硝普钠对青钱柳悬浮细胞三萜合成的影响

郭春梅，尹忠平，上官新晨，陈继光，付晓

（江西省天然产物与功能食品重点实验室，江西农业大学食品科学与工程学院，江西南昌 330045）

摘要：本文采用植物细胞工程技术建立青钱柳细胞悬浮培养体系，以硝普钠为外源诱导物对其三萜的合成进行诱导，从硝普钠的浓度、添加时间和持续作用时间三个方面系统地研究了硝普钠对青钱柳悬浮细胞生长、总三萜酸积累及代表性三萜酸合成的影响，以期为植物细胞培养生产三萜酸类化合物提供参考。10~50 μmol/L 的硝普钠对悬浮细胞的生长影响不大，但对三萜合成的诱导作用也不明显；150 μmol/L 的硝普钠有效地促进了三萜的合成且对细胞生长影响较小；200 μmol/L 以上的浓度则对细胞生长有较强的抑制作用；接种后的第 8 d 添加 150 μmol/L 硝普钠、持续作用 4 d 后收获效果最佳，总三萜酸产量可达 1228.74 mg/L，为对照组的 2.14 倍，五种代表性三萜酸中以熊果酸（UA）和齐墩果酸（OA）的变化最为明显，分别比对照组提高了 2.28 倍和 2.48 倍。研究结果表明，外源添加硝普钠能有效地促进青钱柳悬浮细胞三萜酸的合成。

关键词：细胞工程；植物细胞培养；青钱柳；三萜酸；硝普钠；诱导

文章篇号：1673-9078(2014)4-68-73

Effect of Sodium Nitroprusside on the Biosynthesis of Triterpenic Acids in Suspended Cultured *Cyclocarya paliurus* Cells

GUO Chun-mei, YIN Zhong-ping, SHANGGUAN Xin-chen, CHEN Ji-guang Chen, FU Xiao

(Jiangxi Key Laboratory of Natural Products and Functional Food, College of Food Science and Engineering, Nanchang 330045, China)

Abstract: *Cyclocarya paliurus* cell suspension culture was established in this paper, and sodium nitroprusside was added as an extraneous inducer to stimulate the biosynthesis of triterpenic acids. The effects of sodium nitroprusside in terms of concentration, adding time and inducement duration on the cells growth, total triterpenic acids accumulation, and the biosynthesis of five representative triterpenic acids were investigated. The results showed that 10~50 μmol/L sodium nitroprusside had little effect on the growth of *Cyclocarya paliuru* cells, and little stimulant effect on the biosynthesis of triterpenic acids. 150 μmol/L sodium nitroprusside was suitable for the accumulation of triterpenic acids, and had little effect on the cells growth. High concentrations (200~500 μmol/L) of sodium nitroprusside inhibited the growth seriously. The highest production of triterpenic acids was obtained when 150μmol/L sodium nitroprusside was added at the 8 th day after inoculation and continuous inducement for 4 days. Under this optimal conditions, the production of total triterpenic acids was as higher as 1228.74 mg/L, which was 2.14 times higher than that of the control group. And the output of ursolic acid and oleanolic acid increased more obviously among the five representative triterpenic acids of this cells, which was 2.28 and 2.48 times, respectively, higher than the control group. Our researches indicated that extraneous sodium nitroprusside effectively increased the biosynthesis of triterpenic acids in suspended cultured *Cyclocarya paliuru* cells.

Key words: cell engineering; plant cell culture; *Cyclocarya paliurus*; triterpenic acid; sodium nitroprusside; inducement

青钱柳（*Cyclocarya paliurus*）属胡桃科青钱柳属，为高大落叶乔木，主要分布于长江中上游和华南地区[1]，是我国重点保护的濒危植物之一。研究表明，青钱柳叶含三萜[2~3]、黄酮[4]、多糖[5]等活性成分，具有降糖[2,6]、调脂[7]、增强免疫[2]等多种生理活性和药理功能，是很好的天然保健食品资源。但由于其有性繁殖存活率极低，无性繁殖也非常困难，目前天然的青钱柳资源稀缺，且尚无可在实际中应用的规模化繁殖和培育技术，极大地限制了其资源的开发利用。

植物细胞培养生产次生代谢产物具有生产周期短、可调控、不受自然环境限制、易于工业化等诸多优点，利用青钱柳细胞培养得到有效功能成分是青钱柳资源开发利用的重要途径之一。本实验室前期已对青钱柳细胞悬浮培养进行了大量的研究，建立了较为

