

外源物质对新疆紫草毛状根次生代谢产物含量的影响

葛素因¹, 张生翾¹, 王芳^{1,*}, 魏欢¹, 谢文磊¹, 谢建¹, 李驰¹, 赵胡^{2,*}
(1.新疆农业大学农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2.阜阳师范学院生物与食品工程学院, 安徽 阜阳 236037)

摘要:目的: 探讨不同外源物质对新疆紫草毛状根中次生代谢产物含量的影响。方法: 采用分光光度法测定AgNO₃、L-苯丙氨酸、乙酸钠影响下新疆紫草毛状根提取物中次生代谢产物的含量。结果: AgNO₃质量浓度为5 mg/L时, 毛状根中紫草素、总多酚及总黄酮的含量分别较对照提高了5、0.3倍和0.8倍, 而花青素的含量在AgNO₃质量浓度为3 mg/L时达峰值, 较对照提高了0.4倍。在AgNO₃质量浓度为5 mg/L前提下, L-苯丙氨酸质量浓度为25 mg/L时, 紫草素、花青素及总黄酮的含量均达峰值, 分别较对照提高了0.3、1.4倍和1.2倍。而总多酚含量虽然并未高于对照组, 但是在各个处理中仍然含量最高。在AgNO₃、L-苯丙氨酸质量浓度分别为5、25 mg/L时, 总多酚和紫草素含量均在乙酸钠质量浓度为50 mg/L时达到最高, 花青素的含量在乙酸钠质量浓度为200 mg/L时达到最高, 而乙酸钠不同处理的毛状根中总黄酮含量均明显低于对照。结论: 外施一定质量浓度的诱导子AgNO₃及AgNO₃和L-苯丙氨酸的联合作用均能促进新疆紫草毛状根次生代谢产物的积累; 外施一定质量浓度的AgNO₃、L-苯丙氨酸及乙酸钠可协同促进毛状根中总多酚、花青素和紫草素的积累, 但显著抑制总黄酮的合成积累。

关键词: 新疆紫草; 毛状根; 次生代谢产物; 诱导子; 前体物质

Effects of Exogenous Substances on the Content of Secondary Metabolites in *Arnebia euchroma* Johnst Hairy Roots

GE Sunan¹, ZHANG Shengxuan¹, WANG Fang^{1,*}, WEI Huan¹, XIE Wenlei¹, XIE Jian¹, LI Chi¹, ZHAO Hu^{2,*}
(1. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Ürümqi 830052, China;
2. School of Biotechnology and Food Engineering, Fuyang Normal College, Fuyang 236037, China)

Abstract: Objective: To investigate the effects of different exogenous substances on the content of secondary metabolites in *Arnebia euchroma* Johnst hairy roots and consequently provide a theoretical basis for further development and utilization of *Arnebia euchroma* Johnst hairy roots. Methods: The contents of secondary metabolites were measured by spectrophotometry from *Arnebia euchroma* Johnst hairy roots cultured in the presence of AgNO₃ alone and in combination with L-phenylalanine or L-phenylalanine plus sodium acetate. Results: The contents of shikonin, total polyphenols and total flavonoids in hairy roots cultured for 30 days at an AgNO₃ concentration of 5 mg/L respectively increased by 6, 1.3, 1.8 times compared with the control (CK). In addition, when AgNO₃ concentration was 3 mg/L, the anthocyanin content reached its peak, a 1.4-fold increase over the control. Peak contents of shikonin, anthocyanins and total flavonoids were observed after culture in the presence of both 25 mg/L L-phenylalanine and 5 mg/L AgNO₃, which were increased by 1.3, 2.4 and 2.2 times, respectively, compared with the CK. The content of total polyphenols was not higher than that in the CK, but it was still the highest among three treatment groups. The contents of shikonin and total polyphenols reached their highest levels at 50 mg/L among different sodium acetate concentrations combined with 5 mg/L AgNO₃ and 25 mg/L L-phenylalanine, whereas the highest content of anthocyanin was observed when the sodium acetate concentration was 200 mg/L. The content of total flavonoids in hairy roots with sodium acetate treatments at various concentrations was significantly lower than that of the control. Conclusion: The addition of AgNO₃ and L-phenylalanine can cooperatively promote the accumulation of secondary metabolites in *Arnebia euchroma* Johnst hairy roots. Meanwhile, AgNO₃, L-phenylalanine and sodium acetate can cooperatively promote the accumulation of shikonin, polyphenol and anthocyanin, but significantly inhibit the accumulation of total flavonoids.

