

青钱柳悬浮细胞的培养及其基质消耗的规律

陈继光, 上官新晨, 尹忠平, 任民红, 付晓

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

摘要: 青钱柳为我国特有的胡桃科青钱柳属单种属珍稀植物, 也是国家重点保护的濒危植物之一, 青钱柳叶含三萜、黄酮、多糖及微量元素等活性成分, 具有降糖、调脂、增强免疫等多种生理活性和药理功能, 是很好的天然保健食品资源。本文建立青钱柳细胞悬浮培养体系, 测定悬浮培养细胞的生长曲线, 并研究了培养代数、接种量、装液量、pH值和激素组合对青钱柳悬浮体系建立的影响, 同时研究了悬浮培养青钱柳细胞对培养液中主要基质的消耗规律。结果表明: 适合青钱柳悬浮培养的培养基为: MS+0.1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L NAA+1 mg/L KT+30 g/L 蔗糖, 接种量为8%, 摇瓶装液量的体积分数为40%, 初始pH 5。青钱柳细胞生长与碳源、氮源和磷的消耗存在着密切关系, 在培养8 d, 糖和 PO_4^{3-} 基本消耗完毕; 在氮源的吸收上, NH_4^+ 优于 NO_3^- , NH_4^+ 的吸收基本上是呈直线下降。

关键词: 青钱柳; 悬浮细胞培养; 基质消耗

文章编号: 1673-9078(2014)1-44-49

Establishment of the Cell Suspension Culture System of *Cyclocarya paliurus* and Matrix Consumption Laws

CHEN Ji-guang, SHANGGUAN Xin-chen, YIN Zhong-ping, REN Min-hong, FU Xiao

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

Abstract: *Cyclocarya paliurus* is a unique plant resource in China. As one of the threatened plants, it has been received increasing attention. *Cyclocarya paliurus* is rich in flavonoids, polysaccharides, triterpenoids and other bioactive substances. However, its application is restricted for the problems of its sexual and asexual reproduction. Nowadays, employing cell culture technology to get more bioactive compounds is a vital way to make full use of *Cyclocarya paliurus*. The suspension cell system influenced by the factors of inoculum density, the liquid medium volume per flask, pH, sucrose concentration, phytohormone combinations and the consumption rules for culture medium in the process of cells proliferation were studied. The dynamic curve of cells proliferation and total flavonoids, polysaccharides and triterpenoids synthesized in the suspension cell system were measured. The result revealed that the preferable conditions for suspension cells proliferation were as follows: MS medium supplemented with 1.0 mg/L KT, 0.1 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L NAA and sucrose 30 g/L. The optimum culture situations were seed volume 8%, liquid medium volume per flask 40% and initial pH 5. Moreover, the proliferation of *Cyclocarya paliurus* cells correlated closely with the consumption of sugar, nitrate and phosphate. After 8 days, sugar and phosphate in the medium were absorbed completely, while NH_4^+ was utilized faster than NO_3^- , and the concentration of NH_4^+ showed a linear decreasing trend.

Key words: *Cyclocarya paliurus*; cell suspension culture; matrix consumption

青钱柳 (*Cyclocarya paliurus*) 为胡桃科青钱柳属乔木植物。现仅存一种, 广泛分布于我国广东、广西、福建、台湾、浙江、江苏、安徽、江西、湖南、陕南、四川、云南、贵州等省区的海拔 420~2500 m 的山区、

收稿日期: 2013-09-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260368); 江西省主要学科学术和技术带头人项目 (2009DD00900); 江西省科技厅支撑项目 (2009BSB09100)

作者简介: 陈继光 (1985-), 男, 助理实验师, 研究方向为植物细胞培养

通讯作者: 上官新晨 (1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向为天然产物研究与开发

溪谷或石灰岩山地^[1-2]。青钱柳是我国特有的保健食品资源, 其水提物具有生津止渴、清热解暑、降压降脂血糖及增强机体免疫力等多种功效。《中国中药资源志要》^[3]记载, 其树皮、叶具有清热消肿、止痛的功能, 可用于治疗顽癣, 长期以来民间用其叶片做茶。研究表明: 青钱柳叶含三萜^[4]、黄酮^[5]、多糖^[6]及微量元素^[7-8]等活性成分, 具有降糖^[9]、调脂^[10]、增强免疫^[10]等多种生理活性和药理功能, 是很好的天然保健食品资源。

