

罗勒发根的诱导及不同因子对发根生长及次生代谢产物的影响

杨世海¹, 杨慧洁², 闻玉莉¹

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学 教育技术中心, 吉林 长春 130118

摘要: 目的 探讨不同因子对罗勒 *Ocimum basilicum* 发根生长及次生代谢产物的影响。方法 用发根农杆菌 1025 感染罗勒叶片, 建立发根培养体系, 并利用紫外分光光度法测定不同培养时间及培养基中添加激素和诱导子后罗勒发根中多糖和总黄酮的量。结果 激动素(KT)为罗勒发根培养的最适外源激素; 茉莉酸甲酯(MeJA)对罗勒发根的生长有抑制作用, 但明显促进总黄酮的形成; 水杨酸(SA)对罗勒发根的生长影响不显著, 但对多糖和总黄酮的积累有明显促进作用。结论 5种外源激素和2种诱导子均能不同程度地影响罗勒发根的生长及次生代谢产物的积累, 为进一步筛选适宜的罗勒发根培养系统并调控次生代谢产物的研究奠定了基础。

关键词: 罗勒; 发根; 次生代谢产物; 激动素; 茉莉酸甲酯; 水杨酸

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)09-1841-05

Induction of hairy roots and effects of different factors on growth of hairy roots and secondary metabolites in *Ocimum basilicum*

YANG Shi-hai¹, YANG Hui-jie², WEN Yu-li¹

1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. Center of Education Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Key words: *Ocimum basilicum* L.; hairy roots; secondary metabolites; kinetin; methyl jasmonate; salicylic acid

罗勒 *Ocimum basilicum* L. 是唇形科一年生草本植物, 俗名毛罗勒、零陵香、兰香、千层塔、九层塔、香草, 也称防馊香菜、驱蚊草^[1-3]。能疏风解表、化湿和中、行气活血、解毒消肿, 主治感冒头痛、发热咳嗽、中暑、食积不化^[4]等。现代研究表明, 罗勒的成分主含挥发油类、总黄酮及其苷类、香豆素类, 此外还含有三萜类和生物碱类等成分^[5]。研究证实罗勒多糖具有降血糖和调血脂作用^[6], 较强的抗血小板及活血化瘀作用, 同时发现该药具有明显的抗肿瘤转移效果^[7-8]; 罗勒总黄酮类具有抗血栓作用^[9]。

近年来, 罗勒日益成为国内外医疗保健、食品、化工领域的研究热点。但由于工业需求的不断增长, 野生资源日益减少和栽培品种品质退化, 给临床使用和质量控制带来许多困扰。

发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 在植物遗传改造上有明显地增强次生代谢的作用, 通过发

根农杆菌感染天然植物遗传转化, 建立发根培养系统, 生产原植物中的次生代谢产物成为植物基因工程和细胞工程相结合的一项新技术^[10]。由于发根系统具有生长迅速、合成次生代谢产物能力强和遗传性状稳定等特点^[11], 越来越受到重视。利用发根农杆菌诱导发根生产次生代谢产物, 在其他植物上已有诸多报道^[10,12], 但尚未见有对罗勒的研究。本研究利用发根农杆菌侵染罗勒的无菌苗叶片诱导得到发根, 并考察不同因子对罗勒发根的生长及次生代谢产物生成的影响, 为进一步筛选适宜的罗勒发根培养系统并调控次生代谢产物的研究奠定了基础。

1 材料与仪器

样品采自吉林农业大学药用植物园, 经吉林农业大学中药材学院刘霞教授鉴定为罗勒 *Ocimum basilicum* L. 的种子, 置 4℃ 冰箱内保存备用。756 型紫外可见分光光度计 (上海光学仪器厂)。

收稿日期: 2012-02-17

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (20090461042)

作者简介: 杨世海 (1962—), 男, 吉林通榆人, 教授, 主要从事中药资源和中药生物技术研究。Tel: (0431)4533358 E-mail: jlyangs@163.com

网络出版时间: 2012-08-20 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120820.1034.002.html>