收稿日期: 2015-05-18

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31060205); 阜阳师范学院自然科学研究项目(2013FSKJ04ZD)

作者简介: 葛素因(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物细胞工程。E-mail: 940747841@qq.com

*通信作者: 王芳(1962—), 女, 教授, 硕士, 研究方向为植物细胞工程。E-mail: Wangfang1hao@126.com

赵胡(1977—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为植物次生代谢调控。E-mail: zhaohu8196@sina.com

Key words: *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst; hairy roots; secondary metabolites; elicitor; precursor

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201609030

中图分类号: Q943.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 09-0160-05

引文格式:

葛素因, 张生翊, 王芳, 等. 外源物质对新疆紫草毛状根次生代谢产物含量的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(9): 160-164.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201609030. <http://www.spkx.net.cn>

GE Sunan, ZHANG Shengxuan, WANG Fang, et al. Effects of exogenous substances on the content of secondary metabolites in *Arnebia euchroma* Johnst hairy roots[J]. Food Science, 2016, 37(9): 160-164. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201609030. <http://www.spkx.net.cn>

毛状根培养是获得有用次生代谢产物的重要途径之一。近年来, 培养珍贵药用植物毛状根以获取次生代谢产物已成为研究热点。杨世海^[1]、何含杰^[2]、谈荣慧^[3]等分别培养决明的蒽醌类化合物、三裂叶野葛的总异黄酮和葛根素、丹参的丹酚酸等均获成功。但利用毛状根生产药物依然存在次生代谢产物产量低、生产成本高的问题, 因此, 深入研究植物细胞中次生代谢产物合成的高产调控机理具有重要的理论和实际意义。

诱导子被认为是提高植物细胞和组织培养中次生代谢产物最有效的途径之一。茉莉酸可促进长春花毛状根中吲哚生物碱的生物合成^[4]。真菌诱导子可提高黄芩毛状根中黄芩苷的含量^[5], 也可影响人参毛状根中人参皂苷的生物合成^[6]。同时, 随着植物次生代谢产物合成途径的深入研究, 添加前体物质也成为提高目的产物的有效手段。苯丙氨酸是一个代谢中间体, 它是合成类黄酮、苯丙素类、香豆素类、木质素类、萜醌类等多种次生代谢物质的前体^[7]。Fettner等^[8]在红豆杉细胞培养中加入前体物质苯丙氨酸能使紫杉醇含量提高5倍。乙酸钠是黄酮类化合物合成的前体物质之一, 1 mmol/L乙酸钠能够促进红豆杉细胞中紫杉烷的合成^[9]。培养基中添加硝酸银和酵母提取物对不定根中雷公藤甲素的合成具有明显的促进作用^[10]。表明多个诱导子或诱导子与前体物质共同作用, 可大大提高毛状根次生代谢产物的产量。

新疆紫草毛状根中添加真菌诱导子^[11]、茉莉酸甲酯^[12]、乙烯^[13-14]及 Ag^+ ^[15]均可促进紫草素及其衍生物的合成, *L*-苯丙氨酸对紫草细胞中紫草素的积累也有明显促进作用^[16], 但未见诱导子及前体物质的联合作用对新疆紫草毛状根次生代谢产物含量影响的研究报道。本研究探讨 AgNO_3 、*L*-苯丙氨酸及乙酸钠协同作用对新疆紫草毛状根次生代谢产物含量的影响, 为深入研究紫草素合成的代谢调控以及相关分子机制及运用细胞工程技术大量生产紫草素及其衍生物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新疆紫草毛状根为1号根系^[17], 由新疆农业大学农学院王芳课题组提供。

芦丁标准品 国药集团化学试剂有限公司; 无水乙醇 新疆乌市化学试剂厂; 亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、酒石酸钾钠、磷酸氢二钠、硝酸银、*L*-苯丙氨酸、乙酸钠(均为分析纯) 北京化工厂。

