品储备液, 将对照品储备液依次稀释成 104、78、52、26、13、1.3 μg/mL 对照品溶液。分别取对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 测定其峰面积, 计算得回归方程 $Y =$

表 2 南方红豆杉 (种胚来源) 愈伤组织的继代培养

Table 2 Subculture of callus derived from vitro embryos of *T. chinensis* var. *mairai*

继代培养基	激素种类和浓度/(mg·L ⁻¹)	生长指数	紫杉醇量/%	生长状态
MS-3	2, 4-D 3.0	5 260±0 444 a	0 020 0±0 001 5 b	白色, 质地松散, 部分褐化
MS-4	2, 4-D 2.0+ 6-BA 1.0	4 885±0 460 b	0 027 2±0 001 1 a	浅黄色, 颗粒状, 较松散, 轻度褐化
MS-5	2, 4-D 2.0+ NAA 1.0	4 867±0 384 b	0 018 5±0 000 7 b	浅黄色, 质地较致密, 轻度褐化
MS-6	2, 4-D 2.0+ KT 0.5	4 852±0 380 b	0 014 7±0 001 1 c	质地致密, 呈淡红色, 褐化现象严重

字母不同者表示相互间存在差异 ($P < 0.05$)

Values followed by different letters are significantly different

at $P < 0.05$

15 590 X + 267 443 ($n=6$), $r=0.9996$ 。表明紫杉醇在 1.3~104 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 具有良好的线性关系, 采用外标法, 计算各样品紫杉醇的量, 以愈伤组织干质量百分比表示。

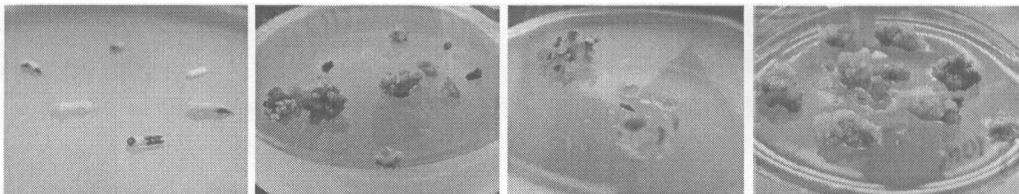
1.6 半定量 RT-PCR: 红豆杉愈伤组织的总 RNA 提取采用 CTAB 法^[23], 反转录过程采用 TaKaRa 的 M-MLV 反转录酶, 并按照 TaKaRa 操作手册进行。以红豆杉中表达的 rRNA 为内参, 各基因的正义和反义引物参见 Ezekiel 法^[24]。扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 共 25~30 个循环; 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

2 结果与分析

2.1 不同外植体和不同浓度的 2, 4-D 对南方红豆杉愈伤组织诱导的影响: 选用南方红豆杉的种胚、幼茎、幼芽作为外植体, 分别接种于诱导培养基上进行愈伤组织的诱导。结果表明, 4~7 d 后南方红豆杉

种胚部分变红 (图 1A), 并开始分泌一些物质使培养基变红。两周后整体膨大, 表面出现许多黏液。24~30 d 后形成大量的愈伤组织。诱导的愈伤组织有两种状态: 淡红色、较致密型 (图 1B) 和白色、松散型 (图 1C)。将诱导出的愈伤组织转移到添加 2.0 mg/L 2, 4-D 和 1.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基 (MS-4) 上, 3~4 次继代后形成淡黄色、颗粒状的愈伤组织 (图 1D)。南方红豆杉幼茎、幼芽均在 14~20 d 时在切口处出现白色、松散状的愈伤组织。

在含不同浓度 2, 4-D 的 MS 诱导培养基中, 种胚、幼茎、幼芽愈伤组织的诱导率随培养基中 2, 4-D 浓度的增加而明显提高, 3.0 mg/L 2, 4-D 诱导效果较好, 各外植体愈伤组织诱导率均超过 92.0% (表 1)。当年生红豆杉成熟种子的种胚在 3.0 mg/L 2, 4-D 的诱导培养基形成愈伤组织的比率最高 (96.1%), 并且由于种胚没有茎段和芽存在的内在真菌污染, 其愈伤组织污染率最低。



A 种胚接种 4~7 d B 种胚接种后 25 d 形成的淡红致密型的愈伤组织

C 种胚接种 25 d 形成的白色松散型愈伤组织 D 种胚愈伤组织的继代培养 (3 代)

A-4-7 d after cultured B faint red and compact callus was obtained after cultured for 25 d

C white and loose callus was also obtained after cultured for 25 d D callus from embryos after subculture for three generations