虽然青钱柳具有很高的开发利用价值, 但目前可

利用的资源很少,有限的资源零星分布于深山老林之中,或保存于自然保护区内。为了解决资源匮乏问题,科研人员对其繁育难题进行了大量的研究。由于青钱柳是我国特有的资源,国外研究极少,国内研究主要集中于种子萌发和无性繁殖上。青钱柳坚硬的种壳既束缚了种胚且影响透气,种子又属于综合性深休眠类型,自然萌发率低,有性繁育困难,因而种子萌发成为了研究的重点和难点。南京林业大学方升佐教授实验室的研究人员对种子休眠的机制及解除休眠的方法做了深入探索,采用酸蚀、GA₃浸种、GA₃拌沙、先低温后暖温层积的方法,可实现头年采种,翌年出苗^[1]。无性繁殖方面,研究主要在扦插和组培繁殖技术上,但扦插成活率很低、组培繁育效果也不理想。从实际应用情况来看,目前尚无青钱柳大量人工繁殖和栽培的成功经验,资源稀缺局面仍未得到根本改观。研究利用青钱柳细胞培养得到有效成分是青钱柳资源开发利用的重要途径之一。目前,上官新晨^[2]、胡冬南^[3]等人已经对青钱柳愈伤组织的诱导、愈伤组织的生长及代谢调控做了较深入的研究,但关于细胞悬浮培养方面的研究较少。因此,笔者通过研究不同理化因子对青钱柳悬浮细胞生长的影响,从而建立一个快速生长的细胞悬浮培养体系,为细胞悬浮培养技术生产青钱柳功效成分提供一些参考。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

超净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;SKY-211B全温度恒温震荡培养器,上海苏坤实业有限公司;不锈钢手提式灭菌锅DSX-2804,上海申安医疗器械厂;试剂有2,4-D、KT、6-BA、NAA,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导及继代

将青钱柳叶子用70%乙醇浸泡30s,无菌水冲洗4~5次,0.1%升汞浸泡2min,无菌水冲洗4~5次,接于附加0.5mg/LNAA和1.0mg/L6-BA的MS^[1]培养基中。形成的愈伤组织继代培养于MS+0.3mg/L2,4-D+0.5mg/LKT+3%蔗糖的培养基上,每2周继代一次。在昼夜温度25℃,光强2000lux,光暗交替12h/12h的条件下培养。连续继代后,获得质地松散,生长旺盛稳定的淡黄色愈伤组织。

1.2.2 细胞悬浮培养体系的建立及培养条件的优化

取生长旺盛、质地松散的淡黄色愈伤组织,用镊子夹碎后转移到液体培养基中振荡悬浮培养,培养温度25℃,摇床转速为115r/min,每个三角瓶(100mL)内装40mL培养液,每瓶接种量约2g,于黑暗处培养。在悬浮初期用40目的过滤筛对培养物过滤一次,以除去大细胞团,保留分散程度好的小细胞及单细胞,然后按1:3体积转入新鲜培养液,悬浮培养周期为8d。

以细胞增长量、细胞活力为依据,研究接种密度(1%、3%、5%、8%、10%、15%);装液量(20mL、30mL、40mL、50mL);初始pH值(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0);激素:以上述最优化因子为培养条件,研究激素配比(见表1)对悬浮细胞生长的影响。

1.2.3 悬浮细胞生长曲线测定

每2d取悬浮细胞培养液,抽滤,测细胞鲜重,绘制悬浮细胞生长曲线。悬浮培养细胞鲜重测定:将滤纸用水浸湿,采用相同抽滤处理,称量滤纸湿重,取出细胞液倒入放置滤纸的漏斗里,过滤,并抽滤多余水分,称量鲜细胞W₂和湿滤纸的质量W₁。

$$\text{细胞净增长量} = W_2 - W_1 - \text{接种量}$$

1.2.4 细胞活力测定

细胞活力采用TTC法^[4-15]:取悬浮培养的青钱柳细胞,抽滤除去培养基,每个试管中加入200mg(鲜重)青钱柳细胞。加入2.5mL0.4%的TTC溶液,加入2.5mL0.1mol/L(pH7.0)的Na₂HPO₄-NaH₂PO₄的缓冲液,混匀,25℃暗处,处理13~16h,这时细胞会变成红色,弃去上清液,加入5mL蒸馏水洗涤细胞,如此重复3次,加入5mL95%乙醇,置于60℃水浴中30min。期间轻轻摇动试管1~2次,静置于室温下至细胞完全无色,离心5min,转速4000r/min,取上清液1mL,稀释至5mL,在分光光度计上于485nm处测定吸光值。