1.2 仪器与设备

循环水式真空泵、旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 721型紫外分光光度计 上海隆拓仪器设备有限公司; 恒温水浴锅 南京科尔仪器设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 毛状根的生长

称取0.5 g生长状况良好的毛状根接种于装有50 mL SH培养基^[18]的250 mL锥形瓶中, 温度25℃、转速(100±10) r/min条件下暗培养30 d后, 待用。

1.3.2 AgNO_3 处理新疆紫草毛状根

称取来自SH培养基中培养的毛状根5 g, 接于M9培养基^[18]中, 附加 AgNO_3 0、1、3、5、7 mg/L, 培养30 d后, 进行成分测定。

1.3.3 AgNO_3 及*L*-苯丙氨酸联合处理新疆紫草毛状根

在1.3.2节最佳条件(5 mg/L Ag^+)基础上, 将毛状根接于M9培养基附加*L*-苯丙氨酸0、25、50、75、100 mg/L的培养基中, 培养30 d后进行成分测定。

1.3.4 AgNO_3 、*L*-苯丙氨酸及乙酸钠联合处理新疆紫草毛状根

在1.3.3节最佳条件(5 mg/L Ag^+ +25 mg/L *L*-苯丙氨酸)基础上, 将毛状根接于M9培养基附加乙酸钠0、25、50、75、100 mg/L的培养基中, 培养30 d后进行成分测定。

1.3.5 总黄酮的提取及含量测定

1.3.5.1 芦丁标准对照品溶液的制备及其标准曲线回归方程的建立

参照张桂等^[19]方法。以芦丁质量浓度为横坐标, 波长为510 nm的吸光度(*A*)为纵坐标, 绘制标准曲线, 并计算回归方程。芦丁质量浓度与吸光度的回归方程式为 $y=11.227 0x+0.005 8$ ($R^2=0.995 6$)。结果表明, 芦丁质量浓度在0~0.05 mg/mL范围内, 与吸光度成良好的线性关系。

1.3.5.2 供试品提取溶液的制备及样品含量测定

参照杨春霞等^[20]的方法。在波长510 nm处,以空白溶液校正基线,测定供试液的吸光度,代入回归方程,计算样品溶液中总黄酮的含量。

$$\text{总黄酮含量}/(\text{mg/g}) = \frac{\text{样品中总黄酮质量浓度}/(\text{mg/mL}) \times \text{浸提液稀释倍数} \times \text{浸提液总体积}/\text{mL}}{\text{样品干质量}/\text{g}} \quad (1)$$

1.3.6 花青素的提取及相对含量的测定

参照Weiss等^[21]的方法。以 $A_{\text{校}}$ 表示样品中花青素的相对含量/(mg/g),样品质量为干质量。

$$A_{\text{校}} = A_{530 \text{ nm}} - 0.25A_{657 \text{ nm}} \quad (2)$$

1.3.7 总多酚的提取及含量测定

总多酚的提取采用水浴提取法。总多酚含量测定采用酒石酸亚铁分光光度法,在540 nm波长处测定吸光度(A)。

$$\text{总多酚含量}/\% = \frac{A \times 7.826}{1000} \times \frac{V_{\text{总}}}{V \times m} \times 100 \quad (3)$$

式中: A 为样液的吸光度; $V_{\text{总}}$ 为供试液总量/mL; V 为吸取的供试液体积/mL; m 为样品干质量/g;7.826为吸光度为1.00时的茶多酚含量的经验值/(mg/mL)。

1.3.8 紫草素的提取及含量测定

采用中国药典中记载的测定羟基萘醌总色素的方法测定紫草素含量^[18]。具体方法:取培养一定时间的愈伤组织适量,于50℃烘箱中干燥3 h,粉碎,精密称取0.5 g,置100 mL容量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,4 h内不断振摇,过滤,精密吸取滤液5 mL于25 mL容量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀。采用分光光度法在516 nm波长处测定吸光度,按左旋紫草素($\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$)的吸收系数为242计算。

$$\text{紫草素含量}/\% = \frac{A_{516 \text{ nm}}}{242} \times 10 \quad (4)$$

1.4 数据处理

每份样品各重复3次提取测定。采用Microsoft Excel和SPSS 16.0统计分析软件对数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 AgNO_3 对毛状根次生代谢产物含量的影响

