

忽地笑愈伤组织培养条件对加兰他敏合成的影响

茹巧美¹, 裴真明^{1,2}, 郑海雷^{1*}

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 杜克大学 生物系, NC 27708, USA)

摘要: 研究了忽地笑次生代谢产物加兰他敏的合成以及各种理化因子对加兰他敏合成的影响。结果表明, 蔗糖是忽地笑愈伤组织培养的最佳碳源, 而且在 90 g/L 浓度培养下加兰他敏含量最高, 达到 0.068%; 附加 500 mg/L 苯丙氨酸前体物也可提高加兰他敏产量。酪氨酸和水杨酸不利于加兰他敏的积累。此外, 2,4-D 和浓度高于 0.5 mg/L 的 NAA、IBA 抑制加兰他敏的合成, 但高浓度的 6-BA 却对加兰他敏的合成起促进作用。

关键词: 忽地笑; 愈伤组织; 加兰他敏; 蔗糖; L-苯丙氨酸

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)03-0411-05

Effects of the culture conditions on galanthamine biosynthesis in *Lycoris aurea* calluses

RU Qiao-Mei¹, PEI Zhen-Ming^{1,2}, ZHENG Hai-Lei^{1*}

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Biology, Duke University, Durham, NC 27708, USA)

Abstract: The biosynthesis of galanthamine in callus culture of *Lycoris aurea* was studied. Some factors affected the biosynthesis of galanthamine were investigated. The results showed that sucrose was the best carbon source, and the concentration of 90 g/L was the most preferable for galanthamine production, which was reached to 0.068%. Meanwhile, adding 500 mg/L L-phenylalanine to medium, galanthamine content was also improved. Tyrosine and salicylic acid were not suitable for galanthamine accumulation in calluses. Besides, 2,4-D inhibited the biosynthesis of galanthamine. Moreover, NAA and IBA above 0.5 mg/L could restrain the production of galanthamine, but 6-BA treated with high concentration promoted the biosynthesis of galanthamine.

Key words: *Lycoris aurea*; callus; galanthamine; sucrose; L-phenylalanine

石蒜科植物具有较高的观赏价值和药用价值。其花型美观, 是一种很好的切花观赏植物; 其鳞茎中含有石蒜碱、伪石蒜碱、加兰他敏等多种生物碱, 大多具有阻止乙酰胆碱酶对乙酰胆碱分解的作用, 其中加兰他敏是最重要的一种。目前, 加兰他敏及衍生物用于预防和治疗老年性痴呆症(阿尔茨海默病)。尽管有加兰他敏有机合成的报道, 但大多数化学合成的路线长、收率低且要选用多种手性试剂, 条件苛刻, 因此成本非常昂贵, 合成同样剂量加兰他敏的成本与从天然植物中提取加兰他敏的成本不相上

下甚至略高(刘涛, 2006)。因此, 生物技术手段可以看作是生产加兰他敏的有效途径。忽地笑(*Lycoris aurea*)又名黄花石蒜, 属于石蒜科, 其鳞茎中含有较高的加兰他敏(干鳞茎加兰他敏含量为 0.034%) (卢艳花, 2005)。目前, 忽地笑组织培养再繁已有成功报道(王清等, 2006), 但培养条件对忽地笑愈伤组织中加兰他敏含量的影响还未见有报道。因此, 本文研究了改变忽地笑愈伤组织培养条件对加兰他敏含量的影响, 以期对忽地笑的细胞悬浮培养和工业化生产加兰他敏提供一定的科学依据。

收稿日期: 2008-01-02 修回日期: 2009-08-11

基金项目: 国家自然科学基金(30670317, 30271065, 39970438); 厦门大学新世纪优秀人才支持计划(0000-X07115)[Supported by National Natural Science Foundation of China(NSFC)(30670317, 30271065, 39970438); Program for New Century Excellent Talents in Xiamen University(NCETXMU X07115)]

作者简介: 茹巧美(1982-), 女, 浙江义乌人, 博士研究生, 主要研究方向为植物生理生化, (E-mail) ruqiaomei@xmu.edu.cn.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: Zhenghl@xmu.edu.cn)

1 仪器与试药

仪器:美国 Agilent 1100 型高效液相色谱仪,配在线脱气机、四元泵、柱温箱、二极管阵列检测器、化学工作站。试药:二氯甲烷、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯;加兰他敏对照品购于中国药品生物制品检定所;忽地笑选购于四川成都双流县成都市特色种业研究所,经厦门大学植物标本馆鉴定。