收稿日期：2013-11-19

基金项目：国家自然科学基金资助项目(31260368)；国家自然科学基金资助项目(31060213)；江西省科技支撑计划项目(2010BNB00503)

作者简介：郭春梅（1987-），女，在读研究生，研究方向为植物细胞工程

通讯作者：尹忠平(1971-)，男，博士，副教授，研究方向为天然产物与功能食品

稳定的悬浮培养体系，对细胞悬浮培养生产三萜酸进行了初步研究[8~9]。为进一步提高三萜酸产量，降低生产成本，本文研究了 SNP（硝普钠）对青钱柳悬浮培养细胞三萜酸的诱导调控作用。SNP 作为 NO 的供体已被广泛用于植物次生代谢的外源诱导。NO 是植物抗病反应中的重要信号分子，在植物次生代谢中起着重要的作用[10]。任春林[11]研究诱导子对白桦悬浮细胞三萜酸积累的影响时，发现 NO 能促进白桦悬浮细胞三萜酸的积累，总三萜酸提高了 14.30%，齐墩果酸和白桦脂醇分别提高了 55.61%和 157.33%。本文从浓度、添加时间和持续作用时间三个方面系统研究了 SNP 对青钱柳悬浮细胞生长、总三萜酸积累及代表性三萜酸合成的影响，旨在为细胞悬浮培养生产三萜酸类化合物提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

青钱柳外植体（嫩叶）：本实验室采自于江西农业大学植物园。

青钱柳愈伤组织：由本实验室以上述青钱柳外植体诱导获得。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 主要试剂

SNP（98.5%），购自 Sigma 公司；熊果酸（98.0%）、山楂酸、科罗索酸、白桦脂酸（97.0%）、齐墩果酸(95.0%)，上海同田生物科技有限公司；甲醇，色谱纯（Tedia）；乙酸乙酯；冰乙酸等，分析纯，天津永大试剂公司。

1.2.2 主要仪器

SKY-211B 全温度恒温振荡培养器，上海苏坤实业有限公司；高效液相色谱仪（DEAAXO4033），美国安捷伦科技公司；可见分光光度计（V-5600），上海元析仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 青钱柳细胞悬浮培养体系的建立

选取生长旺盛、质地松散的淡黄色愈伤组织，转移至含 0.5 mg/L 2,4-D、0.3 mg/L NAA、1.0 mg/L KT、30 g/L 蔗糖的 MS 液体培养基中，25±1 ℃，115 r/min 暗培养，装液量为每个 100 mL 三角瓶装 40 mL，接种量为 10%（鲜重），多次继代后获得生长稳定、分散性好的悬浮体系。

1.3.2 诱导子的制备及添加

SNP 配制成 500 μmol/L 的母液，添加前稀释至所需浓度，经 0.22 μm 滤膜过滤除菌，于实验设定的时间添加到悬浮培养物中。

1.3.3 SNP 诱导条件优化

培养条件：MS+0.5 mg/L 2,4-D、0.3 mg/L NAA、1.0 mg/L KT、30 g/L 蔗糖的液体培养基，装液量为每个 100 mL 三角瓶装 40 mL，接种量为 4 g（鲜重），25±1 ℃，115 r/min 暗培养。诱导时加入稀释、过滤除菌后的 SNP 1 mL/瓶共培养，对照组加入等体积蒸馏水。

诱导子浓度：于第 8 d 添加 10、50、100、150、200、250、300、400、500 μmol/L SNP 溶液，14 d 收获细胞。分别测定各组生物量（干、鲜重）、总三萜含量（测定方法见 1.3.4）以及五种代表性三萜酸的含量（以 HPLC 法测定，如 1.3.5 所示）；

诱导子添加时间：在 0、2、4、6、8、10、12、14 d 分别加入 150 μmol/L SNP 溶液 14 d 收获细胞，并测定生物量、总三萜含量和五种代表性三萜酸含量。

诱导子作用时间：在第 8 d 添加 150 μmol/L SNP 后每 24 h 收获悬浮细胞并测定生物量、总三萜含量和五种代表性三萜酸含量。

1.3.4 总三萜的提取及测定

提取方法：准确称取 300 mg 青钱柳悬浮培养细胞粉末，加入 3.6 mL 乙酸乙酯，超声辅助提取（60 ℃，30 min），离心后重复提取 1 次，合并提取液，定容至 10 mL，待测。