1.2.5 基质消耗测定

培养液抽滤后得到的滤液,采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[6]测定还原糖;蒽酮法^[7]测定蔗糖和总糖含量;水杨酸-浓硫酸法^[8]测定硝酸根离子;苯酚-次氯酸盐^[9]测定铵根离子;磷酸根离子含量测定采用钼蓝比色法^[20]测定。

2 结果与分析

2.1 继代次数对青钱柳细胞悬浮体系建立的影响

当青钱柳愈伤组织装入到液体培养基时,由于培养状态的改变,青钱柳细胞需要适应培养环境的变化。从培养代数与青钱柳的生长状态,可以看出青钱柳愈

伤组织刚接入液体培养基时，生长速度慢，培养物呈浅褐色（图 1a）。第三代青钱柳细胞，细胞生长速度快，培养 6 d 细胞增长 1~2 倍，培养物成灰色（图 1b）。第六代青钱柳细胞，悬浮细胞呈淡黄色，生长状态稳定（图 1c）。第 10 代青钱柳细胞，生长状态稳定，悬浮细胞呈浅黄色（图 1d），在后期继代培养过程中，细胞生长状态基本稳定。试验结果表明，继代的代数对细胞的分散程度起着关键作用，在培养初期，细胞大多聚集在一起，营养成分不能充分吸收，细胞增殖慢，褐化严重，随着不断的再培养，当细胞继代到第 6 代时，细胞开始充分分散，细胞形态呈球状，大小均一，细胞质浓厚，细胞增殖快。细胞培养 10 代后，细胞生长状态成淡土黄色，生长速度快，状态稳定。这与 Torrey^[21]的研究结果相似，他们认为频繁的再培养有利于最大程度的提高细胞分散程度。



图 1 青钱柳悬浮细胞的形态观察

Fig.1 Features of *Cyclocarya paliurus* suspension cell

2.2 接种量对青钱柳细胞培养的影响

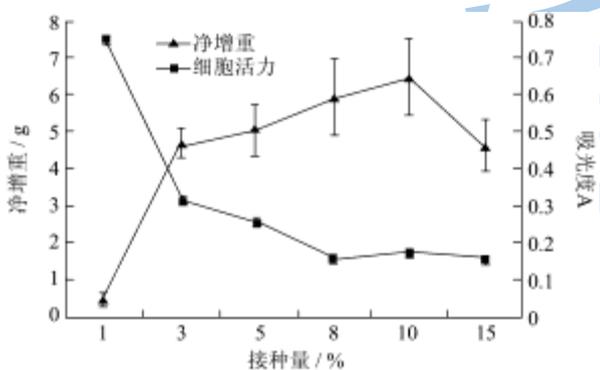


图 2 接种量对细胞生长的影响

Fig.2 Effects of seed volume on cell growth

由图 2 可知，当接种量为 1% 时，细胞基本无生长现象，当接种密度达到 3%，细胞开始有大量生长，之后随着接种量的增加，细胞的增加量也随着增加，接种量为 10% 时，细胞的增重量达到最大值，之后随着接种量的增加反而下降。而细胞活力随着接种量的增加一直降低。接种量为 1% 时，细胞活力最大，这可能是因为细胞处于分裂的准备期，细胞内大量的线粒体 DNA 的复制提供大量能量，所以细胞活力更强，当接种量大于 3% 时，由于细胞的大量分裂，单个细胞中的线粒体也相对减少，出现细胞活力降低的趋势，也有可能是细胞的大量增殖，出现了一些细胞的衰败。