将毛状根接种于M9培养基中,图1、2结果显示,毛状根中次生代谢产物的含量均随 AgNO_3 质量浓度的增加呈先升后降趋势,其中紫草素、总多酚及总黄酮的含量均在 AgNO_3 质量浓度为5 mg/L时达峰值,分别较对照提高了5、0.3倍和0.8倍,而花青素的含量在 AgNO_3 质量浓度为3 mg/L时达峰值,较对照提高了0.4倍。当 AgNO_3 质量浓度过高时,毛状根中紫草素、总多酚、总黄酮及花青素的含量均大幅降低,表明 AgNO_3 对毛状根次生代谢产物的产出有一定的影响,其中 AgNO_3 质量浓度为5 mg/L时呈现较高的促进作用。

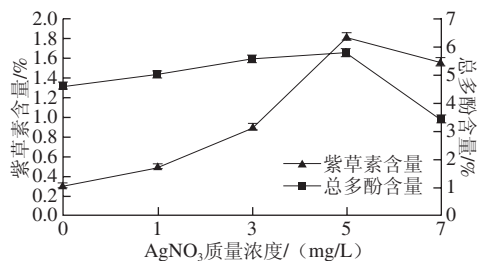


图1 AgNO_3 对毛状根中紫草素及总多酚含量的影响

Fig. 1 Effect of AgNO_3 on the contents of shikonin and total polyphenols in *Arnebia euchroma* Johnst hairy roots

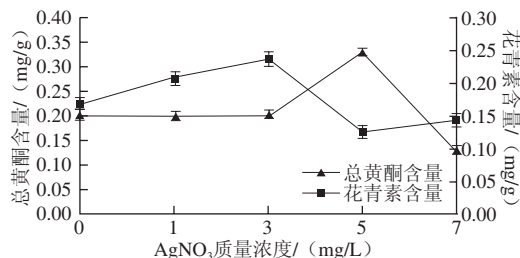


图2 AgNO_3 对毛状根中总黄酮及花青素含量的影响

Fig. 2 Effect of AgNO_3 on the contents of total flavonoids and anthocyanins in *Arnebia euchroma* Johnst hairy roots

2.2 AgNO_3 及L-苯丙氨酸联合作用对毛状根次生代谢产物含量的影响

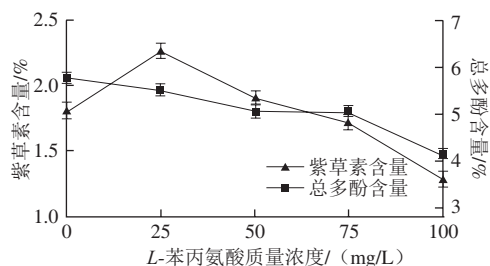


图3 AgNO_3 及L-苯丙氨酸联合作用对毛状根中紫草素及总多酚含量的影响

Fig. 3 Combined effects of AgNO_3 and L-phenylalanine on the contents of shikonin and total polyphenols in *Arnebia euchroma* Johnst hairy roots

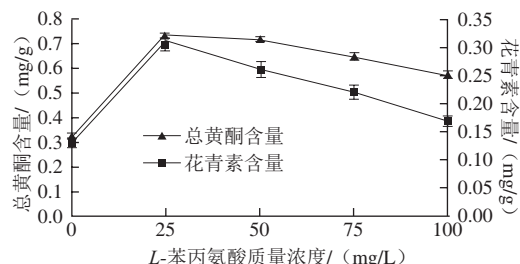


图4 AgNO_3 及L-苯丙氨酸联合作用对毛状根中总黄酮及花青素含量的影响

Fig. 4 Combined effect of AgNO_3 and L-phenylalanine on the contents of total flavonoids and anthocyanins in *Arnebia euchroma* Johnst hairy roots

在2.1节实验结果基础上,考察L-苯丙氨酸对毛状根次生代谢产物含量的影响,图3、4结果表明,毛状根次生代谢产物的含量均随L-苯丙氨酸质量浓度的增加呈先升高后降低趋势,当L-苯丙氨酸质量浓度为25 mg/L时,紫草素、花青素及总黄酮的含量均达峰值,均显著高于对照($P<0.05$),分别较对照提高了0.3、1.4倍和1.2倍。而总多酚含量虽然并未高于对照组,但是在各个处理中仍然含量最高。说明在 AgNO_3 质量浓度为5 mg/L前提下,L-苯丙氨酸为25 mg/L时,对毛状根次生代谢产物的积累有明显促进作用,高质量浓度起抑制作用。说明添加一定量的 AgNO_3 及L-苯丙氨酸可协同促进毛状根中次生代谢产物的积累。