测定方法：参照文献[8]的方法进行测定。以熊果酸为标准品，测定回归方程为 y=0.0047x-0.0166，R^2=0.9977；其中 y 为吸光度值，x 为熊果酸质量(单位：μg)。

1.3.5 五种主要三萜酸的测定

采用高效液相色谱法测定，检测条件如下：色谱柱为 Waters C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）；检测器为（Agilent 1260）二极管阵列检测（Serial No.DEAAX04033）；检测波长为 210 nm；流动相为甲醇和质量分数为 0.1%磷酸水溶液，体积比为 90∶10；流速为 0.85 mL/min；柱温为 40 ℃。图 1-1 MA（山楂酸）测定回归方程：y=435.14x+8.0162，R^2=0.9999；图 1-2 CA（科罗索酸）测定回归方程：y=474.76x+1.1201，R^2=0.9999；图 1-3 BA（白桦脂酸）测定回归方程：y=259.21x+19.175，R^2=0.9998；图 1-4 OA（齐墩果酸）测定回归方程：y=407.62x+24.394，R^2=0.9999；图 1-5 UA（熊果酸）测定回归方程：y=367.66x+27.882，R^2=0.9999；其中 y 为峰面积(单位：mAU×s)，x 为各单体三萜酸的质量(单位：μg)。五种

三萜酸标品及样品总三萜酸的 HPLC 色谱图如图 1 所示。

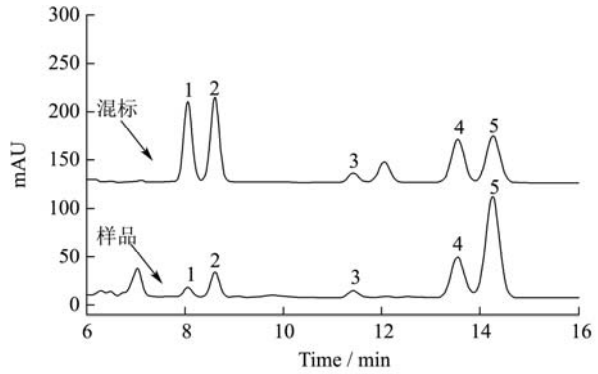


图 1 五种三萜酸标品及样品总三萜酸的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC picture of cell extract, standard maslinic acid (1), standard corosolic acid (2), standard betulinic acid (3), standard oleanolic acid (4) and standard ursolic acid (5)

注：山楂酸（1），科罗索酸（2），白桦脂酸（3），齐墩果酸（4），熊果酸（5）。

1.3.6 数据统计

数据统计和分析采用 DPS 统计软件（6.55 专业版），每组样品五个重复，每个样品平行测定三次，结果表示为平均值±标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 青钱柳悬浮培养细胞生长特征及三萜酸积累规律

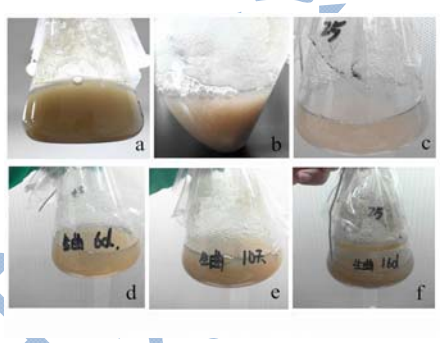


图 2 各个生长期的青钱柳悬浮培养细胞

Fig.2 Features of *Cyclocarya paliurus* suspension cell

注：稳定的悬浮培养体系（2a），用于接种的优良细胞系（2b），迟滞期（2c），对数生长期（2d），静止期（2e）和衰亡期（2f）。

选择淡黄色、疏松、生长旺盛的优良愈伤组织建立悬浮培养体系．经过多次筛选和继代培养，初步建立了悬浮细胞系。细胞系经过多次定向筛选、驯化和继代培养，获得了稳定的悬浮培养体系如图 2a，所收获的细胞呈均匀的砂粒状，灰白色如图 2b。青钱柳悬浮培养细胞的生长曲线基本符合“S 型”曲线，可以大致划分为迟滞期、对数生长期、静止期和衰亡期，如图 2c、2d、2e、2f。悬浮细胞生物量在第 12 d 时达到最大，为接种时的 3.6 倍。总三萜酸含量变化的总体趋势是接种第 2 d 迅速增加，之后呈缓慢下降的趋势，在 14 d 含量基本达到稳定，至 14 d 总三萜酸含量可达到 3%。