但从表现现象观察，当接种量为 8% 时，细胞的培养物没有褐化现象，而接种量为 10% 时，出现褐化现象，因此，接种量选择 8% 为最好。悬浮细胞分裂增殖前需要一个最低的临界密度，可能原因是：细胞分裂启动时，需要细胞内一种称为条件因子的物质达到一定的内源水平。为达到这个内源水平，可以通过添加条件培养基完成；也可以通过增加悬浮细胞接种量来达到此目的。细胞要维持分裂和生长，其内源代谢物质必须达到一定的阈值，在有高密度细胞群和培养基营养丰富 的情况下，易于达到这种阈值^[22]。Akalezi^[23]报道在 *Panax gingen* 悬浮培养中，接种量为 1.5 g/L 时细胞生长缓慢；Sakano^[24]等报道低接种量严重抑制了 *Catharanthus roseus* 细胞的增殖，这与本研究结果基本一致。

2.3 装液量对青钱柳细胞培养的影响

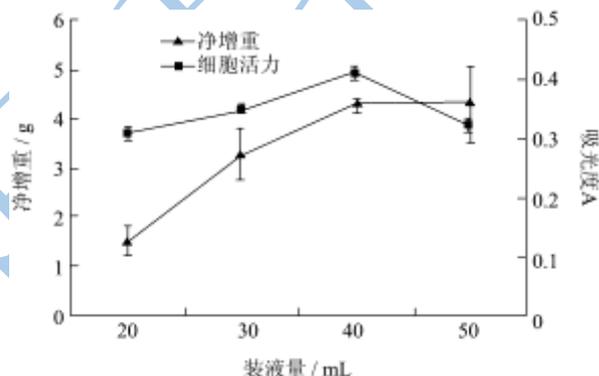


图 3 装液量对细胞生长的影响

Fig.3 Effects of the liquid medium volume per flask on cell growth

植物细胞生长需要一定的氧气来维持它的生长代谢，适宜的氧密度有利于植物细胞的生长。图 3 显示随着装液量的增加，青钱柳细胞净增重增大，当装液量为 40 mL (100 mL 三角瓶) 细胞增重量最大，大于 40 mL 时，细胞增重量减小，细胞活力也在装液量为 40 mL 为最大值。这可能是随着培养液体积的增加，无氧呼吸加剧，抑制细胞内的代谢，影响细胞的生长状态。

2.4 pH 值对青钱柳细胞培养的影响

不同 pH 值对青钱柳细胞生长的影响差异较大，如图 4 所示，当 pH 5 时，细胞的增重量为最大值，并且细胞活力也强，而当 pH 值大于 6 时，细胞增长量降低，细胞活力也显著降低，因此，青钱柳细胞的生长环境偏酸性，最佳的 pH 值为 5。pH 值对植物细胞会产生诸多影响，包括引起质膜通透性变化，影响植物细胞对一些物质的吸收及植物细胞的代谢等。研究

发现, 适宜于植物离体培养的培养基初始 pH 值使用范围一般在 5.5~6.0, pH 4.0 以下或 7.0 以上培养物都不能正常生长。

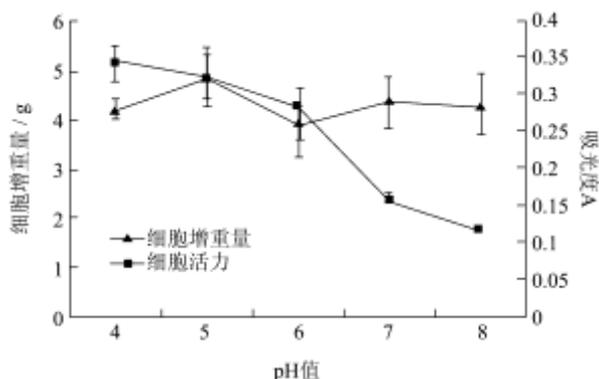


图 4 初始 pH 值对细胞生长的影响

Fig.4 Effects of pH on cell growth

2.5 不同植物激素配比对青钱柳细胞培养的影响

表 1 不同激素组合对悬浮细胞生长的影响

Table 1 Effects of concentrations of different hormones combinations on the growth of suspension cell