2 方法

2.1 无菌外植体的制备

挑选成熟饱满的罗勒种子,用无菌水清洗 3 次,75%乙醇消毒 40 s 后,无菌水清洗 3 次;用 0.1% HgCl_2 浸泡 10 min 后,无菌水冲洗 3 次,用无菌滤纸将种子表面的水分吸干,将种子接种到 MS 琼脂培养基中。在温度 25 °C,光强 2 000 lx,光照 12 h/d 条件下培养。待叶片完全张开后,作为遗传转化用的外植体。

2.2 发根农杆菌的活化

在无菌条件下,用接种针挑取保存菌液,于 YEB 固体平板上划线培养,28 °C 放置于暗培养条件下培养,直到长出单菌落。挑取一个单菌落接种于 20 mL 附加有卡那霉素 (Kan, 50 mg/L) 的液体酵母牛肉膏培养基 (YEB),28 °C,摇床 180 r/min 条件下培养 24 h 复苏。此时 YEB 液体培养基由接种前透明的红棕色变成浑浊的淡黄色,说明细菌已长出。长出的菌液还要进行再次活化,活化时取 0.6 mL 复苏菌液加入 30 mL YEB 液体培养基中,28 °C,180 r/min 培养 12 h,活化菌液达到对数生长期,此时菌液即可用于感染。

2.3 罗勒 Ri 质粒转化

在无菌条件下将罗勒无菌苗的幼嫩叶片剪成 0.5 cm² 大小的片段,放在 MS 固体培养基上黑暗中 25 °C 下预培养 2 d,将预培养后的叶片用活化好的发根农杆菌 1025 菌液感染 8 min,接种到原固体平板培养基上,于 25 °C 黑暗条件下共培养 2 d,再转接到含有 500 mg/L 头孢霉素 (Cef) 的 MS 固体平板培养基上进行除菌培养,每周转接 1 次,多次继代直至达到完全除菌后再去掉抗生素继续培养,转至液体培养基中建立发根培养体系,见图 1。液体培养基每瓶 (100 mL 三角瓶) 装培养液 50 mL,每瓶发根的接种量约为 0.4 g 鲜质量,培养温度为 (25±2) °C。在摇床上培养,每处理重复 3 次,21 d 后称取发根鲜质量,计算发根的增殖倍数。然后将发根置于 40 °C 烘干至恒质量,并保存备用。

2.4 罗勒 Ri 质粒转化根的鉴定

利用植物总 DNA 提取试剂盒提取罗勒和罗勒发根的总 DNA,用作 PCR 扩增试验的模板。在 PCR 扩增试验中,阳性对照为菌株 1025 的质粒 DNA 扩增产物,阴性对照为未转化植株 DNA 扩增产物,设计并合成扩增 *rolB* 的 PCR 引物。上游引物: 5'-GCTCTTGCACTGCTAGATTT-3'; 下游引物: 5'-



图 1 罗勒发根

Fig. 1 Hairy roots of *O. basilicum*

GAAGGTGCAAGCTACCT CTC-3'。反应总体积为 25 μL,PCR 扩增参数为: 94 °C 预变性 5 min,然后进行 30 个循环,每个循环包括 94 °C 变性 1 min、55 °C 复性 1 min 和 72 °C 延伸 1 min,最后 72 °C 延伸 10 min,并于 4 °C 保存。反应结束后,将扩增产物采用琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统成像,观察和分析实验结果。

2.5 罗勒发根生物量的测定

收获罗勒发根培养物,先用镊子取出根,挤净根中所含培养基,用分析天平称鲜质量。用蒸馏水漂洗 1 min,80 °C 烘干,称干质量。

2.6 罗勒发根中多糖的测定^[13-14]

2.6.1 标准曲线的绘制 准确称取经 105 °C 干燥至恒质量的葡萄糖 0.06 g 于 100 mL 烧杯中,加热溶解,移至 100 mL 量瓶中定容,取该溶液 10 mL 稀释至 100 mL,得 0.06 mg/mL 对照品溶液。取 10 支干净试管,分别加入对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL,加蒸馏水补至 2 mL。分别加入 1.0 mL 5% 苯酚和 5.0 mL 浓硫酸,在 80 °C 水浴加热 10 min,取出用冷水冷却至室温。测定在 490 nm 处的吸光度,以质量浓度为横坐标 (X),吸光度为纵坐标 (Y),绘制标准曲线,得回归方程 $Y=0.0139X+0.0074$, $r=0.9991$ 。