2.2 硝普钠浓度对悬浮细胞生长及三萜酸积累的影响

2.2.1 硝普钠浓度对悬浮细胞生长的影响

低浓度的 SNP 对细胞生长有促进作用（如图 3 所示），10 μmol/L SNP 的作用下，生物量比对照组增加了 6.28%，且其细胞生长速度也快于对照组。当浓度达到 50 μmol/L 及以上时，SNP 对细胞的生长表现出明显的抑制作用，生物量随 SNP 浓度增大而减小。此外，从培养物形态和颜色上，可以看到明显的变化，培养液颜色随 SNP 浓度的增加而逐渐变深，当到达 500 μmol/L 时细胞呈黑褐色。与曹英杰、贾景明[12]等研究的 NO 诱导子、茉莉酸甲酯与水杨酸对肉苁蓉悬浮细胞生长的影响，低浓度的 NO 能够促进肉苁蓉悬浮细胞的生长，但高浓度的 MJ 和 SA 都会抑制悬浮细胞生长甚至引起褐化死亡结果相似。SNP 对悬浮培养细胞生长的影响在现象上很明显，但具体机制尚不清楚，本实验正在对其作用机制进行深入研究。

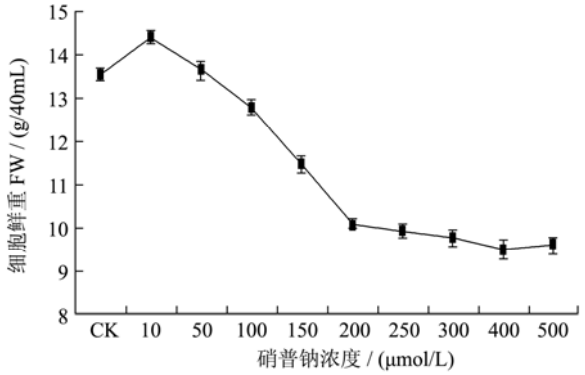


图 3 硝普钠浓度对青钱柳悬浮培养细胞生长的影响

Fig.3 Effect of SNP concentration to growth curve of *Cyclocarya paliurus*

2.2.2 硝普钠浓度对悬浮细胞总三萜酸积累的影响

随着 SNP 浓度的增大，青钱柳悬浮细胞总三萜酸含量和产量呈先上升后下降的趋势，150 μmol/L 时均达到最大值，产量高达 806.10 mg/L，为对照组的 1.97 倍（如图 4 所示）。当 SNP 浓度不高于 50 μmol/L 时，总三萜酸的含量基本不受影响。当 SNP 浓度从 50

μmol/L 增至 150 μmol/L 时，总三萜酸含量快速线性上升，虽然此浓度下生物量呈缓慢下降的趋势，但总三萜酸的产量还是在迅速增加，这表明此浓度区域内 SNP 诱导所致的总三萜酸含量上升对产量的影响起到了主导作用，远远大于其降低生物量所致的影响。当 SNP 浓度高于 150 μmol/L 时，总三萜酸含量和产量均呈下降趋势，200 μmol/L 以后时基本无变化，此时 SNP 对生物量的影响起了主导作用。因此，确定以 150 μmol/L 的 SNP 进行后续试验。

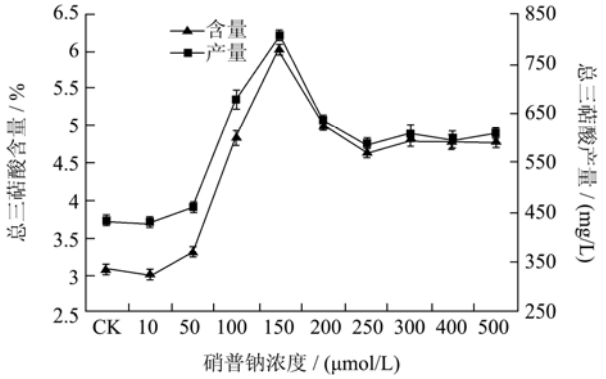


图 4 硝普钠浓度对青钱柳悬浮培养细胞总三萜积累的影响

Fig.4 Effect of SNP concentration to total triterpenic acid yield of *Cyclocarya paliurus*