图 1 种胚愈伤组织的诱导

Fig. 1 Callus induction from vitro embryos

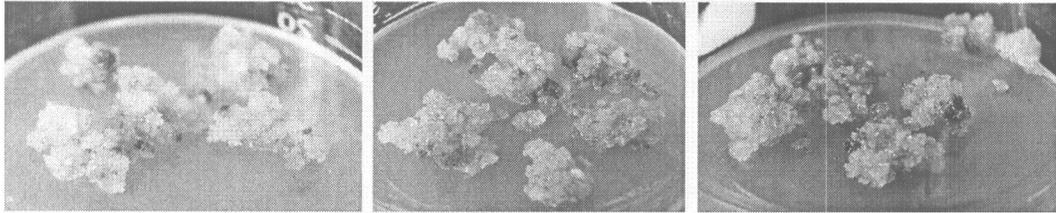
2.2 激素对南方红豆杉愈伤组织生长及紫杉醇量的影响: 选用南方红豆杉种胚诱导产生的愈伤组织, 转移至 MS-3、MS-4、MS-5 和 MS-6 4 种培养基中继代培养。结果表明, 在 MS-3 培养基上愈伤组织生长最快, MS-4 培养基上愈伤组织含紫杉醇量最高 (表 2), 表明 2, 4-D 对愈伤组织的增殖有促进作用, 激素 6-BA 对愈伤组织紫杉醇积累有明显促进

作用。但高浓度的 2, 4-D 激素下愈伤组织结构松散, 且随继代时间的延长将加重材料的褐化, 因此 MS-3 培养基不适合作为愈伤组织的长期继代培养。MS-6 培养基上愈伤组织易褐化, 表明 KT 有加重愈伤组织褐化的倾向。因此, 认为添加 MS-4 培养基适合南方红豆杉种胚愈伤组织的长期继代培养, 且能维持较高的紫杉醇量。但对于促进红豆杉

愈伤组织的生长及紫杉醇积累的 2, 4-D 和 6-BA 的最适浓度配比, 还需进一步详细研究。

2.3 不同外植体来源对愈伤组织生长及紫杉醇量的影响: 从南方红豆杉 (种胚、幼茎、幼芽)、曼地亚红豆杉 (种胚)、太平洋红豆杉 (种胚) 诱导出愈伤组织, 在 MS-4 培养基上继代培养。不同外植体来

源的愈伤组织在形态 (图 2)、生长速率以及紫杉醇量上都有较大差异 (表 3)。曼地亚红豆杉愈伤组织生长最快, 但其紫杉醇量最低。南方红豆杉种胚来源愈伤组织生长速率次于曼地亚红豆杉, 但其紫杉醇量最高, 并且南方红豆杉各外植体来源愈伤组织的紫杉醇量都比曼地亚和太平洋红豆杉愈伤组织高。



A 南方红豆杉 B 短叶红豆杉 C 曼地亚红豆杉

A- *T. chinensis* var. *mairei* B- *T. brevifolia* C- *T. media*

图 2 3 种红豆杉属来源的愈伤组织

Fig. 2 Callus from three different species of *Taxus* L.

表 3 不同红豆杉愈伤组织的生长特点和紫杉醇量的比较

Table 3 Comparison on growth characteristics and Taxol contents of calli derived from different explants

愈伤组织系来源	生长指数	紫杉醇量/ %	形态特点
南方红豆杉胚	4.878 ± 0.425 b	0.025 0 ± 0.0017 a	浅黄色, 颗粒状, 较分散
南方红豆杉幼茎	3.076 ± 0.511 c	0.0119 ± 0.0011 b	浅黄色至浅红色, 较分散
南方红豆杉幼芽	2.954 ± 0.503 c	0.0132 ± 0.0010 b	浅黄色至浅红色, 较分散
曼地亚红豆杉胚	6.249 ± 0.440 a	0.0020 ± 0.0005 d	灰白至浅黄, 高度分散, 湿沙状
太平洋红豆杉胚	2.737 ± 0.235 c	0.004 1 ± 0.0009 c	浅红色至褐色, 较致密

字母不同者表示相互间存在差异 ($P < 0.01$)

Values followed by different letters are significantly different at $P < 0.01$

2.4 不同外植体来源愈伤组织的紫杉醇合成相关基因的差异表达分析: 对以上 5 种不同外植体来源的愈伤组织, 通过半定量 RT-PCR 分析其紫杉醇合成相关基因的表达情况 (图 3)。结果表明, GGPPS、TASY、T10βH、DBAT、PAM 基因在南方红豆杉来源愈伤组织中表达水平高于曼地亚红豆杉和太平洋红豆杉愈伤组织。DBTNBT 在南方红豆杉种胚来源愈伤组织中表达水平最高。DBBT 在各愈伤组织中表达水平均较低, 并且在南方红豆杉的茎、芽来源愈伤组织系中极微量表达。TDAT、BAPT 在各愈伤组织中表达差异不明显。