2 方法

2.1 忽地笑愈伤组织的诱导

选用生长健壮的忽地笑鳞茎,剥去鳞茎外褐色鳞皮及干鳞片,切除球颈及根系,先用 75% 乙醇表面消毒 30 s,再用 2% 次氯酸钠溶液消毒 30 min,无菌水冲洗 3 次,将鳞茎切成带鳞茎盘的双鳞片("two-scales")(Sellés, 1999)。培养基为 MS,附加 2 mg/L 2,4-D,蔗糖浓度为 30 g/L,琼脂为 8 g/L, pH 5.7。光照时间为 16 h/d, (25±1)℃ 温度下培养(Bergoñón 等, 1996)。每 2 周继代一次。

2.2 影响加兰他敏合成的因素调控

2.2.1 不同碳源及蔗糖浓度对加兰他敏合成的影响

不同碳源处理:对照组 MS 固体培养基中碳源与 MS 基本培养基中的相同,实验组中的碳源分别为 30 g/L 乳糖、30 g/L 果糖和 30 g/L 葡萄糖。处理方法是首先配制如上不同碳源的 MS 固体培养基,分装于三角瓶中,121℃ 灭菌 20 min,备用。然后取生长良好、颗粒均一及处理前统一在 MS 基本培养基中培养 2 周的愈伤组织,分别接入上述相应的培养基中培养,其它培养条件不变。不同蔗糖浓度处理:对照组 MS 固体培养基中蔗糖含量为 30 g/L,实验组中的蔗糖含量分别为 60 g/L、90 g/L、120 g/L 和 150 g/L。培养基分装灭菌和愈伤组织接种同上。

2.2.2 植物激素组合对加兰他敏合成的影响 实验中的植物激素配比及含量如表 1 所示。配制不同激素组合的 MS 固体培养基。培养基分装灭菌和愈伤组织接种同上。

2.2.3 添加附加物 在培养基中添加一定量的 L-苯丙氨酸(0、250、500、750、1 000 mg/L)、酪氨酸(0.1、0.5、1.0、5.0 mg/L)和水杨酸(0.1、1.0、5.0、10.0 mg/L)等附加物,以便探索加兰他敏的生物合

成途径。方法是首先配制与继代培养时相同的 MS 作为对照组;再分别配制 L-苯丙氨酸、酪氨酸和水杨酸的母液,用 0.22 μm 无菌型尼龙膜(Millipore)过滤消毒;分别取一定量相应前体的母液加入到已灭菌的 MS 固体培养基中。培养基分装灭菌和愈伤组织接种同上。2 周后统一取样。分别测定愈伤组织中加兰他敏的含量,每组每个样品设 3 个平行实验。

表 1 激素组合正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal test for phytohormones combination

水平 Levels	因素 Factors (mg/L)			
	2,4-D	6-BA	NAA	IBA
1	0	0.5	0	0
2	1	1	0.5	0.5
3	2	1.5	1	1

2.2.4 加兰他敏含量的测定 加兰他敏标准曲线的制作:精确称取加兰他敏对照品 12.5 mg 置 25 mL 容量瓶中,加入氨水 2~3 滴,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取溶液 0.5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL 和 6 mL, 分别用甲醇稀释至 10 mL, 摇匀,作为对照品溶液,分别进样,测定峰面积。以加兰他敏的色谱峰面积 A 和对照品溶液浓度(mg/mL)作线性回归分析,线性方程为: $y = 6.0656x - 24.701$, $R^2 = 0.9998$ 。加兰他敏含量的提取及测定:根据范华均等(2006)和 Bergoñón 等(1996)方法改进。准确称取 0.75 g 左右烘干的忽地笑愈伤组织,置于提取内罐中,再加入 15 mL 的甲醇溶剂,套上保护套,旋好外盖,放入 Mars-X 型微波炉中,在 85℃ 下提取 10 min。冷却后,取出提取内罐,将提取液过滤。过滤后母液旋转蒸干,用 15 mL 5% 的醋酸溶解,转移到分液漏斗中,用 10 mL 石油醚萃取 3 次,酸相用浓氨水调节 pH 8.0,再分别用 10 mL 氯仿萃取 3 次,合并氯仿层,旋转蒸发,用 0.5 mL 甲醇回溶,过 0.22 μm 有机滤膜,待测。色谱条件: Hypersil ODS 色谱柱(4.0 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为二氯甲烷-甲醇(100:8),流速 1.0 mL/min;柱温室温;紫外检测波长 235 nm;进样量 20 μL。