| 处理号 | 2,4-D / (mg/L) | KT / (mg/L) | NAA / (mg/L) | 平均增重 ±标准误差 | 细胞活力 |
|-----|----------------|-------------|--------------|-------------------------|--------------------|
| 1 | 0.1 | 0.5 | 0.3 | 6.80±0.33 ^{bB} | 0.24 ^{bB} |
| 2 | 0.1 | 1 | 0.5 | 8.0±0.43 ^{aA} | 0.23 ^{bB} |
| 3 | 0.3 | 0.5 | 0.5 | 5.6±0.07 ^{cC} | 0.26 ^{aA} |
| 4 | 0.3 | 1 | 0.1 | 6.70±0.16 ^{bB} | 0.19 ^{cC} |
| 5 | 0.5 | 0.5 | 0.1 | 5.34±0.16 ^{cC} | 0.20 ^{cC} |
| 6 | 0.5 | 1 | 0.3 | 5.36±0.21 ^{cC} | 0.16 ^{dD} |

在植物细胞悬浮培养过程中, 必须通过添加外源激素来促进细胞的生长。不同植物的细胞悬浮培养, 对激素种类和浓度的需求各不相同。结果表明, 不同激素组合和质量浓度对青钱柳悬浮细胞的生长具有极其显著的影响, 2,4-D 的浓度对细胞活力影响较大, 低浓度的 2,4-D 不仅能促进细胞快速增殖, 还能保持细胞原有的活力。从表 1 中可以看出, 附加 2,4-D 0.1 mg/L+KT 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 激素组合的培养基对青钱柳细胞的生长增殖最有利, 并且细胞也具有较强的细胞活力。而其他几种培养基上, 青钱柳细胞的活力相对较低, 细胞生长状况差, 产量低。

2.6 悬浮细胞生长曲线的测定

如图 5, 青钱柳悬浮培养细胞的生长曲线基本符合“S”型曲线, 可以划分为迟滞期、对数生长期、静止期和衰亡期。从图 5 中可以看出, 在细胞生长过

程中, 0~4 d 为滞后期, 4~8 d 快速生长期, 8~10 d 为静止期, 第 10~14 d 细胞开始衰亡。悬浮培养继代时的“种子”宜选择培养了 5~7 d 的悬浮细胞, 此时的细胞生长旺盛, 状态好, 细胞量大。