3 讨论

3.1 利用红豆杉愈伤组织的异质性获得生长快、紫杉醇量高的愈伤组织: 研究表明, 不同红豆杉愈伤组织的生长及紫杉醇量存在较大差异^[1-16], 其原因包括: 愈伤组织诱导和继代培养的培养成分、培养条件不同, 同属不同种植物, 不同品种, 甚至是材料的采摘地、时间不同、愈伤组织的异质性及变异性等。陈

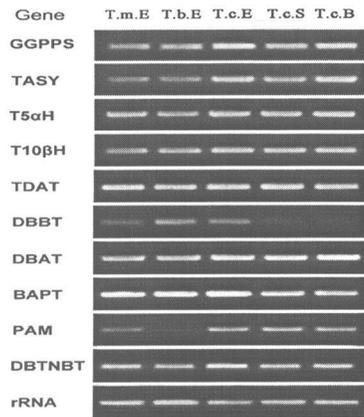


图 3 不同外植体来源的愈伤组织系紫杉醇合成相关基因的半定量 RT-PCR 分析

Fig. 3 Semiquantitative RT-PCR analysis of Taxol biosynthesis related genes from calli derived from different explants

惠等^[15]发现南方红豆杉野生母株幼芽的愈伤组织紫杉醇量较高, 可达 0.004%, 高于栽培母株幼茎来源愈伤组织。孙彬贤等^[25]对南方红豆杉、欧洲红豆杉、云南红豆杉和东北红豆杉悬浮培养细胞进行紫杉醇量的测定, 其中云南红豆杉量最高 (0.019%), 南方红豆杉量次之 (0.009%), 欧洲红豆杉量最低, 为 0.004%。陈永勤等^[26]比较了几种红豆杉愈伤组织紫杉醇的量, 发现云南红豆杉愈伤组织紫杉醇的量最高, 达到 0.023 6% 干质量, 但生长较慢, 生长指数为 1.477; 曼地亚红豆杉愈伤组织生长指数为 1.736, 紫杉醇量为 0.008 4%; 南方红豆杉愈伤组织中未检测出紫杉醇。本实验结果与以上文献报道有一定差异。曼地亚红豆杉愈伤组织生长速率最

高, 增殖倍数是 6 249, 但紫杉醇量最低, 仅为 0.002%。南方红豆杉种胚来源愈伤组织生长较快, 增殖倍数为 4.878, 紫杉醇量最高, 达到 0.027% 的干质量, 远高于以上文献报道。这表明, 野生南方红豆杉植株的成熟种胚作为外植体, 可获得生长较快、紫杉醇量高的愈伤组织。该类型愈伤组织通过细胞悬浮培养及筛选, 可获得优良的细胞株系, 为进一步的大规模发酵生产紫杉醇奠定基础。

3.2 紫杉醇积累与基因表达模式的关系: TASY 是紫杉醇合成的第一个关键酶^[16], 提高其 mRNA 和酶量水平将显著提高紫杉醇的量。Walker 等^[24] 通过 100 μmol/L 茉莉酸甲酯 (MJ) 处理东北红豆杉使其紫杉醇量提高, 并发现 MJ 处理后紫杉醇合成途径中的基因 GGPPS、TASY、T5αH、DBBT、DBAT、BAPT、T13αH、PAM、DBTNBT 表达上调, 而 TDAT 和 T10βH 上调不明显, 并且 BAPT 和 DBTNBT 的转录水平明显低于代谢途径中的其他酶基因, 这两个基因被认为是紫杉醇合成途径中的限速酶基因, 该实验中由于几乎全部紫杉醇合成相关基因表达上调, 因此不能确定对紫杉醇量提高起重要作用的基因。通过分析紫杉醇量有较大差异的愈伤组织之间紫杉醇合成相关基因的表达模式的差异, 探明紫杉醇合成相关基因对紫杉醇积累的影响, 在此方面的研究仍未见报道。

本实验发现不同愈伤组织的紫杉醇量与其合成途径中的 GGPPS、TASY、T10βH、DBAT、PAM、DBTNBT 基因的表达水平呈正相关, 表明这 6 个基因的高效表达促进了红豆杉愈伤组织中紫杉醇的积累。值得注意的是, 紫杉醇量低的太平洋红豆杉愈伤组织和紫杉醇量高的南方红豆杉愈伤组织相比, 前者 GGPPS、TASY、T5αH、T10βH 表达水平明显低于后者, 尤其是 PAM 在太平洋红豆杉中表达水平极低, 因此推测这些基因的低表达是太平洋红豆杉愈伤组织紫杉醇量低的主要原因。南方红豆杉幼茎、幼芽及种胚来源愈伤组织相比, DBTNBT 表达趋势: 种胚愈伤组织 > 幼茎愈伤组织 = 幼芽愈伤组织, 其他相关基因表达水平在三者中相近, 因此, 推测 DBTNBT 在种胚愈伤组织中高表达是其紫杉醇量高的一个主要原因。综上所述, 不同外植体来源愈伤组织紫杉醇量差异原因可能与不同外植体、不同基因型、愈伤组织的异质性, 紫杉醇合成途径中相关基因表达水平相关。

参考文献:

[1] 刘本叶, 叶和春, 立国凤. 抗癌新药紫杉醇的研究概况 [J].