2.6.2 供试品溶液的制备 将在摇床上培养 21 d 经不同处理的罗勒发根取出,以没有任何处理的发根作为对照,用蒸馏水冲洗,用滤纸吸干发根表面的水分,置于 40 °C 干燥箱中烘干至恒质量,用研钵研碎,每次试验取 0.5 g,加入 20 mL 蒸馏水,置 80 °C 水浴锅上提取 3 h,滤过,提取 3 次,合并提取液,移至 100 mL 量瓶中,加蒸馏水至刻度,摇匀作贮备液。

2.6.3 样品中多糖量分析 精密吸取贮备液 2 mL,按标准曲线方法测定吸光度,按下式计算样品中多糖量。

$$\text{多糖量} = C \times V \times N / W$$

C 为从标准曲线上计算出的多糖质量浓度 (μg/mL), N 为稀释倍数, V 为加样体积 (mL), W 为发根干质量 (μg)

2.7 发根中总黄酮的测定^[15]

2.7.1 标准曲线的绘制 精确称取在 105 °C 干燥恒质量的芦丁对照品 10 mg 于 100 mL 量瓶中, 用无水甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.1 mg/mL 标准贮备液备用。精密量取上述溶液 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2、3.6 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成含芦丁 4~36 μg/mL 的系列对照品溶液。以甲醇为空白, 在 357 nm 波长处测定其吸光度, 以质量浓度为横坐标 (X), 吸光度为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y=0.246X-0.0169$, $r=0.9994$ 。

2.7.2 供试品溶液的制备 将在摇床上培养 21 d 经不同处理的罗勒发根取出, 以没有任何处理的发根作为对照, 用蒸馏水冲洗, 用滤纸吸干发根表面的水分, 置于 40 °C 干燥箱中烘干至恒质量, 用研钵研碎, 精密称取罗勒发根粉末 200 mg, 加甲醇 20 mL 浸泡 24 h, 超声提取 30 min, 滤过, 摇匀, 备用。

2.7.3 总黄酮的测定 精密吸取贮备液 2 mL, 按标准曲线方法测定吸光度, 按下式计算样品中总黄酮量。

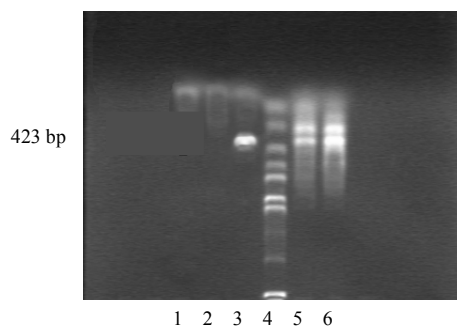
$$\text{总黄酮量} = C' \times V \times N / W$$

C' 为从标准曲线上算出的总黄酮质量浓度 (μg/mL)

3 结果与分析

3.1 PCR 检测结果

将凝胶置紫外透射仪下观察, 电泳结果见图 2。图 2 显示, 罗勒的发根总 DNA 中均能扩增到期望的 423 bp 左右的特异性 DNA 片段, 该片段与作为阳性对照菌株 1025 的 Ri 质粒 DNA 中扩增出的特异性片段大小是一致的, 而从罗勒非转化根中的总 DNA 中扩增不到此类片段。这说明发根农杆菌含



1、2-非转化根 3-发根农杆菌 1025 质粒 DNA 4-Marker 5、6-转化根
1 and 2-non-transformed roots 3-1025 plasmid DNA
of *A. rhizogenes* 4-Marker 5 and 6-transformed roots

图 2 发根的 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR results of hairy roots

有的 Ri 质粒 T-DNA 的生根基因已整合进入罗勒发根基因组中。

3.2 罗勒发根中多糖和总黄酮的动态积累

分别取培养 0、12、15、18、21、24、27、30 d 的发根, 称量鲜质量及干质量, 考察发根中多糖和总黄酮的动态积累情况, 结果见表 1。

表 1 不同培养时间对罗勒发根中多糖和总黄酮的影响

Table 1 Effects of different culture periods on polysaccharides and flavonoids in hairy roots of *O. basilicum*

