

网络出版时间:2013-12-25 11:05

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.01.021

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.01.021.html

曼地亚红豆杉细胞悬浮培养体系的建立

赵继鹏,杨淑慎

(西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**建立曼地亚红豆杉的愈伤组织细胞悬浮培养体系,为紫杉醇生产提供参考。**【方法】**以曼地亚红豆杉幼茎诱导的愈伤组织为材料,以 B5 培养基为基本培养基,利用单因素试验或正交试验,研究愈伤组织接种量、蔗糖质量浓度、激素类型及配比和防褐化试剂对曼地亚红豆杉细胞生长的影响。**【结果】**曼地亚红豆杉细胞悬浮培养的最佳培养基和培养条件为:B5+2,4-D 0.6 mg/L+NAA 0.8 mg/L+KT 1.0 mg/L+柠檬酸 220 mg/L+PVP 350 mg/L+水解乳蛋白 450 mg/L+蔗糖 30 g/L(pH=5.8),接种量 0.1 g/mL,在培养箱中 110 r/min、25 ℃暗培养。**【结论】**曼地亚红豆杉愈伤组织细胞在所建立的培养体系中经过多次继代后,生长状况良好,表明该细胞悬浮体系比较稳定,可以用于大规模培养红豆杉细胞。

[关键词] 曼地亚红豆杉;愈伤组织;细胞悬浮培养;植物生长激素;防褐化试剂

[中图分类号] Q813.1⁺1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)01-0189-07

Establishment of cell suspension culture system for *Taxus media*

ZHAO Ji-peng, YANG Shu-shen

(College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** This study aimed to establish a suspension culture system for *Taxus media* cell so as to improve the production of taxol. **【Method】** The callus was extracted from stems of young *Taxus media*. Effects of sugar, callus inoculum size, phytohormones and anti-browning reagents on the growth of cells were studied by orthogonal test design with basic medium B5. **【Result】** The best culturing medium for *Taxus media* cells was B5+2,4-D 0.6 mg/L+NAA 0.8 mg/L+KT 1.0 mg/L+citric acid 220 mg/L+PVP 350 mg/L+LH 450 mg/L+sucrose 30 g/L (pH=5.8). The best culturing conditions were: Inoculum size 0.1 g/mL, incubator rotation speed 110 r/min, temperature 25 ℃, and in dark environment. **【Conclusion】** Cells grew well in the proposed culturing system, indicating that the stable cell suspension system was suitable for large-scale cultivation of *Taxus* cells.

Key words: *Taxus media*; callus; cell suspension cultures; plant growth hormone; anti-browning reagent

紫杉醇(Taxol)是存在于红豆杉科红豆杉属植物中的一种四环二萜酰胺类化合物,经临床证明,其治疗卵巢癌、肺癌等多种癌症有特效,市场需求量日益增加^[1]。但由于其药源植物红豆杉生长缓慢,且紫杉醇含量极低(0.01%~0.02%),无法满足市

场需求^[2]。

曼地亚红豆杉(*Taxus media*)是东北红豆杉与欧洲红豆杉的天然杂交品种。该植物枝叶茂盛,生长速度快,对环境适应能力强,能在多种气候和土壤条件下生长,且树皮和枝叶中均含有紫杉醇(0.04%

[收稿日期] 2013-0128

[基金项目] 陕西省教育厅资助项目(017K107);陕西省科学技术研究发展计划项目(2009K01-11)

[作者简介] 赵继鹏(1987—),男,河南焦作人,硕士,主要从事植物多样性及其利用研究。E-mail:zhaojipeng123456@163.com

[通信作者] 杨淑慎(1956—),女,陕西黄陵人,教授,博士生导师,主要从事植物抗逆生理与植物细胞工程研究。

E-mail:yangshushen2002@163.com

左右),因此成为提取紫杉醇的最佳原料^[3]。

目前,紫杉醇的生产途径主要有:从树皮中提取、化学合成、真菌生产和植物细胞培养等。其中细胞培养具有原料丰富、大规模反应较易实现等优点,因此成为工业化生产紫杉醇的最佳途径^[4]。本研究以曼地亚红豆杉愈伤组织为材料,以愈伤组织接种量、蔗糖质量浓度、激素类型及配比和防褐化试剂为考察因素,通过单因素试验或正交试验,对曼地亚红豆杉细胞悬浮培养的培养基组成和培养条件进行优化,以期为大规模培养红豆杉细胞、扩大紫杉醇生产量奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