植物学通报, 1995, 12(3): 8-14

- [2] 吴晓庆, 奇云. 抗肿瘤新药紫杉醇研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 1996, 17(3): 131-135
- [3] 赵锐, 赵玮玮. 抗癌植物药紫杉醇研究进展与动态 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1172-1172
- [4] 刘万宏, 姚波, 祝顺琴, 等. 紫杉醇前体生物合成途径及生物技术研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1327-1331
- [5] 罗建平, 牛炳韬, 罗敬芬, 等. 云南红豆杉培养细胞系的建立 [J]. 生物工程学报, 1997, 13(3): 326-330
- [6] 甘烦远, 郑光植, 彭丽萍, 等. 云南红豆杉细胞悬浮培养 [J]. 植物生理学报, 1997, 23(1): 43-46
- [7] 蔡朝晖, 高山林, 朱丹妮. 东北红豆杉愈伤组织的诱导、生长及紫杉醇含量测定 [J]. 药物生物技术, 1995, 2(3): 11-14
- [8] 李存芳, 刘勇, 董玖, 等. 南方红豆杉化学成分的研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1121-1132
- [9] 苏应娟, 王艇, 李雪雁, 等. 南方红豆杉不同部位紫杉醇含量的分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(2): 19-21
- [10] 陈惠, 王文科, 卢英梅, 等. 南方红豆杉外植体母株来源与培养基成分对愈伤组织生长和紫杉醇的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(5): 747-751
- [11] 张宗勤, 杨建英, 吴耀武. 南方红豆杉组织培养及紫杉醇的产生 [J]. 西北植物学报, 1998, 18(4): 488-492
- [12] 苏应娟, 王艇, 杨礼香, 等. 南方红豆杉芽愈伤组织的诱导和培养 [J]. 中草药, 2001, 32(7): 637-639
- [13] 赵芳, 倪良, 耿征, 等. 南方红豆杉组织培养研究. I. 愈伤组织诱导和培养条件优化 [J]. 中草药, 1999, 30(3): 213-215
- [14] 杨礼香, 周诗毅. 南方红豆杉组织培养和紫杉醇含量测定 [J]. 华中师范大学学报 (自然科学版), 2001, 35(4): 453-455
- [15] 陈惠, 王文科, 卢英梅, 等. 南方红豆杉外植体母株来源与培养基成分对愈伤组织生长和紫杉醇的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(5): 747-751
- [16] 盛长忠, 王淑芳, 王宁宁, 等. 南方红豆杉愈伤组织培养的研究 [J]. 中草药, 2000, 31(2): 130-132
- [17] 邱德有, 李如玉, 李玲, 等. 红豆杉及南方红豆杉体细胞胚胎发生的研究 [J]. 林业科学, 1998, 34(6): 50-54
- [18] Lee B S, Son S H. A method for producing taxol and taxanes from embryo cultures of *Taxus* species [P]. WO Patent, 95/02063, 1995-01-19.
- [19] 张长河, 梅兴国, 余江龙, 等. 红豆杉胚源细胞株的培养和紫杉醇的生产 [J]. 华中理工大学学报, 2000, 28(1): 82-84
- [20] Rodney C, Raymond E B, Robert M L. Taxol biosynthesis and molecular genetics [J]. *Phytochem Rev*, 2006, 5(1): 75-97
- [21] 甘烦远, 郑光植, 彭丽萍, 等. 高效液相色谱法测定红豆杉培养细胞中紫杉醇的含量 [J]. 色谱, 1996, 14(4): 306-307
- [22] 王志刚, 周春山, 颜家良, 等. HPLC 测定曼地亚红豆杉枝叶中紫杉醇含量 [J]. 应用化工, 2007, 36(1): 84-86
- [23] 刘志, 杨永华. CTAB 法提取中药材滇紫草细胞的总 RNA [J]. 生物技术通讯, 2004, 15(4): 372-373
- [24] Ezekiel N, Camille P D, Walker E L. Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering [J]. *Metab Eng*, 2006, 8(5): 385-394
- [25] 孙彬贤, 章国瑛, 刘涂, 等. 4 种红豆杉培养细胞的生长和紫杉醇含量的比较 [J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(4): 279-281
- [26] 陈永勤, 朱尉华, 吴蕴祺, 等. 不同种类红豆杉愈伤组织的诱导及紫杉醇含量的差异 [J]. 中草药, 2000, 31(3): 216-218