2.2.3 硝普钠浓度对悬浮细胞代表性三萜酸合成的影响

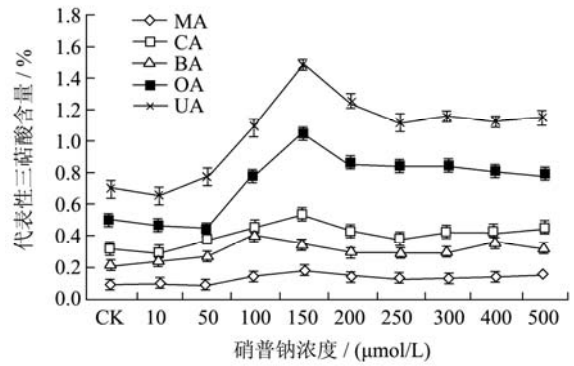


图 5 硝普钠浓度对悬浮细胞代表性三萜酸合成的影响

Fig.5 Effect of SNP concentration to representative triterpenic acid yield of *Cyclocarya paliurus*

实验结果表明(如图 5 所示)，不同浓度的硝普钠诱导作用下代表性三萜酸的总体变化趋势与总三萜酸基本相同。当 SNP 的浓度从 10 μmol/L 增至 500 μmol/L 时，青钱柳悬浮细胞各三萜酸的含量呈先上升后下降的趋势，其中 MA、CA、OA、UA 的含量均在 150 μmol/L 时达到最大值，分别为对照组的 1.89、1.74、2.06、2.13 倍，BA 则在 100 μmol/L 时含量达到最大，为对照组的 1.90 倍。就诱导效果而言，SNP 对 UA 和 OA 合成的促进作用最为明显，该两种三萜酸的变化趋势基本体现了总三萜酸的变化趋势，而其对 MA 合成的诱导作用则不太明显。

2.3 硝普钠添加时间对悬浮细胞生长及三萜酸积累的影响

2.3.1 硝普钠添加时间对悬浮细胞生长的影响

接种初期添加 150 μmol/L SNP 对细胞生长有抑制作用，接种后在细胞适应期，细胞密度小，SNP 严重的抑制了细胞的增殖，0 d 添加 150 μmol/L SNP 于 14 d 收获差异最为显著，生物量仅为对照组的 0.19 倍（如图 6 所示），2 d 及 4 d 抑制作用也较明显，收获细胞呈黑褐色。在细胞生长的对数期和稳定期（第 6~12 d）添加对细胞生长影响不大，收获细胞较对照组颜色偏深，可能是细胞在适应新环境后增殖速度快，培养液中细胞达到一定浓度，对 SNP 的刺激作用表现出了一定的防御能力。与徐茂军[13]研究 NO 诱导长春花悬浮细胞生产长春碱中在细胞接种初期添加 SNP 抑制长春花悬浮细胞生长的结果相似。

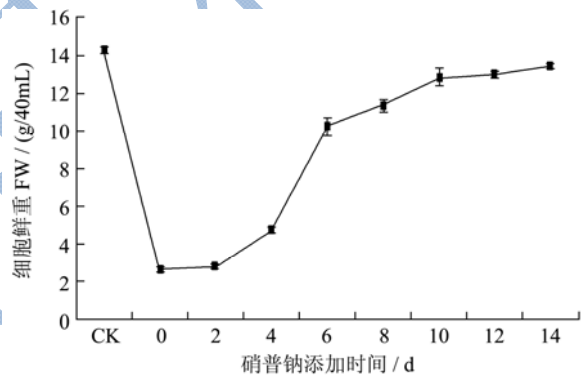


图 6 硝普钠添加时间对青钱柳悬浮培养细胞生长的影响

Fig.6 Effect of SNP adding period to growth curve of *Cyclocarya paliurus*

2.3.2 硝普钠添加时期对悬浮细胞总三萜酸积累的影响

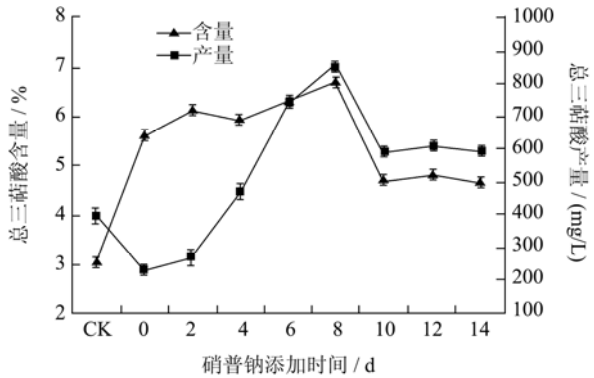


图 7 硝普钠添加时间对青钱柳悬浮培养细胞总三萜积累的影响

Fig.7 Effect of SNP adding period to total triterpenic acid yield of *Cyclocarya paliurus*