试验材料为曼地亚红豆杉愈伤组织:从西北农林科技大学博览园中栽培的 7 年生曼地亚红豆杉采集幼茎,在西北农林科技大学生命科学学院细胞工程实验室中,经过 5 次以上继代生长获得。

1.2 曼地亚红豆杉细胞悬浮培养的影响条件

1.2.1 愈伤组织接种量对细胞悬浮培养的影响
以蔗糖质量浓度为 30 g/L 且不含激素的液体 B5 培养基为基本培养基,每个 50 mL 锥形瓶中加入 12.5 mL 液体 B5 培养基,愈伤组织接种量设置 0.06, 0.08,0.10,0.12,0.14 g/mL 5 个水平,培养 15 d 后,测定细胞的生物量与褐化程度。每样品设 3 个平行试验,研究愈伤组织接种量对曼地亚红豆杉细胞悬浮培养的影响。

1.2.2 蔗糖质量浓度对细胞悬浮培养的影响
以不含激素的液体 B5 培养基为基本培养基,设置 20, 25,30,35,40 g/L 5 个不同蔗糖质量浓度,愈伤组织接种量为 1.25 g/瓶,培养 15 d 后,测定细胞的生物量。每样品设 3 个平行试验,研究蔗糖质量浓度对曼地亚红豆杉细胞悬浮培养的影响。

1.2.3 激素类型及配比对细胞悬浮培养的影响
以蔗糖质量浓度为 30 g/L 的液体 B5 培养基为基本培养基,愈伤组织接种量为 1.25 g/瓶,选择 2,4-D、NAA、KT 3 种激素进行单因素试验,激素单因素试验水平设计为:2,4-D (0,0.1,0.3,0.5,0.7,0.9 mg/L),NAA(0,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mg/L),KT (0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 mg/L)。在单因素试验的基础上,进行三因素三水平正交试验(表 1),培养 15 d 后,根据细胞的生物量与褐化程度确定激素的最优组合,每样品设 3 个平行试验。

表 1 激素对比对曼地亚红豆杉细胞悬浮培养影响的 L₉(3⁴) 正交试验因素设计
Table 1 Factors and levels of L₉(3⁴) orthogonal design for investigating effects of growth hormone on suspension culturing of *Taxus media* cell

水平 Level	因素/(mg·L ⁻¹) Factors		
	2,4-D A	NAA B	KT C
1	0.6	0.8	0.8
2	0.7	1.0	1.0
3	0.8	1.2	1.2

1.2.4 防褐化试剂对细胞悬浮培养的影响
以 B5+2,4-D 0.6 mg/L+NAA 0.8 mg/L+KT 1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L 为基本培养基,愈伤组织接种量为 1.25 g/瓶,选取柠檬酸、PVP 和水解乳蛋白 3 种防褐化试剂进行单因素试验,防褐化试剂单因素试验水平设计为:柠檬酸 (0(对照 CK),100,200, 300,400,500 mg/L),PVP (0(对照 CK),100,300, 500,700,900 mg/L),水解乳蛋白 (0(对照 CK), 100,300,500,700,900 mg/L)。根据单因素试验结果进行三因素三水平正交试验(表 2),研究 3 种防褐化试剂对细胞悬浮培养的影响,以获得最佳的防褐化试剂组合,每样品设 3 个平行试验。

表 2 3 种防褐化试剂对曼地亚红豆杉细胞悬浮培养影响的 L₉(3⁴) 正交试验因素设计
Table 2 Factors and levels of L₉(3⁴) orthogonal design for investigating effects of three anti-browning

水平 Level	因素/(mg·L ⁻¹) Factors		
	柠檬酸 Citric acid A	PVP B	水解乳蛋白 LH C
1	180	250	450
2	200	300	500
3	220	350	550