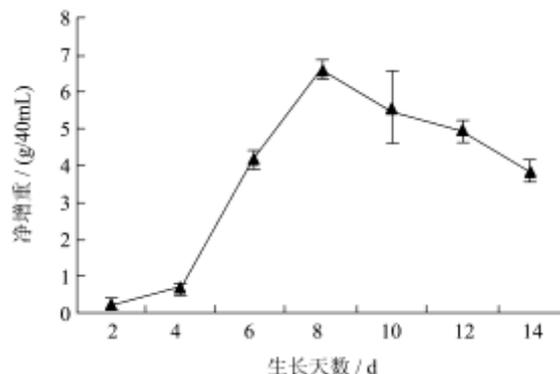


图 5 细胞悬浮生长曲线

Fig.5 The growth curve of *Cyclocarya paliurus* during cell suspension culture

2.7 培养时间对青钱柳悬浮培养细胞活力的影响

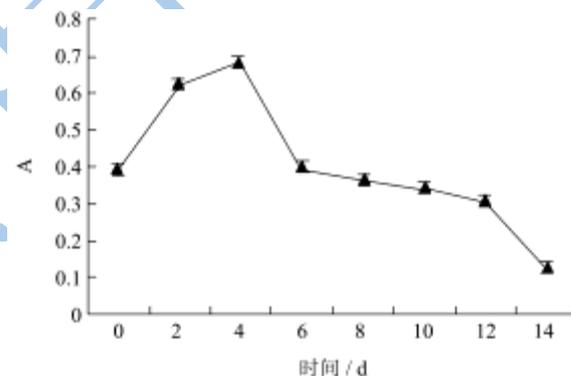


图 6 青钱柳细胞活力随培养时间变化规律

Fig.6 The changes of cell viability during the growth period

通过观察处于某一培养时期的细胞活力的相对大小, 了解培养细胞的新陈代谢的强弱, 即线粒体中有氧呼吸的强度, 从而间接了解细胞的生长状况。TTC 法可以用来测定脱氢酶的活性, 细胞活力强, 新陈代谢旺盛, 这种转化能力就强, 红色深; 而死细胞不变色。在青钱柳愈伤组织悬浮培养的条件下, 细胞在培养的前几天活力逐渐增加, 图 6 所示, 到第 4~5 d 时达到最大值, 而后一直呈现下降趋势。出现上述情况, 可能是因为刚转入的悬浮细胞对新的环境需要逐步适应, 开始时利用培养基中的营养物质进行一系列的修复行为, 此时为细胞分裂的准备期, 细胞内合成大量的能量和必要的代谢物质, 此时的细胞活力最高。随后进入对数生长期, 这个时期养料充足, 细胞大量增殖, 细胞活力相对较高。而随着培养的进行, 培养基

中的养料逐渐消耗,不能很好满足悬浮细胞生长所需养分,因而青钱柳悬浮细胞活力逐渐降低,进入下降期。

2.8 青钱柳悬浮细胞培养过程中糖的消耗

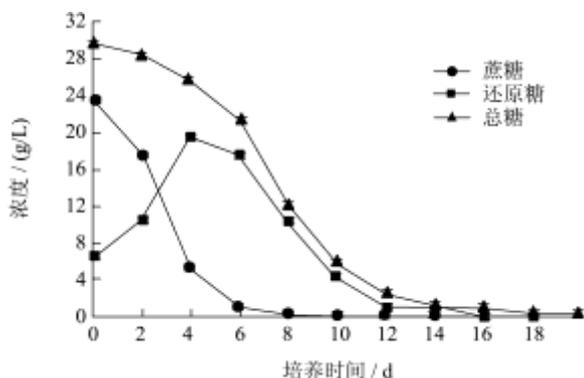


图7 青钱柳细胞悬浮培养过程中糖的消耗变化曲线

Fig.7 Change of sugar contents in the medium during the liquid culture process of *Cyclocarya paliurus* cell

糖类在植物细胞培养中具有重要作用,既为细胞生长提供能量,又为初级、次级代谢物合成提供碳架,同时对渗透压的调节有一定作用。由于植物细胞没有吸收转运蔗糖的系统,培养液中的蔗糖必须先经过转化酶的作用分解成葡萄糖和果糖。在一个培养周期内,培养液中糖含量变化情况如图7所示,在0~6 d蔗糖浓度几乎呈直线下下降趋势,到第8 d蔗糖基本水解完毕,起始蔗糖浓度低于30 g/L是由于经过高压灭菌有少部分蔗糖水解为还原糖。在悬浮培养初期,还原糖含量呈上升的趋势是由于在生长延滞期蔗糖水解快,而细胞生长缓慢,对还原糖的消耗较少,在第4 d后,还原糖含量迅速下降,因为此时细胞开始进入对数生长期,对还原糖的消耗也开始增大而导致还原糖含量下降,培养至12 d后糖基本耗完。从总糖的消耗变化曲线也可以看出,在延滞期糖消耗较为缓慢,而在对数期随着细胞的大量增加,碳源消耗出现了个跃变,从21.42 g/L消耗至2.45 g/L,在整个周期中,糖的利用较为完全。

2.9 青钱柳悬浮细胞培养过程中氮的消耗

在MS培养基中,氮源由18.8 mmol/L KNO_3 和20.63 mmol/L NH_4NO_3 两种物质提供,即硝态氮约为40 mmol/L,铵态氮约为20 mmol/L,青钱柳细胞悬浮培养过程中培养液中 NO_3^- 和 NH_4^+ 浓度的变化曲线如图8所示。在培养的前8 d,培养液中的 NO_3^- 和 NH_4^+ 浓度急剧降低,分别从37.52 mmol/L和18.00 mmol/L降低到15.14 mmol/L和0.17 mmol/L,且 NH_4^+ 的下降幅度明显大于 NO_3^- ,在第8 d, NH_4^+ 基本消耗完毕,

而 NO_3^- 只消耗了60%。第8 d后 NO_3^- 消耗缓慢,到第18 d还剩约16%的 NO_3^- 未被利用。有研究表明植物细胞具有快速利用铵态氮的机制,因此,在生长良好的培养基中,细胞一开始启动生长, NH_4^+ 即被消耗完毕。