2.3 AgNO_3 、L-苯丙氨酸及乙酸钠联合作用对毛状根次生代谢产物含量的影响

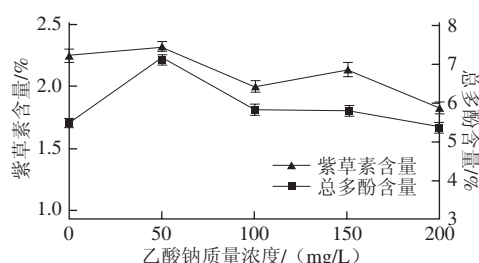


图5 AgNO_3 、L-苯丙氨酸及乙酸钠联合作用对毛状根中紫草素及总多酚含量的影响

Fig. 5 Combined effect of AgNO_3 , L-phenylalanine and sodium acetate on the contents of shikonin and total polyphenols in *Arnebia euchroma* Johnst hairy roots

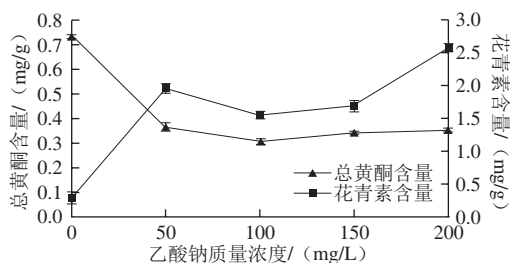


图6 AgNO_3 、L-苯丙氨酸及乙酸钠联合作用对毛状根中总黄酮及花青素含量的影响

Fig. 6 Combined effect of AgNO_3 , L-phenylalanine and sodium acetate on the contents of total flavonoids and anthocyanins in *Arnebia euchroma* Johnst hairy roots

在2.2节实验结果基础上,考察乙酸钠对毛状根次生代谢产物含量的影响,图5、6结果表明,在乙酸钠不同质量浓度处理下,毛状根中总多酚和花青素的含量均高于对照组,其中总多酚含量随着乙酸钠质量浓度增高而增大,在乙酸钠质量浓度为50 mg/L时达到最高;花青素的含量在乙酸钠质量浓度为200 mg/L时达到最高,且各个质量浓度处理间存在显著差异($P<0.01$)。当

乙酸钠质量浓度为50 mg/L时紫草素含量较对照提高1倍($P<0.05$)。乙酸钠不同处理的毛状根中总黄酮含量均明显低于对照($P<0.01$),说明乙酸钠抑制毛状根中总黄酮的积累。综上所述,同时添加一定量的 AgNO_3 、L-苯丙氨酸及乙酸钠可协同促进新疆紫草毛状根中总多酚、花青素和紫草素的积累,但显著抑制总黄酮的合成积累。

3 讨论

由于紫草素及其衍生物的合成呈非偶联型,即紫草素及其衍生物在毛状根生长停止后才进行合成的,故新疆紫草毛状根的培养采用二阶段培养法:第一阶段为生长阶段,主要目的是为了提高或增加毛状根的生物产量,其适宜的培养基为SH^[18],第二阶段为生产阶段,主要目的是为了促进毛状根积累紫草素及其衍生物,其适宜的培养基为M9^[18]。本研究着重考察了第二阶段即毛状根生产阶段, AgNO_3 、L-苯丙氨酸、乙酸钠影响下新疆紫草毛状根提取物中次生代谢产物的含量。

许多研究表明真菌菌丝体等或其他金属离子等诱导剂可促进植物毛状根合成和积累次生代谢物^[22-24]。尹雅乐等^[25]研究发现5 $\mu\text{mol/L}$ Ag^+ 处理能够显著促进紫草素的合成。本研究结果表明,5 mg/L的 Ag^+ 使得新疆紫草毛状根的紫草素及其衍生物含量提高了5倍,结果与前人一致。