1.3 测定指标及方法

1.3.1 愈伤组织的指标测定
(1)褐化程度的测定。观察愈伤组织的颜色,将其褐化程度分为 4 个等级^[5]。1 级:表示没有褐化;2 级:表示轻微褐化;3 级:表示褐化严重;4 级:表示褐化很严重。(2)细胞鲜质量的测定。曼地亚红豆杉悬浮培养细胞 5 000 r/min 离心 10 min,去掉上清液,沉淀物用滤纸吸干剩余水分,然后称其鲜质量。(3)愈伤组织增殖指标。增质量(g)=每瓶悬浮细胞鲜质量-愈伤组织接种量;增殖倍数=增质量/接种量;比鲜质量增长率(d⁻¹)=增质量/愈伤组织接种量×培养时间^[6]。
1.3.2 紫杉醇含量的测定
将 1.3.1 中离心获得的细胞在 40 ℃ 条件下烘干至恒质量,研磨,称取 0.1

g 细胞干样置于试管中,加入乙酸乙酯-丙酮(体积比为 1 : 1)10.0 mL,浸提 24 h,超声处理 20 min 后过滤,将滤液于 40 ℃下旋转蒸发至浸膏状,再用二氯甲烷-水(体积比为 1 : 1) 10.0 mL 进行 2 次萃取,取有机相,水相中则再加入等体积的二氯甲烷萃取,合并有机相,在旋转蒸发仪上于 40 ℃下浓缩至干燥,用甲醇 10.0 mL 定容^[7-10]。采用文献[8]中的方法进行细胞内紫杉醇含量的测定。

1.4 曼地亚红豆杉细胞悬浮培养体系的验证

以 B5+2,4-D 0.6 mg/L+NAA 0.8 mg/L+KT 1.0 mg/L+柠檬酸 220 mg/L+PVP 350 mg/L+水解乳蛋白 450 mg/L+蔗糖 30 g/L 为培养基,愈伤组织接种量为 1.25 g/瓶,在每个 50 mL 培养瓶中装 12.5 mL 液体 B5 培养基(均已高压灭菌,灭菌前 pH=5.8),在培养箱中 110 r/min、25 ℃ 黑暗振荡培养。从培养的第 1 天起到第 31 天,每隔 3 d 取 1 次样,3 次重复。根据细胞鲜质量计算细胞的增殖倍数,绘制生长曲线;根据细胞内的紫杉醇含量绘制紫杉醇含量变化曲线。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织接种量对曼地亚红豆杉悬浮培养细胞生长的影响

2.1.1 对悬浮细胞生长的影响 愈伤组织接种量对曼地亚红豆杉悬浮培养细胞生长的影响见图 1。由图 1 可以看出,在愈伤组织接种量低于 0.08 g/mL 时,曼地亚红豆杉悬浮培养细胞生长缓慢,当接种量为 0.10 g/mL 时,细胞的比鲜质量增长率达到最大,统计分析表明达差异显著水平($P<0.05$)。说明细胞密度需积累到一定程度才有利于细胞悬浮生长,接种量稍大或稍小均不利于细胞生长。

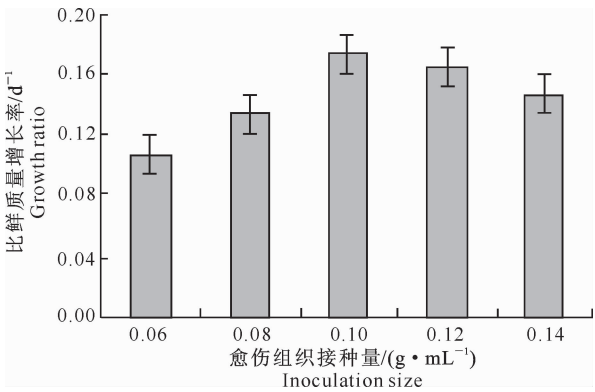


图 1 愈伤组织接种量对曼地亚红豆杉悬浮培养细胞生长的影响

Fig. 1 Effects of inoculation size on growth of *Taxus media* suspension cells

2.1.2 对悬浮细胞褐化的影响 由表 3 和图 2 可以看出,曼地亚红豆杉愈伤组织接种量对细胞褐化的影响很大。随着接种量的增大,细胞褐化的程度逐渐加重,接种量为 0.12 和 0.14 g/mL 的细胞褐化严重,这可能是因为接种量大,细胞密度高,养分不足,致使细胞褐化加重。