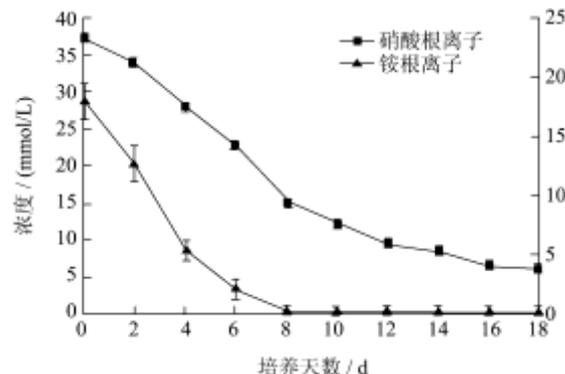


图8 青钱柳细胞悬浮培养过程中氮的消耗变化曲线

Fig.8 Change of nitrogen content in the medium during the cell suspension culture process of *Cyclocarya paliurus*

2.10 青钱柳悬浮细胞培养过程中磷酸盐的消耗

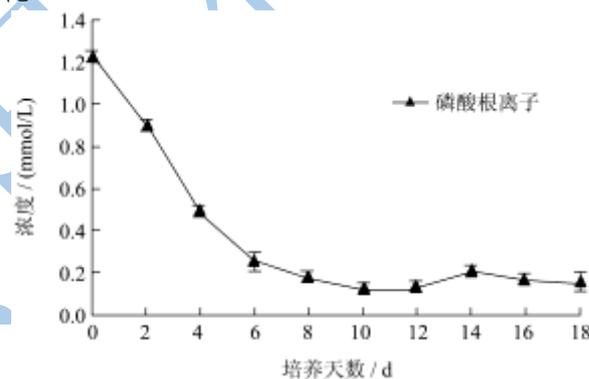


图9 青钱柳细胞悬浮培养过程中磷的消耗变化曲线

Fig.9 Changes of phosphate content in the medium during the cell suspension culture process of *Cyclocarya paliurus*

PO_4^{3-} 是植物细胞内重要的营养成分之一,参与核苷酸、DNA、RNA、磷酸化糖和蛋白质等的形成,是植物细胞内萜类和甾类物质合成途径的中间组分。从图9可以看出,磷酸盐消耗速度很快,培养至第6 d时,几乎消耗了全部磷的80%,而在第6 d后,细胞对磷的吸收较为缓慢。磷酸盐在培养初期的快速吸收可能与细胞生长、分裂时需大量合成核酸物质有关,细胞可能有快速的磷吸收机制,培养初期贮存在细胞内以供细胞生长、繁殖之用,在后续培养中逐步被消耗。

培养液营养成分的消耗动态直接影响细胞的生长^[25]。在研究发现:在培养初期蔗糖、 NH_4^+ 、 PO_4^{3-} 的消耗已达到最大,从以上各基质消耗变化曲线图中可以看出,在细胞培养前期(0~8 d),培养基中的氨盐、磷酸盐、蔗糖含量均呈现急剧下降的趋势,之后各自

变化趋于平缓。这说明青钱柳细胞在 MS 培养基中对各营养物质消耗量集中在培养初期和对数生长期,这三种物质极大地影响了细胞生长量的积累。为了提高青钱柳悬浮细胞培养生物量的积累,需要进行培养基营养物质含量的调配,当细胞培养到对数生长期时要进行细胞继代培养,或者在培养基中适量加大氨盐、磷酸盐及蔗糖的用量,以保证细胞培养中期对营养物质的持续利用。

3 结论

适合青钱柳悬浮培养的培养基为: MS+0.1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L NAA+1 mg/L KT+30 g/L 蔗糖,接种量为 8%,摇瓶装液量的体积分数为 40%,初始 pH 值为 5.0。在一个培养周期内,悬浮培养的青钱柳细胞的生长曲线呈“S”型,第 8 d,青钱柳鲜重鲜重达到最大值 166 g/L;青钱柳细胞生长与碳源、氮源和磷的消耗存在着密切关系,在培养 8 d,糖和 PO_4^{3-} 基本消耗完毕;在氮源的吸收上, NH_4^+ 优于 NO_3^- , NH_4^+ 的吸收基本上是呈直线下降。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第21卷)[M].北京:科学出版社,1979