培养时间 / d	多糖 / (μg·mg ⁻¹)	总黄酮 / (μg·mg ⁻¹)
0	27.004±0.615 8 gF	28.691 1±0.625 5 eE
12	108.354±2.216 3 fE	36.739 8±1.015 4 cdCD
15	132.547±0.395 1 eD	39.260 2±1.479 8 bcBC
18	160.173±2.071 9 cC	45.195 1±1.160 3 aA
21	192.115±1.253 7 aA	44.870 0±1.809 3 aA
24	172.547±1.378 6 bB	41.861 8±0.522 2 abAB
27	155.568±1.080 6 dC	36.170 3±0.435 8 cdCD
30	135.137±1.016 2 eD	34.829 3±1.957 5 dD

不同字母者为差异显著 ($P<0.05$), 下同

Different letters mean significant difference ($P<0.05$), same as below

由表 1 所示, 经过不同时间培养的罗勒发根中多糖和总黄酮的量差异显著 ($P<0.05$)。发根中多糖和总黄酮量随培养时间的增加而增加, 当达到一定时间后有所下降, 在培养 21 d 时多糖量达到最高值 192.115 μg/mg, 是原植物量的 7.1 倍。在培养 18 d 时总黄酮量达到最高, 略高于培养 21 d 的总黄酮量, 达到 45.195 1 μg/mg, 是原植物量的 1.5 倍。综合生物量和次生代谢产物量的变化, 确定发根较适合的收获时间为 21 d。

3.3 不同因素对罗勒发根生长及多糖和总黄酮量的影响

取相同质量除菌完全、生长速率快的发根分别在不同激素、不同诱导子的 1/2 MS 液体培养基中进行培养, 以不加任何激素的 1/2 MS 培养基作为对照, 考察各因素对发根的生长及多糖和总黄酮量的影响。

3.3.1 不同激素对发根生长及多糖和总黄酮合成的影响 培养基中加入 5 种激素 (6-BA、NAA、IBA、KT、ZT), 质量浓度为 0.1 mg/L, 以期找到适合罗勒发根生长及多糖和总黄酮合成的激素种类, 结果见表 2。

不同外源激素对发根的生长有不同的影响, 无外源激素处理的发根和经过外源激素 KT、ZT 处理

表 2 不同激素对罗勒发根生长及多糖和总黄酮量的影响

Table 2 Effects of different hormones on growth and content of polysaccharides and flavonoids in hairy roots of *O. basilicum*

激素类型	增长倍数	多糖 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)	总黄酮 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)
1/2 MS	35.082 3 $\pm$ 1.110 7 aA	192.115 $\pm$ 1.279 0 cAB	44.870 0 $\pm$ 0.907 0 dD
6-BA	28.816 2 $\pm$ 0.700 8 cB	121.079 $\pm$ 1.002 6 eD	82.748 0 $\pm$ 0.473 8 bB
NAA	29.233 3 $\pm$ 0.689 5 cB	154.892 $\pm$ 0.677 0 dC	75.756 1 $\pm$ 0.825 1 cC
IBA	31.553 2 $\pm$ 0.967 1 bcAB	195.180 $\pm$ 0.732 7 bAB	82.260 2 $\pm$ 0.748 0 bB
KT	33.662 7 $\pm$ 0.964 4 abA	198.777 $\pm$ 1.097 4 aA	90.390 2 $\pm$ 1.142 2 aA
ZT	33.493 8 $\pm$ 0.642 3 abA	156.331 $\pm$ 1.167 9 dC	76.243 9 $\pm$ 0.108 1 cC

的发根生长差异不显著,但经 IBA、NAA、6-BA 处理的发根生长差异显著 ($P<0.05$)。经过 KT、ZT 处理的发根生长旺盛,而经 IBA、NAA、6-BA 处理的发根生长缓慢,对发根的生长有轻微的抑制作用。罗勒发根中的多糖量比原植物 [(27.004 $\pm$ 1.066 8 $\mu\text{g}/\text{mg}$)] 显著提高,5 种激素对发根中多糖量没有明显的促进作用,但对总黄酮的积累有明显的促进作用 ($P<0.05$)。其中经 KT 处理的发根总黄酮量可达原植

物 [(28.691 1 $\pm$ 0.341 6 $\mu\text{g}/\text{mg}$)] 的 3.2 倍,是未加激素处理发根的 2 倍。综合生物量和次生代谢产物合成两方面,确定 KT 为罗勒发根培养最适外源激素。