综合接种量对细胞生长和细胞褐化的影响,细胞悬浮培养中曼地亚红豆杉愈伤组织接种量以 0.1 g/mL 较适宜。

表 3 愈伤组织接种量对曼地亚红豆杉悬浮培养细胞褐化的影响

Table 3 Effects of callus inoculation size on browning of *Taxus media* suspension cells

愈伤组织接种量/ (g · mL ⁻¹) Inoculation size	愈伤组织颜色 Callus color	褐化程度 Degree of browning
0.06	黄白色 Olivine	2
0.08	浅红褐色 Thin brown	3
0.10	浅红褐色 Thin brown	3
0.12	深红褐色 Think brown	4
0.14	深红褐色 Think brown	4

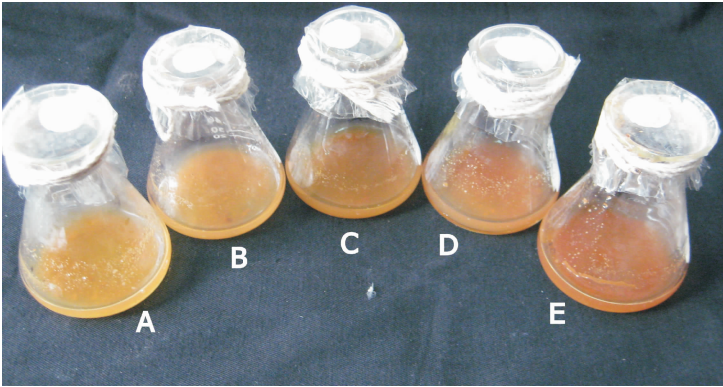


图 2 愈伤组织接种量对曼地亚红豆杉悬浮培养细胞褐化的影响

A. 0.06 g/mL; B. 0.08 g/mL; C. 0.10 g/mL; D. 0.12 g/mL; E. 0.14 g/mL

Fig. 2 Effects of callus inoculation size on browning of *Taxus media* suspension cells

2.2 蔗糖质量浓度对曼地亚红豆杉悬浮培养细胞生长的影响

图 3 显示,蔗糖质量浓度对曼地亚红豆杉细胞悬浮培养具有较大的影响,在蔗糖质量浓度为 20~30 g/L 时,悬浮培养细胞的生长率呈上升趋势;当蔗糖质量浓度高于 30 g/L 时,细胞的比鲜质量增长率呈下降趋势,所以选择 30 g/L 作为曼地亚红豆杉细胞悬浮培养的适宜蔗糖质量浓度。

2.3 激素类型及配比对曼地亚红豆杉悬浮培养细胞生长的影响

从图 4 可知,在曼地亚红豆杉悬浮培养体系中,2,4-D、NAA 和 KT 3 种激素的适宜质量浓度分别为 0.7,1.0 和 1.0 mg/L;且均表现为随着激素质量浓度的增加,悬浮细胞的比鲜质量增长率呈先增加

后降低的趋势。

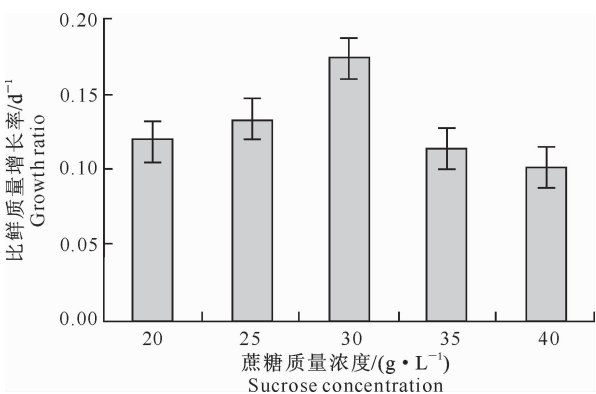


图 3 蔗糖质量浓度对曼地亚红豆杉悬浮培养细胞生长的影响

Fig. 3 Effects of sucrose concentration on the growth of *Taxus media* suspension cells