[2] 应俊生,张玉龙.中国种子植物特有属[M].北京:科学出版社,1994

[3] 中国药材公司.中国中药资源志要[M].北京:科学出版社,1994

[4] 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,2010,32(2):373-377

Zhongping Yin, Xinchun Shangguan, Dongming Li, et al. A study on ultrasonic-assisted of total triterpenoids from *Cyclocarya paliurus* [J]. Acta Agriculture Universitatis Jiangxiensis, 2010, 32(2): 0370-0377

[5] 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

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

[7] Fang S Z, CHU X L, SHANG X L, et al. Seasonal variation of microelement contents in leaves of *Cyclocarya paliurus* among the provenances [J]. Journal of Forestry Research, 2011, 22(2): 225-231

[8] Xie M Y, Li L, Nie S P, et al. Determination of speciation of elements related to blood sugar in bioactive extracts from *Cyclocarya paliurus* leaves by FIA-ICP-MS [J]. European Food Research and Technology, 2006, 223: 202-209

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

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

[11] Fang S Z, Wang J Y. Changes in the biochemical composition and enzyme activity during dormancy release of *Cyclocarya paliurus* seeds [J]. Forestry Studies in China, 2007, 9(1): 7-13

[12] 上官新晨,郭春兰,杨武英,等.培养基及培养条件对青钱柳愈伤组织生长和黄酮含量的影响[J].福建农林大学学报,2006, 6(11):588-592

Xinchen Shangguan, Chunlan Guo, Wuying Yang, et al. Effects of basic medium and culture conditions on callus growth and flavonoid content of *Cyclocarya paliurus* [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University, 2006, 6(11): 588-592

[13] 胡冬南,蒋艳,吴少福,等.青钱柳组织培养的初步研究[J].江西农业大学学报,2005,27(1):39-41

Dongnan Hu, Yan Jiang, Shaofu Wu, Guangyao Yang, et al. A preliminary study on tissue culture of *Cyclocarya paliurus*(batal) Iljinskaja [J]. Acta Agriculture Universitatis Jiangxiensis, 2005, 27(1): 39-41

[14] Towill L E, Mazur P. Studies on reduction of 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue [J]. Can J Bot, 1975, 53(11): 1097-1102

[15] Steponkus P L, Lanphear F O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury [J]. Plant Physiology, 1967, 14 (42):1423-1426

[16] 袁晓华,杨中汉.植物生理生化实验[M].北京:高等教育出版社,1983

[17] 薛应龙.植物生理学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1985

[18] Hecht U, Mohr H. Factors controlling nitrate and ammonium accumulation in mustard seedlings [J]. Plant Physiol, 1990, 8: 379-387

[19] Weatherburn M W. Phenol-Hypochlorite reaction for determination of ammonium [J]. Anal. Chem., 1967, 39: 971-974

[20] 李文安,罗士韦.植物组织和细胞培养技术[M].北京:科学出

- 版社,1988
- [21] 李勇,邢辉,张金芳,等.桑树悬浮细胞生长规律及其生理特性的研究[J].蚕业科学,2007,33(1):91-94
Yong Li, Hui Xing, Jinfang Zhang, et al. Research on the growth regularity and physiological characteristics of mulberry suspension cells [J]. Canye Kexue, 2007, 33(1): 91-94
- [22] 化青报,翟晓巧,段艳芳.木本植物悬浮细胞培养影响因素研究[J].河南林业科学,2008,28(2):13-22
Qingbao Hua, Xiaqiao Zhuo, Yanfang Duan. Research advance in affecting factors of woody plant cell suspension culture [J]. Journal of Henan Forestry Science and Technology, 2008, 28(2): 13-22
- [23] Akalezi C O, Liu S, Li Q S, et al. Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng* [J]. Process Biochem, 1999, 34(6-7): 639-642
- [24] Sakano K, Matsumoto M, Yazaki Y, et al. Inorganic phosphate as a negative conditioning factor in plant cell culture [J]. Plant Sci., 1995, 107(1): 117-124
- [25] Azevedo H, Dias A, Tavares R M. Manuel Tavares establishment and characterization of *Pinus pinaster* suspension cell cultures [J]. Plant Cell Tiss. Organ. Cult., 2008, 93: 115-121