3.3.2 不同诱导子对罗勒发根生长及多糖和总黄酮量的影响 在培养基中加入 3 种不同质量分数的茉莉酸甲酯 (MeJA) 和 4 种不同质量浓度的水杨酸 (SA),研究这两种诱导子对罗勒发根的生长以及多糖和总黄酮类化合物形成的影响,结果见表 3。

表 3 不同诱导子对罗勒发根生长及多糖和总黄酮量的影响

Table 3 Effects of different elicitors on growth and content of polysaccharides and flavonoids in hairy roots of *O. basilicum*

诱导子	$C / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	增殖倍数	多糖 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)	总黄酮 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)
1/2 MS	—	35.215 1 $\pm$ 0.540 5 aA	192.115 $\pm$ 1.279 0 eD	44.870 0 $\pm$ 0.877 3 fE
MeJA	50	26.585 9 $\pm$ 0.895 6 dC	203.453 $\pm$ 2.809 2 dC	88.601 6 $\pm$ 1.445 6 aA
MeJA	100	21.418 3 $\pm$ 0.811 4 eD	158.849 $\pm$ 1.783 6 fE	72.341 5 $\pm$ 0.964 3 deCD
MeJA	200	16.013 5 $\pm$ 0.864 4 fE	128.633 $\pm$ 2.846 6 gF	72.666 7 $\pm$ 1.526 3 deCD
SA	10	33.932 8 $\pm$ 0.589 4 abA	254.532 $\pm$ 4.034 7 aA	73.804 9 $\pm$ 1.174 3 cdCD
SA	20	34.284 9 $\pm$ 0.632 2 abA	223.597 $\pm$ 3.002 5 cB	83.561 0 $\pm$ 1.540 2 cB
SA	30	32.714 4 $\pm$ 1.098 9 bA	231.871 $\pm$ 2.324 6 bB	69.902 4 $\pm$ 0.828 0 eD
SA	40	29.643 6 $\pm$ 0.736 0 cB	223.237 $\pm$ 2.394 7 cB	76.081 3 $\pm$ 1.526 3 cC

由表 3 可以看出,不同诱导子对发根的生长有不同的影响,且差异极显著 ($P<0.01$)。MeJA 总体上对发根生长起到抑制作用,浓度越高,抑制作用越明显。低浓度可以促进多糖的积累,但是作用不是特别明显,当浓度高于 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时,对多糖的积累有明显的抑制作用。MeJA 对发根中总黄酮合成具有明显的促进作用,其中 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 作用最强,总黄酮量是原植物 [(28.691 1 $\pm$ 0.600 0 $\mu\text{g}/\text{mg}$)] 的 3.1 倍,是未加激素处理的 2 倍。SA 对发根生长的影响没有显著性差异,但对多糖和总黄酮的积累均有明显促进作用。其中浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 SA 可使多糖达到 254.532 $\mu\text{g}/\text{mg}$,是原植物多糖 [(27.004 3 $\pm$ 1.066 8) $\mu\text{g}/\text{mg}$] 的 9.4 倍,是未加激素

处理发根的 1.3 倍。20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SA 可使总黄酮达到 83.561 0 $\mu\text{g}/\text{mg}$,是原植物的 2.9 倍,是未加激素处理发根总黄酮量的 1.9 倍。因此,罗勒发根培养中添加适宜浓度的 SA 有利于多糖和总黄酮类化合物的产生。

4 讨论

植物激素是植物组织培养中的关键因子,不仅影响细胞生长,还影响细胞次生代谢产物的合成^[10,16]。Sudha 等^[17]利用发根农杆菌 ATCC15834 建立了罗芙木的发根培养系统,在含有 IBA 和 NAA 的 1/2 MS 培养基中获得的次生代谢产物阿马林和阿马里斯的产量高于不含激素培养基。于荣敏等^[18]发现外源激素 2, 4-D、NAA 和 6-BA 对何首乌发根的生长及蒽醌生物合成有较大影响。2, 4-D 对何首