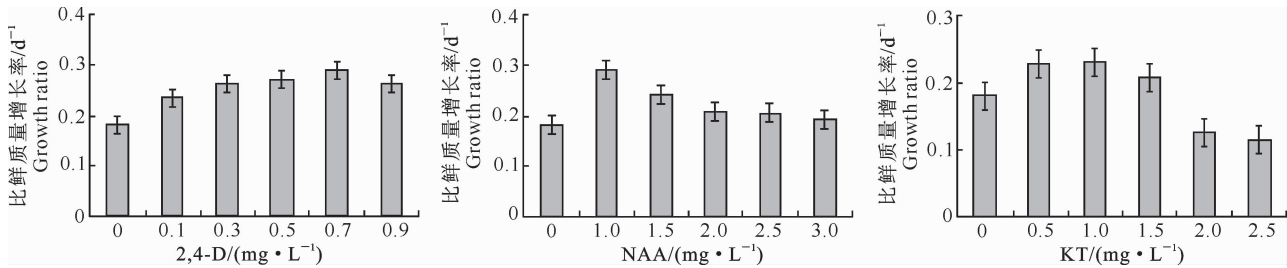


图 4 2,4-D、NAA 和 KT 3 种生长激素对曼地亚红豆杉细胞悬浮培养的影响

Fig. 4 Effects of 2,4-D,NAA and KT on the growth of *Taxus media* suspension cells

以 3 种激素的单因素试验结果为基础进行正交试验,结果见表 4。从表 4 可知,3 种激素的最佳配比为 A₁B₁C₂:2,4-D 0.6 mg/L+NAA 0.8 mg/L+

KT 1.0 mg/L,3 种激素对曼地亚红豆杉愈伤组织增殖的影响大小为 NAA>KT>2,4-D。

表 4 2,4-D、NAA 和 KT 3 种生长激素对曼地亚红豆杉细胞悬浮培养影响的正交试验结果

Table 4 Orthogonal experiment for investigating effects of 2,4-D,NAA and KT on the growth of *Taxus media* suspension cells

编号 No.	植物生长激素 Plant growth hormone			增殖倍数 Ratios of proliferation	愈伤组织颜色 Callus color	褐化程度 Degree of browning
	2,4-D	NAA	KT			
1	1	1	1	3.49	浅红褐色 Thin brown	3
2	1	2	2	3.08	浅红褐色 Thin brown	3
3	1	3	3	1.82	浅红褐色 Thin brown	3
4	2	1	2	4.58	浅红褐色 Thin brown	3
5	2	2	3	1.55	黄白色 Olivine	2
6	2	3	1	1.58	浅红褐色 Thin brown	3
7	3	1	3	2.21	浅红褐色 Thin brown	3
8	3	2	1	2.62	浅红褐色 Thin brown	3
9	3	3	2	2.28	浅红褐色 Thin brown	3
K ₁	2.797	3.427	2.563			
K ₂	2.570	2.417	3.313			
K ₃	2.370	1.893	1.860			
R	0.427	1.534	1.453			