不同时期添加 150 μmol/L SNP 对细胞中三萜酸的含量都有提高(如图 7 所示)，总体呈先上升后下降的趋势，接种后第 8 d 添加细胞中三萜酸含量达到最大值，为对照组的 1.97 倍；第 10~14 d 添加，含量变化不明显，但均比对照组含量高，可能是 SNP 诱导细胞中三萜酸积累有一定的作用时间。三萜酸产量的变化显著，以接种后第 8 d 添加产量最高，达到 858.43 mg/L,是对照组的 2.17 倍。第 0~6 d 细胞三萜酸含量较高，但是生物量低，第 10~14 d，细胞生物量高，但是含量低，综合考虑，确定以接种后第 8 d 添加 150 μmol/L 的 SNP 进行不同作用时间试验。

2.3.3 硝普钠添加时期对悬浮细胞主要代表性三萜酸合成的影响

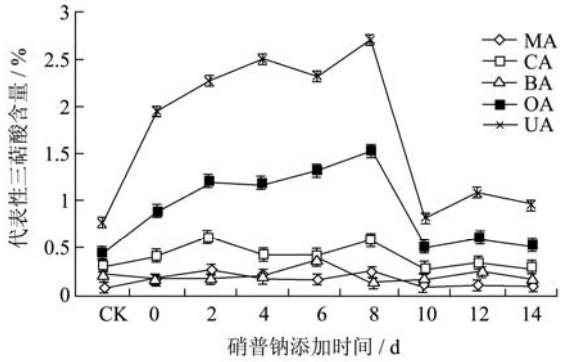


图 8 硝普钠添加时间对青钱柳悬浮细胞代表性三萜酸合成的影响

Fig.8 Effect of SNP adding period to representative triterpenic acid yield of *Cyclocarya paliurus*

不同添加时期的 SNP 诱导作用下代表性三萜酸的变化如图 8 所示，接种后第 8 d 添加 150 μmol/L 的 SNP，OA 和 UA 含量变化显著，分别为对照组的 2.68 和 2.79 倍。MA、CA 在第 2 d 添加含量较高，第 2 d 添加细胞中含量分别为对照组的 3.11、2.30 倍。BA 则是第 6 d 添加含量最高，为对照组的 1.75 倍。五种代表性三萜酸的含量在不同添加时期添加存在差异，是否三萜酸在合成过程中存在相互关系，具体的机理还需进一步研究。就总含量而言，第 8 d 添加 150 μmol/L 的 SNP 对代表性三萜酸的诱导效果最显著，与总三萜酸的变化趋势相符。

2.4 硝普钠持续作用时间对悬浮细胞生长及三萜酸积累的影响

2.4.1 硝普钠持续作用时间对悬浮细胞生长的影响

由于是在第 8 d 进行添加的 SNP，细胞在生长的对数期对外源诱导物 SNP 的刺激表现出了一定的防御能力，持续作用时间对细胞生长影响不大，变化趋势与对照组基本相符，生物量略低（如图 9 所示）。对照组与 2.3.1 试验结果一致，在接种后 12 d 生物量达到最大值。