前人研究发现,L-苯丙氨酸可促进葡萄细胞中花青素的积累^[26],苯丙氨酸前体与茉莉酸甲酯的联合作用也可显著提高葡萄细胞中花青素含量^[27]。本研究结果表明,添加一定量的 AgNO_3 及L-苯丙氨酸可协同促进毛状根中紫草素及其衍生物、总黄酮及花青素含量的提高,进一步阐明了诱导子与前体物质的联合作用的效应。

研究表明乙酸钠作为黄酮类化合物合成的前体物质之一可促进甘草细胞中总黄酮的合成积累^[28],但也有研究认为L-苯丙氨酸和乙酸钠共同使用对银杏细胞中黄酮的合成无明显促进作用^[29]。本研究中,当 AgNO_3 质量浓度为0 mg/L时,总黄酮含量为0.2 mg/g,当 AgNO_3 质量浓度为5 mg/L时,总黄酮含量为0.329 mg/g,当5 mg/L AgNO_3 +25 mg/L L-苯丙氨酸时,总黄酮含量为0.731 mg/g,由此可见,单独添加5 mg/L AgNO_3 及 AgNO_3 与L-苯丙氨酸共同作用均有利于总黄酮的积累。但是,同时添加一定量的 AgNO_3 、L-苯丙氨酸及乙酸钠却显著抑制总黄酮的合成积累,是否与本实验选用乙酸钠质量浓度过高有关,有待进一步研究。

本研究明确了一定质量浓度的诱导子 AgNO_3 及 AgNO_3 和前体物质L-苯丙氨酸的联合作用均能够促进新疆紫草毛状根次生代谢产物的积累;添加一定质量浓度的 AgNO_3 、L-苯丙氨酸及乙酸钠可协同促进毛状根中总

多酚、花青素和紫草素的积累。本结果为进一步深入研究诱导子及前体物质对新疆紫草毛状根有效成分及次生代谢物的影响以及相关分子机制提供了理论依据和实验基础,对工厂化生产新疆紫草毛状根有价值的药用成分具有重要意义。

参考文献:

- [1] 杨世海, 刘晓峰, 果德安, 等. 决明毛状根诱导及激素与诱导子对毛状根生长和蒽醌类化合物合成的影响[J]. 中草药, 2005, 36(5): 752-756. DOI:10.3321/j.issn:0253-2670.2005.05.047.
- [2] 何含杰, 梁朋, 施和平. 蔗糖和光对三裂叶野葛毛状根生长及次生物质产生的影响[J]. 生物工程学报, 2005, 21(6): 1003-1007. DOI:10.3321/j.issn:1000-3061.2005.06.027.
- [3] 谈荣慧, 张金家, 赵淑娟. 丹参毛状根的诱导及培养条件的优化[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 3048-3052.
- [4] RIJHWANI S K, SHANKS J V. Effect of elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root cultures[J]. Biotechnology Progress, 1998, 14(3): 442-449. DOI:10.1021/bp980029v.
- [5] 齐香君, 郭乐康, 陈微娜. 诱导子对黄芩毛状根生长及黄芩苷合成的影响[J]. 中草药, 2009, 40(5): 801-803. DOI:10.3321/j.issn:0253-2670.2009.05.041.
- [6] LIU Jun, DING Jiayi, ZHOU Qianyun, et al. Studies on influence of fungal elicitor on hairy root of *Panax ginseng* biosynthesis ginseng saponin and biomass[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2005, 29(4): 302-305.
- [7] 王升, 李璇, 蒋超, 等. 紫草素及其衍生物合成相关基因及信号传导研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(6): 1219-1225.
- [8] FETTNETO A G, MELANSON S J, NICHOLSON S A. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino feed to cell cultures of *Taxus cuspidate*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44(8): 967-971. DOI:10.1002/bit.260440813.
- [9] ZHOU Zhongqiang, MEI Xingguo. Enhancement of Taxanes production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* by precursor-feeding[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2005, 25(3): 51-54.
- [10] 李琰, 赵磊, 崔蕾, 等. 诱导子对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响[J]. 生物工程学报, 2015, 31(8): 1-10. DOI:10.13345/j.cjb.140449.
- [11] 张璞, 王芳, 朱查山. 真菌诱导子与吸附树脂对新疆紫草毛状根中蒽醌积累的影响[J]. 生物工程学报, 2013, 29(2): 214-223. DOI:10.13345/j.cjb.2013.02.006.
- [12] YAZAKI K, TAKEDA K, TABATA M. Effects of methyl jasmonate on shikonin and dihydroechinofuran production in *Lithospermum* cell cultures[J]. Plant and Cell Physiology, 1997, 38(7): 776-782. DOI:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029235.
- [13] TOUNO K, TAMAOKA J, OHASHI Y, et al. Ethylene induced shikonin biosynthesis in shoot culture of *Lithospermum erythrorhizon*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43(2): 101-105. DOI:10.1016/j.plaphy.2005.01.004.
- [14] 方荣俊, 赵华, 廖永辉, 等. 乙烯对植物次生代谢产物合成的双重调控效应[J]. 植物学报, 2014, 49(5): 626-639. DOI:10.3724/SP.J.1259.2014.00626.
- [15] 黄文虎, 葛锋, 刘迪秋, 等. 紫草次生代谢物生物学活性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(28): 15592-15593; 16074. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2010.28.056.
- [16] 胡立勇. 紫草细胞培养生产紫草素的研究[J]. 中药材, 2004, 27(5): 313-314. DOI:10.3321/j.issn:1001-4454.2004.05.001.
- [17] 陈永芳, 芦韦华, 王芳, 等. 新疆紫草毛状根的诱导及培养[J]. 西北植物学报, 2008, 28(12): 2423-2428. DOI:10.3321/j.issn:1000-4025.2008.12.010.
- [18] 芦韦华, 陈永芳, 王芳, 等. 理化条件对新疆紫草毛状根培养及紫草素含量的影响[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(1): 50-54. DOI:10.3969/j.issn.1000-2421.2012.01.009.
- [19] 张桂, 畅天狮, 刘俊果, 等. 从芹菜中提取黄酮类物质的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 121-124. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2002.08.031.
- [20] 杨春霞, 黄丽莉, 章挺, 等. 苦豆子愈伤组织培养及其药用成分含量测定[J]. 中国农学通报, 2011, 27(18): 153-157.
- [21] WEISS D, HALEVY A H. Stamens and gibberellin in the regulation of corolla pigmentation and growth in *Petunia hybrida*[J]. Planta, 1989, 179(1): 89-96. DOI:10.1007/bf00395775.
- [22] 晏琼, 胡宗定, 吴建勇. 生物与非生物诱导子协同作用对丹参毛状根培养生产丹参酮的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(3): 188-191. DOI:10.3321/j.issn:1001-5302.2006.03.003.
- [23] 王学勇, 崔光红, 黄璐琦, 等. 诱导子对丹参毛状根中丹参酮类成分积累影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(10): 976-978. DOI:10.3321/j.issn:1001-5302.2007.10.030.
- [24] GE Xiuchun, WU Jianyong. Thanshinone production and isoprenoid pathways in *Salviam iltionrrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor[J]. Plant Science, 2004, 168(2): 487-491. DOI:10.1016/j.plantsci.2004.09.012.
- [25] 尹雅乐, 戚金亮, 庞延军, 等. 乙烯调控紫草宁合成相关基因的克隆和表达研究[C]. 南京: 江苏省遗传学会, 2008.
- [26] KRISA S, TEGUO P W, DECENDIT A, et al. Production of ¹³C-labelled anthocyanins by *Vitis vinifera* cell suspension cultures[J]. Phytochem, 1999, 51(5): 651-656. DOI:10.1016/s0031-9422(99)00068-0.
- [27] 曲均革, 虞星炬, 张卫, 等. 前体饲喂、诱导子和光照联合使用对葡萄细胞培养合成花青素的影响[J]. 生物工程学报, 2006, 22(2): 229-305. DOI:10.3321/j.issn:1000-3061.2006.02.022.
- [28] 杨英, 何峰, 季家兴, 等. 四种前体对胀果甘草细胞悬浮培养生产甘草黄酮的调控效果评价[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 484-489. DOI:10.3969/j.issn.2095-0837.2007.05.012.
- [29] 胡燕梅, 韩晓红, 周全. 银杏液体悬浮细胞培养产生黄酮的研究[J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(2): 360-363. DOI:10.3969/j.issn.1000-2286.2011.02.030.