2.4 防褐化试剂对曼地亚红豆杉悬浮培养细胞生长的影响

防褐化试剂柠檬酸、PVP 和水解乳蛋白对曼地

亚红豆杉悬浮培养细胞生长影响的单因素试验结果见表 5。由表 5 可以看出,3 种防褐化试剂均能有效降低细胞的褐化程度,且对细胞生长有促进作用,均

表现为随着防褐化试剂质量浓度的增加,悬浮细胞的增殖倍数呈先增高后降低的趋势,柠檬酸、PVP、

水解乳蛋白的最适质量浓度分别为 200,300 和 500 mg/L。

表 5 3 种防褐化试剂对曼地亚红豆杉细胞悬浮培养的影响

Table 5 Effects of three anti-browning reagents on <i>Taxus media</i> suspension cells						
因素 Factors	水平/(mg·L ⁻¹) Level	鲜质量/g Results weight	增质量/g Weight gain	增殖倍数 Ratios of proliferation	愈伤组织颜色 Callus color	褐化程度 Degree of browning
CK	0	4.43	3.18	2.54	浅红褐色 Thin brown	3
	100	5.24	3.99	3.19	黄白色 Olivine	2
	200	6.39	5.14	4.11	黄白色 Olivine	2
	300	5.09	3.84	3.07	浅红褐色 Thin brown	3
	400	4.84	3.59	2.87	浅红褐色 Thin brown	3
	500	3.60	2.35	1.88	深红褐色 Think brown	4
柠檬酸 Citric acid	100	5.83	4.58	3.66	黄白色 Olivine	2
	300	6.02	4.75	3.80	黄白色 Olivine	2
	500	4.94	3.69	2.95	黄白色 Olivine	2
	700	4.75	3.50	2.80	浅红褐色 Thin brown	3
	900	4.65	3.40	2.72	浅红褐色 Thin brown	3
PVP	100	6.41	5.16	4.13	黄白色 Olivine	2
	300	7.14	5.89	4.71	黄白色 Olivine	2
	500	7.96	6.71	5.37	浅红褐色 Thin brown	3
	700	6.93	5.68	4.54	浅红褐色 Thin brown	3
	900	6.38	5.13	4.10	浅红褐色 Thin brown	3
水解乳蛋白 LH	100	6.41	5.16	4.13	黄白色 Olivine	2
	300	7.14	5.89	4.71	黄白色 Olivine	2
	500	7.96	6.71	5.37	浅红褐色 Thin brown	3
	700	6.93	5.68	4.54	浅红褐色 Thin brown	3
	900	6.38	5.13	4.10	浅红褐色 Thin brown	3

以 3 种防褐化试剂的单因素试验结果为基础进行正交试验,结果见表 6。表 6 表明,防褐化试剂的最佳配比为 A₃B₃C₁: 柠檬酸 220 mg/L+PVP 350 mg/L+水解乳蛋白 450 mg/L, 3 种防褐化试剂对悬浮细胞生长的影响大小依次为柠檬酸>PVP>水解乳蛋白。对比表 5 和表 6 可以发现,正交试验中

曼地亚红豆杉愈伤组织的最大增殖倍数低于单因素试验中水解乳蛋白为 500 mg/L 时的细胞增殖倍数,这是因为在正交试验中,各组的试剂配比未达到 3 种防褐化试剂的最佳配比,且 PVP 可能对水解乳蛋白和柠檬酸产生吸附作用,降低了其在悬浮培养液中的实际质量浓度。

表 6 3 种防褐化试剂对曼地亚红豆杉细胞悬浮培养影响的正交试验结果

Table 6 Effects of three anti-browning reagents on <i>Taxus media</i> suspension cells						
编号 No.	防褐化试剂 Anti-browning reagent			增殖倍数 Ratios of proliferation	愈伤组织颜色 Callus color	褐化程度 Degree of browning
	柠檬酸 Citric acid	PVP	水解乳蛋白 LH			
1	1	1	1	2.76	黄白色 Olivine	2
2	1	2	2	2.60	黄白色 Olivine	2
3	1	3	3	3.31	黄白色 Olivine	2
4	2	1	2	4.10	浅红褐色 Thin brown	3
5	2	2	3	3.69	浅红褐色 Thin brown	3
6	2	3	1	5.10	浅红褐色 Thin brown	3
7	3	1	3	3.01	浅红褐色 Thin brown	3
8	3	2	1	5.11	浅红褐色 Thin brown	3
9	3	3	2	5.30	浅红褐色 Thin brown	3
K ₁	2.890	3.290	4.323			
K ₂	4.297	3.800	4.000			
K ₃	4.473	4.570	3.337			
R	1.583	1.280	0.986			

2.5 曼地亚红豆杉细胞生长曲线和紫杉醇含量变化曲线

在最佳的悬浮培养体系中,曼地亚红豆杉细胞的生长曲线(图 5-A)体现了红豆杉细胞生长缓慢的特点,在培养前 4 d 细胞鲜质量变化不明显,接种后第 5 天细胞迅速生长,16 d 时,细胞增殖倍数达到 3

左右,细胞生长进入稳定期。细胞内紫杉醇含量在培养前 7 d 逐渐减少(图 5-B),10 d 时紫杉醇含量开始增加;22 d 时细胞内的紫杉醇含量趋于稳定。这可能是因为培养液内碳源等营养物质不断消耗,使细胞生长受到影响,因此紫杉醇含量的增幅减小。