3 结果与分析

3.1 不同碳源及蔗糖浓度对加兰他敏合成的影响

实验选用了蔗糖、乳糖、果糖和葡萄糖作为碳

源,比较它们对忽地笑加兰他敏积累的影响,结果见图 1(a)。由图可见,4 种碳源对加兰他敏的合成有显著的影响。以蔗糖作为碳源,加兰他敏的合成量最大,为 0.035%。葡萄糖和果糖均显著抑制加兰他敏的合成。4 种碳源中,乳糖效果最差,严重抑制愈伤组织中的加兰他敏积累,其含量降低至 0.013%。此外,还设计了以蔗糖为单一碳源,对蔗糖浓度进行了考察,结果见图 1(b)。由图可以看到,在 30~90 g/L 范围内忽地笑愈伤组织的加兰他敏含量随初始蔗糖浓度增加而增加。蔗糖浓度达 90 g/L 时达到最大积累量,加兰他敏含量达到 0.068%,是初始蔗糖浓度培养下的 1.86 倍。但随着蔗糖浓度增加到 120 g/L 和 150 g/L,加兰他敏的累积却随蔗糖浓度增加而减少。

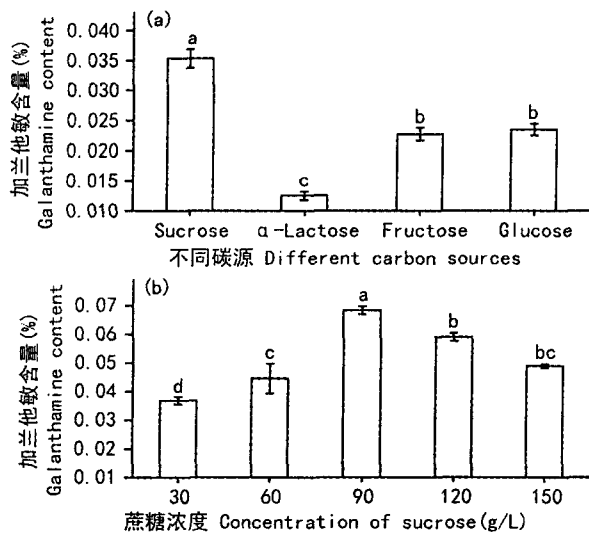


图 1 不同碳源(a)和蔗糖浓度(b)对忽地笑愈伤组织中加兰他敏合成的影响

Fig. 1 Effects of different carbon sources(a) and concentrations of sucrose(b) on the galanthamine biosynthesis of the *Lycoris aurea* callus

3.2 不同植物激素组合对加兰他敏合成的影响

激素的种类、含量及其配比对植物细胞的生长和新陈代谢起重要的调控作用,也对细胞次生代谢产物的积累有重要的影响。在我们的研究中,2,4-D,6-BA,NAA 和 IBA 四种激素各设 3 个梯度,按正交表设计试验,结果如表 2 所示:从极差来看,6-BA 对加兰他敏含量的影响程度最大,其次是 2,4-D,再次是 NAA,IBA 影响最小。从平均值来看,6-BA 浓度为 1.5 mg/L 最佳,2,4-D 浓度为 0 mg/L 最佳,NAA 浓度为 0.5 mg/L 最佳,IBA 的浓度为

0.5 mg/L 最佳。所以本次试验所得出的加兰他敏合成最佳组合是 MS+2,4-D(0)+6-BA(1.5)+NAA(0.5)+IBA(0.5)。

表 2 激素组合正交试验结果
Table 2 Results of orthogonal test for phytohormones combination

因素编号 Factors No.	2,4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	加兰他敏含量 ^a Galanthamine Content ^a (%)
1	0	0.5	0	0	0.0287
2	0	1	0.5	0.5	0.0422
3	0	1.5	1	1	0.0437
4	1	0.5	0.5	1	0.0257
5	1	1	1	0	0.0312
6	1	1.5	0	0.5	0.0435
7	2	0.5	1	0.5	0.0225
8	2	1	0	1	0.0320
9	2	1.5	0.5	0	0.0423
I	0.1146	0.0769	0.1042	0.1022	—
II	0.1004	0.1054	0.1102	0.1082	—
III	0.0968	0.1295	0.0974	0.1014	—
K1	0.0382	0.0256	0.0347	0.0341	—
K2	0.0335	0.0351	0.0367	0.0361	—
K3	0.0323	0.0432	0.0325	0.0338	—
R	0.0059	0.0175	0.00427	0.0023	—