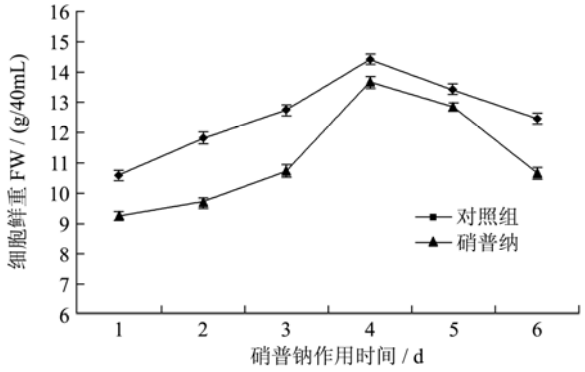


图 9 硝普钠持续作用时间对青钱柳悬浮培养细胞生长的影响

Fig.9 Effect of SNP duration time to growth curve of *Cyclocarya paliurus*

2.4.2 硝普钠持续作用时间对悬浮细胞总三萜酸积累的影响

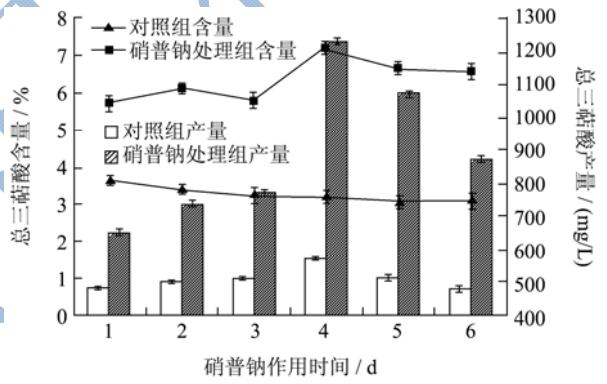


图 10 硝普钠持续作用时间对青钱柳悬浮细胞总三萜酸合成的影响

Fig.10 Effect of SNP duration time to total triterpenic acid yield of *Cyclocarya paliurus*

SNP 添加后连续 6 d 收获细胞，对照组含量变化不显著，以生物量为影响总三萜酸产量因素。经 SNP 诱导悬浮细胞中总三萜酸的含量和产量呈先上升后下降的趋势（如图 10 所示），以持续作用 4 d 悬浮细胞总三萜酸含量最高，产量最大，含量为对照组的 2.25 倍，产量高达 1228.74 mg/L，是对照组的 2.14 倍。SNP 诱导悬浮细胞合成三萜酸合成是一个缓慢的过程，SNP 添加后，NO 作为一种信号分子可能刺激了悬浮细胞合成三萜酸的一些前体物质，在持续作用 4 d 时，三萜酸含量最高，积累量达到最大。持续作用时间增加，细胞次生代谢及培养液环境发生变化，总三萜酸的含量下降。NO 在培养液中是否发生变化，其它信号分子如何变化，具体机制尚无报道，本实验正在对其作用机制进行深入研究。

2.4.3 硝普钠持续作用时间对悬浮细胞代表性三萜酸合成的影响

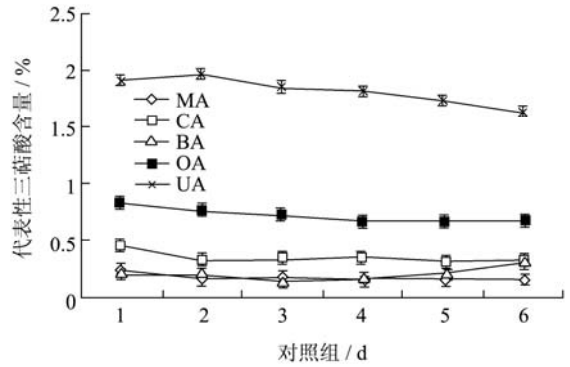


图 11 对照组青钱柳悬浮细胞代表性三萜酸含量的变化

Fig.11 Growth of representative triterpenic acid yield of *Cyclocarya paliurus* in control group

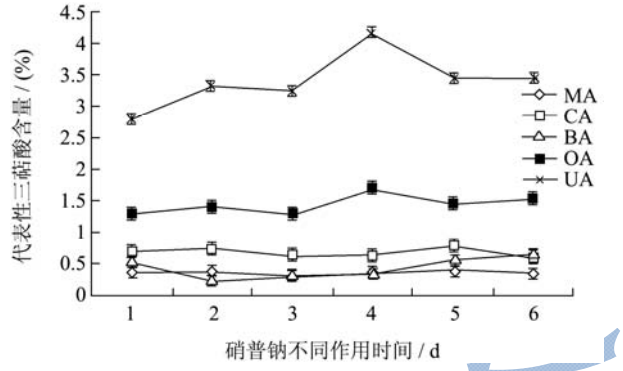


图 12 硝普钠持续作用时间对青钱柳悬浮细胞代表性三萜酸合成的影响

Fig.12 Effect of SNP duration time to representative triterpenic acid yield of *Cyclocarya paliurus*

实验结果表明（如图 11、12 所示），SNP 持续作用时间对悬浮细胞代表性三萜酸积累与总三萜酸积累变化趋势基本相同，与对照组比较，OA、UA 变化最显著，在 SNP 持续作用 4 d 后收获，含量分别是对照组的 2.48、2.28 倍。就 MA、CA、BA 三种三萜酸而言，SNP 持续作用时间对它们含量变化效果不明显，但与对照组相比，含量有升高。OA、UA 是悬浮细胞中两种含量最高的单体，就持续作用时间来看，两种单体均在持续作用 4 d 的促进效果最明显，体现了总三萜酸的变化趋势。