乌发根的生长和蒽醌类化合物的生物合成有很强的抑制作用,而适量浓度的 NAA 和 6-BA 则可促进何首乌发根的生长及蒽醌类物质的生物合成。

诱导子作为一种信号分子^[19],可以引起植物的防卫反应。从细胞培养的角度来说,诱导子可以促进细胞产生目的产物。MeJA 是一种关键的信号化合物,广泛应用于生产植物细胞次生代谢产物^[20-21]。水杨酸是植物体内产生的一种简单酚类物质,其作为一种信号分子对一些重要的代谢过程起调控作用。近年来,愈来愈多的研究证明在植物次生代谢过程中,某些诱导子能作为一种特定的生化信号,快速、专一和有选择地诱导特定基因的表达,从而调节植物细胞次生代谢产物的合成。

本实验的 5 种外源激素和 2 种诱导子均能不同程度地影响罗勒发根的生长及次生代谢产物的积累,但是生物量的生长和次生代谢产物的增长倍数并不同步。各激素对发根生长的影响不是很明显,但都显著促进了总黄酮的积累,其中 KT 最为明显,其总黄酮量为未经处理的 2 倍;不同诱导子对发根的作用也不相同,MeJA 和 SA 都明显促进总黄酮的产生。但是 MeJA 强烈抑制了罗勒发根的生长,SA 对罗勒发根的生长影响不明显,但对多糖和总黄酮的积累有明显促进作用。

参考文献

- [1] 张吉通. 食用香味植物-罗勒 [J]. 吉林农业, 2002(12): 28.
- [2] 吕友东. 甜罗勒无公害栽培技术 [J]. 农家科技, 2006(4): 10.
- [3] 祝丽香. 罗勒的研究与开发应用 [J]. 北方园艺, 2005(1): 15-16.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997.
- [5] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [6] 陈峰, 谭银丰, 任守忠, 等. 罗勒水提物及其多糖在大鼠体内降血糖和降脂作用的研究 [J]. 海南医学院学报, 2011, 17(11): 1141-1144.
- [7] 曲迅, 郑广娟, 刘福利, 等. 罗勒多糖体内抗肿瘤转移作用的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 10(2): 138-140.
- [8] 曲迅, 杨美香, 郑广娟, 等. 罗勒多糖对肿瘤转移行为的影响 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2004, 11(1): 31-35.
- [9] 周文婷, 依把代提·托合提, 田树革, 等. 罗勒不同提取物对 3 种实验性血栓形成模型的影响 [J]. 中药材, 2010, 33(12): 1922-1925.
- [10] 刘高, 饶力群, 杨华. 影响毛状根生长及其次生代谢产物合成因素的研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2007, 18(5): 888-890.
- [11] 邱德有, 宋经元, 马小军, 等. 丹参毛状根生物反应器大规模培养的研究 [J]. 分子植物育种, 2004, 2(5): 699-703.
- [12] 罗成科, 彭正松, 蒲利民. 发根农杆菌介导的药用植物遗传转化 [J]. 生物技术, 2004, 14(11): 58-61.
- [13] 裴瑾, 万德光, 杨林. 苯酚-硫酸比色法测定远志及地上部分多糖的含量 [J]. 华西药学杂志, 2005, 20(4): 337-339.
- [14] 张治安, 张美善, 蔚荣海. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.
- [15] 帕丽达·阿不力孜, 丛媛媛, 赵文惠, 等. 紫外分光光度法测定罗勒黄酮含量 [J]. 中国民族医药杂志, 2006(5): 60-61.
- [16] Meyer H J, van Staden J. The *in vitro* production of an anthocyanin from cell cultures of *Oxalis linearis* [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 1995, 40: 55-58.
- [17] Sudha C G, Reddy O B, Ravishankar G A, *et al.* Production of ajmalicine and ajmaline in hairy root cultures of *Rauvolfia Micrantha* Hook f., a rare and endemic medicinal plant [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(8): 631-636.
- [18] 于荣敏, 马娜, 严春艳, 等. 外源激素对何首乌毛状根生长及蒽醌类成分生物合成的影响 [J]. 生物工程学报, 2006, 22(4): 619-623.
- [19] 赵鸿莲, 于荣敏. 诱导子在植物细胞培养中的应用研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(2): 152-156.
- [20] Choi D W, Jung J D, Ha Y I, *et al.* Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23: 557-566.
- [21] Lee M H, Jeong J H, Seo J W, *et al.* Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(8): 976-984.