^a 每个处理做 3 次重复,取其平均值

3.3 不同附加物对加兰他敏合成的影响

在植物组织培养过程中,人们经常采用在培养基中加入各类附加物,诱导子或前体的方法来增加培养物中有效成分的含量。我们选用了 L-苯丙氨酸、酪氨酸和水杨酸作为附加物,比较它们对忽地笑愈伤组织中加兰他敏含量的影响。

L-苯丙氨酸不仅是植物细胞内重要的原生代谢物质,而且是合成许多次生代谢物质的前体。实验结果也发现 L-苯丙氨酸对加兰他敏合成的影响较大。愈伤组织中加兰他敏的含量与添加浓度并不呈明显的线性关系:添加浓度为 500 mg/L L-苯丙氨酸对忽地笑愈伤组织中加兰他敏积累有明显的促进作用,达到 0.047%,比对照组提高 27%;添加其他浓度的 L-苯丙氨酸均显著抑制加兰他敏的积累。

酪氨酸是人们做植物组织培养时最常用的附加物之一,因此我们选用了酪氨酸作为忽地笑愈伤组织培养系的附加物,研究其对加兰他敏合成的影响。由图 2(b)可见,与对照相比,酪氨酸除 0.1 mg/L 处理对加兰他敏合成无明显抑制,0.5 mg/L,1.0 mg/L 和 5.0 mg/L 浓度处理均严重抑制加兰他敏的合成,分别下降为对照的 48%,43%和 40%。而且实验还

发现酪氨酸浓度高于 0.1 mg/L 处理时,愈伤组织发黑,褐化严重。

水杨酸是植物细胞内许多代谢物质合成的信号分子,对次生代谢产物有重要影响。本试验培养基中添加水杨酸对加兰他敏的合成具有明显的抑制作用,而且随着添加浓度的增加抑制效果愈加明显。同时发现在培养超过 10 d 后,愈伤组织开始发黑,濒临死亡,说明水杨酸对忽地笑愈伤组织具有毒性。

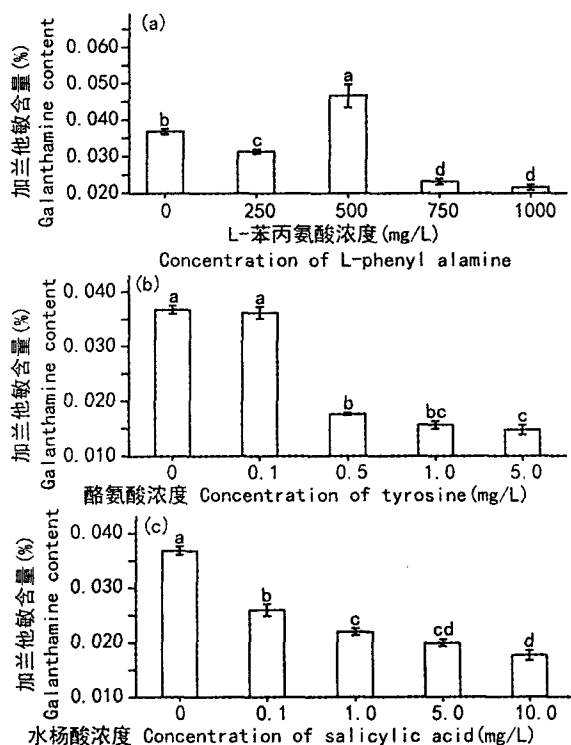


图 2 不同浓度 L-苯丙氨酸(a)、水杨酸(b)和酪氨酸(c)对忽地笑愈伤组织中加兰他敏合成的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of L-phenylalanine(a), tyrosine (b) and salicylic acid (c) on the galanthamine biosynthesis of the *Lycoris aurea* callus

4 讨论

20 世纪 50 年代初 Gautheret (1955) 首先对植物组织培养中的糖类进行研究,他以胡萝卜为材料研究组织生长的最适浓度和不同糖类的效应,结果表明蔗糖是最好的碳源。张娟芳等(2003)也报道蔗糖最适合作为印楝细胞悬浮培养生长的碳源。本试验结果表明,蔗糖作为忽地笑愈伤组织的碳源对加兰他敏的合成最为有利,这与大多数资料上显示的