3 结论

150 μmol/L 的 SNP，在青钱柳悬浮细胞接种后的第 8 d 添加，经 SNP 作用 4 d 后收获，细胞鲜重达到 13.68 g/40 mL，细胞总三萜酸含量达到 7.19%，产量高达 1228.74 mg/L。代表性三萜酸中对 UA 和 OA 的效果最为明显，含量分别为 4.16%、1.69%，产量分别为 710.97 mg/L、288.23 mg/L。SNP 对青钱柳悬浮细胞三萜酸积累具有很好的效果，因此具有较好的应用前景。

参考文献

[1] 匡可任,李沛琼.中国植物志(第二十一卷)[M].北京:科学技术出版社,1979
KUANG K R, LI P Q. Flora Repubulicae Popularis Sinicae (The 21 volume) [M]. Beijing: Science and Technology Press, 1979

[2] 谢明勇,谢建华.青钱柳研究进展[J].食品与生物技术学报, 2008,27(1):113-121
XIE M Y, XIE J H. Review about the Research on *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2008, 27(1): 113-121

[3] 尹忠平,上官新晨,黎冬明,等.超声辅助提取青钱柳叶总三萜化合物研究[J].江西农业大学学报(自然科学版): 2010, 32(2): 373-377
YIN Z P, SHANGGUAN X C, LI D M, et al. A Study on Ultrasonic-assisted Extraction of Total Triterpenoids from *Cyclocarya paliurus* Leaves [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis. 2010, 32(2): 373-377

[4] Fang S Z, Yang W X, Chu X L, et al. Provenance and temporal variations in selected flavonoids in leaves of *Cyclocarya paliurus* [J]. Food Chemistry, 2011, 124(4): 1382-1386

[5] Liu K Y. Technology optimization of polysscharide extraction from *Cyclocarya paliurus* leaves by ultrasonic assistance [C]. ICAE 2011 Proceedings: 2011 International Conference on New Technology of Agricultural Engineering, 2011, 1125-1128

[6] Kurihara H, Fukami H, Kusumoto A, et a1. Hypoglycemic action of *Cyclocarya paliurus* (Bata1.) Iljinskaja in normal and diabetic mice [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(4): 877-880

[7] Kurihara H, Asami S, Shibata H, et al. Hypolipomic effect of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Ijinskaja in lipid-loaded mice [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2003, 26(3): 383-385

[8] 尹忠平,上官新晨,米丽雪,等.青钱柳细胞悬浮培养及三萜化合物积累[J].深圳大学学报理工版,2011,28(5):430-435
YIN Z P, SHANGGUAN X C, MI L X, et al. Suspension Culture of *Cyclocarya paliurus* Cells and Accumulation of Triterpenoids [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2011, 28(5): 430-435

[9] YIN Zhong-ping, SHANGGUAN Xin-chen, Chen Ji-guang, et al. Growth and Triterpenic Acid Accumulation of

Cyclocarya paliurus Cell Suspension Cultures [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2013(18): 606-614

[10] GAO Fu-kang, REN Cheng-guang, DAI Chuan-chao. Signalin g Effects of Nitric Oxide, Salicylic Acid, and Reactive Oxygen Species on Isoeuphpekinensin Accumulation in Euphorbia pekinensis Suspension Cells Induced by an Endophytic Fungal Elicitor [J]. J. Plant Growth Regul., 2012, 31: 490-497

[11] 任春林.诱导子组合对白桦三萜合成调控及 MeJA 抑制性消减文库分析[D].哈尔滨:东北林业大学,2012
REN C L. The Regulation of Triterpenoid Biosynthesis Induced by the Combination of Elicitor and Suppression Subtractive Library Analysis Induced by the MeJA [D]. Haerbin: Northeast Forestry University, 2012

[12] 曹英杰,贾景明.一氧化氮、茉莉酸甲酯与水杨酸对肉苁蓉悬浮细胞生长及苯乙醇苷生物合成的影响[J].中国药学杂志,2011,46(14):1069-1073
CAO Y J, JIA J M. Effects of Nitric Oxide, Methyl Jasmonate and Salicylic Acid on the Phenylethanoid Glycos ides Production and Cell Growth in Suspension Cultures of Cistanche deserticola [J]. Chinese Pharmaceutical Journal. 2011, 46(14): 1069-1073

[13] XU Mao-jun, DONG Ju-fang, ZHU Mu-yuan. Effect of Nitric Oxide on Catharanthine Production and Growth of Catharan thus roseus Suspension Cells [J]. Biotechnology and Bioengin eering. 2005, 89(3): 367-371

现代食品科技