蔗糖为最适糖源具有一致性。

蔗糖作为重要的碳源和能源,对植物离体细胞次生物质(莽草酸、花青苷、胡萝卜素、蒽醌等)合成代谢的影响规律相同,即浓度增加有利于次生物质的合成,但不同目的产物的适宜浓度不同,在 0~120 g/L 蔗糖浓度范围内,胡萝卜细胞茄红素含量随着蔗糖浓度的增加而增加(梁燕等,2003)。但 *Solantim aviculare* 悬浮培养中,30 g/L 的蔗糖或 30 g/L 的葡萄糖都严重抑制了类固醇和澳洲茄胺的合成;而 15~30 g/L 蔗糖浓度却没刺激类固醇的合成(Lindsey & Yeoman,1983)。因此,认为 90 g/L 的蔗糖是忽地笑愈伤组织培养的最佳碳源。这与 Sellés 等(1999)报道 *Narcissus confuses* 在 90 g/L 蔗糖浓度悬浮培养下加兰他敏含量最高一致。

生长调节物质通常是次生代谢产物积累的关键因素。一般情况是,低浓度的生长素有利于次生代谢和次生代谢产物的积累,而 2,4-D 被证实许多植物细胞培养生产次生代谢物质中起抑制作用,如杨属植物生产花青素、烟草中提取烟碱、紫草中提取紫草宁,消除或用吲哚乙酸、吲哚丁酸取代 2,4-D 能增加目的产物的产量(Rajendranl 等,1992)。我们也发现,2,4-D 对忽地笑愈伤组织加兰他敏积累有负影响,尤其是高浓度 2,4-D 明显抑制加兰他敏积累。同时,王康才等(1998)报道高浓度 NAA 对迷迭香酸甲酯和咖啡酸的合成具有一定的抑制作用,而 6-BA 对 NAA 具有一定的拮抗作用,这主要是因为较高浓度的生长素会抑制次生代谢途径中一些重要酶的活性,从而使产物的合成受阻(唐建军等,1999)。在忽地笑愈伤组织中,高浓度 NAA 对加兰他敏的合成也具有一定的抑制作用,但高浓度 6-BA 却对加兰他敏的合成起促进作用,这与王亚琴等(2007)报道高浓度 6-BA 抑制杜仲悬浮细胞生产桃叶珊瑚甙不一致,并没有与 NAA 表现出拮抗关系。

苯丙氨酸作为一种前体物质在 *Colblumei* 的细胞培养中能提高迷迭香酸的产量,同样在东北红豆杉的培养体系中加入苯丙氨酸对紫杉醇的产生也有明显的促进作用(陈永勤,1997)。本研究发现,L-苯丙氨酸的效果明显好于酪氨酸,这两种前体氨基酸对加兰他敏的影响明显不同,可能是经不同的途径转化为生物碱,前者是经历苯丙烷类途径,后者是经历酪氨酸途径。在忽地笑细胞正常代谢过程中,苯丙烷类途径中的苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine-ammonia-lyase)活性可能要高于酪氨酸途径中的酪

氨酸解氨酶(tyrosine-ammonia-lyase)。此外, Facchini(1996)报道茉莉酸能影响酪氨酸脱氢酶(tyrosine decarboxylase)的活性, 此酶在异喹啉和石蒜类生物碱的生物合成中起作用, 因此可能是通过酪氨酸途径产生加兰他敏的限制因子(Raúl 等, 2004), 而茉莉酸不影响苯丙氨酸解氨酶活性(Facchini, 1996)。因此, 我们也猜测苯丙氨酸和酪氨酸对忽地笑愈伤组织加兰他敏合成的影响还与体内茉莉酸生成是否被抑制有关。与其他报道水杨酸能够提高生物碱含量不一致(Pitta-Alvarez, 2000), 在本实验中水杨酸显著减少忽地笑愈伤组织的加兰他敏含量, 表明加兰他敏的生物合成被水杨酸抑制。Raúl 等(2004)在 *Narcissus confusus* 中也发现水杨酸抑制加兰他敏的合成, 可能因为水杨酸抑制加兰他敏途径中某些重要酶的活性, 阻碍了加兰他敏的产生。

5 结语

通过忽地笑愈伤组织培养条件对加兰他敏合成的研究中, 我们发现 90 g/L 的蔗糖和 500 mg/L 的 L-苯丙氨酸处理能分别使加兰他敏含量提高至 0.068% 和 0.048%, 是野外种植的 2 倍和 1.4 倍, 为建立忽地笑悬浮细胞体系生产加兰他敏提供了一定的理论依据。

参考文献:

- 卢艳花. 2005. 中药有效成分提取分离技术[M]. 北京: 化学工业出版社
- Bergoñón S, Codina C, Bastida J, et al. 1996. Galanthamine production in 'shoot-clump' cultures of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium[J]. *Plant Cell Tiss Org*, **45**:191-199
- Chen YQ(陈永勤), Zhu WH(朱蔚华). 1997. Tissue, cell and embryo culture of *Taxus* (红豆杉属植物的组织、细胞及胚培养)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **33**(3):213-219
- Deus-Neumann B, Zenlc MH. 1984. Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures[J]. *Planta Med*, **50**:427
- Facchini PJ, Johnson AG, Poupard J, et al. 1996. Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited *Opium poppy* cell cultures[J]. *Plant Physiol*, **111**:687-97
- Fan MH(范美华), Feng LL(冯玲玲), Peng Y(彭瑜), et al. 2004. Effects of nutritional factors on cell growth and total alkaloids formation in suspension cultures of *Pinellia ternate* Breit (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]. *J Central China Norm Univ; Nat Sci*(华中师范大学学报·自然科学版), **38**(4):493-496
- Fang HJ(范华均), Luan W(栾伟), Li GK(李攻科). 2006. Determination of alkaloids in *Lycoris radiata* with microwave-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography(微波辅助提取/HPLC 分析石蒜中的生物碱)[J]. *J Instrumental Analysis*(分析测试学报), **25**(3):27-30
- Gautheret RJ. 1955. The nutrition of plant tissue cultures[J]. *Ann Rev Plant Physiol*, **6**:433-484
- Liang Y(梁燕), Chen DM(陈大明), Wang M(王鸣), et al. 2003. Effects of culture medium factors on lycopene synthesis in carrot suspension cells(培养基对胡萝卜悬浮系茄红素合成代谢活性的影响)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **5**:545-548
- Liu T(刘涛), Qian C(钱超), Chen XZ(陈新志). 2006. Research on total synthesis of racemic galanthamine(外消旋加兰他敏全合成研究)[J]. *J Zhengzhou Univ; Eng Sci*(浙江大学学报·工学版), **40**(3):520-523
- Pitta-Alvarez SI, Spollansky TC, Giulietti AM. 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*[J]. *Enzyme Microb Tech*, **26**:252-258
- Rajendran L, Ravishankarg A, Venkataraman LV, et al. 1992. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* as influenced by nutrient stress and osmoticum[J]. *Biotechnol Lett*, **14**:707-714
- Raúl C, Francesc V, Jaume B, et al. 2004. Improved production of galanthamine and related alkaloids by methyl jasmonate in *Narcissus confusus* shoot-clumps[J]. *Plant Med*, **70**:180-188
- Sellés M, Viladomat F, Bastide J, et al. 1999. Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*; correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids[J]. *Plant Cell Rep*, **18**:646-651
- Tang JJ(唐建军), Xiang TF(项田夫), Zhang LY(张禄源), et al. 1998. Advances in researches of secondary metabolism, accumulation of secondary metabolites and its regulation *in vitro* (植物次生代谢, 离体培养条件下次生代谢物积累及其调控研究进展)[J]. *Chin Wild Plant Res*(中国野生植物资源), **17**(4):1-6
- Wang KC(王康才), Luo QY(罗庆云), Chen HX(陈红霞). 1998. Study on production of allochthonic formations in callus cells of *Salvia miltiorrhiza* (丹参愈伤组织中次生代谢产物形成的研究)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **23**(10):592-594
- Wang Q(王清), Peng F(彭菲), Xiao Y(肖艳). 2006. Tissue culture and plantlet regeneration of *Lycoris aurea* (黄花石蒜的组织培养和植株再生)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **42**(2):259
- Wang YQ(王亚琴), Zhu Y(朱媛). 2007. Studies on the cell suspension culture of *Eucommia ulmoides* and its metabolite-aucubin(杜仲细胞悬浮培养生产桃叶珊瑚甙的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **27**:236-239
- Zhang JF(张娟芳), Qi SY(戚树源), He ML(何梦玲), et al. 2003. Effects of several physiological factors on the growth of cell suspension culture of *Azadirachta indica* (几种生理因子对印楝细胞悬浮培养生长的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), **23**:549-552
- Zhao DX, Xing JM, Li MY, et al. 2001. Optimization of growth and jaceosidin production in callus and cell suspension cultures of *Saussurea maedusa*[J]. *Plant Cell Tiss Org*, **67**:227-234