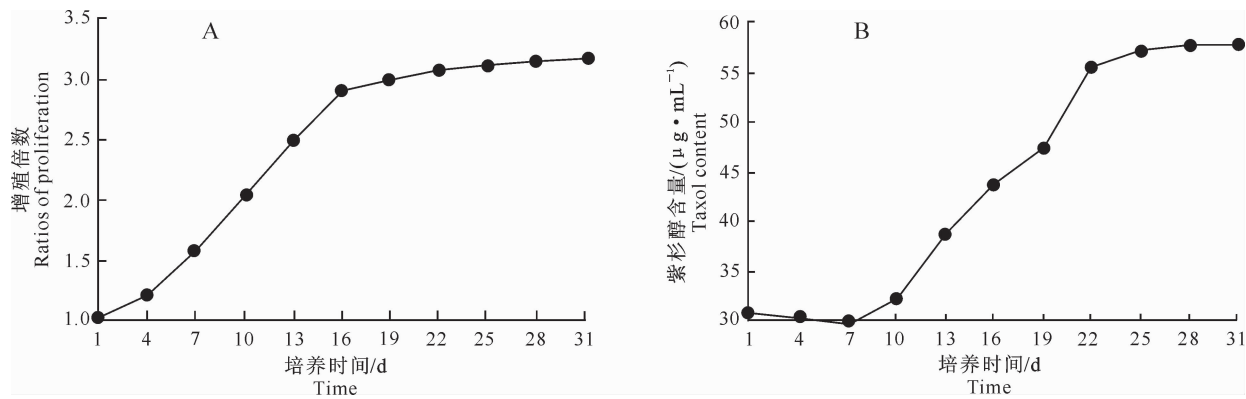


图 5 曼地亚红豆杉细胞生长曲线(A)和紫杉醇含量变化曲线(B)
Fig. 5 *Taxus media* cell growth curve (A) and taxol content curve (B)

3 讨论

通过红豆杉细胞培养生产紫杉醇是解决紫杉醇药源问题的有效途径,国内许多研究者做了大量有价值的探索,但是对我国大面积种植的曼地亚红豆杉的研究较少^[11-12]。本试验通过对曼地亚红豆杉悬浮培养条件的研究,建立了曼地亚红豆杉细胞悬浮培养体系。

建立良好的细胞悬浮培养体系是进行大规模细胞培养的的必要准备^[13]。本试验发现,曼地亚红豆杉细胞的接种量以 0.1 g/mL 为最佳,接种量低于 0.1 g/mL 时,细胞不能很好地生长;高于 0.1 g/mL 时,细胞很快会褐化,影响细胞的生长。蔗糖是细胞生长的重要碳源,适宜质量浓度的蔗糖能提高培养细胞的生长速率,而较高的蔗糖质量浓度则容易使细胞产生褐变^[14]。本研究结果表明,利于曼地亚红豆杉细胞生物量增加的蔗糖质量浓度以 30 g/L 为最优,当蔗糖质量浓度高于 30 g/L 时,细胞褐化严重,影响细胞的正常生长。

植物生长激素能够促进植物细胞的生长和繁殖,但是较高质量浓度的激素反而会对细胞生长起抑制作用,合适的激素类型和配比是悬浮体系建立成功与否的关键^[15-16]。有研究表明,外源 2,4-D 有利于愈伤组织的生长^[17],但对次生代谢物的合成往往有抑制作用^[18]。如司徒琳莉等^[19]在东北红豆杉细胞培养研究中发现,培养基中添加一定质量浓度的 2,4-D 可以显著提高细胞的生长速率,增加生物量;同时再添加适宜质量浓度的 NAA 和 KT 则可以提高紫杉醇的积累。本试验结果显示,在曼地亚红豆杉细胞培养中,2,4-D、NAA 和 KT 3 种激素的适宜配比为:2,4-D 0.6 mg/L+NAA 0.8 mg/L+KT 1.0 mg/L;3 种激素对曼地亚红豆杉细胞生长

的影响大小依次为 NAA>KT>2,4-D。

防褐化试剂(如水解乳蛋白和柠檬酸)可以有效抑制细胞的褐化,延长细胞的生长周期,且一些防褐化试剂可以促进细胞的生长和细胞内紫杉醇含量的提高^[20-24]。本试验发现,水解乳蛋白、PVP 和柠檬酸 3 种防褐化试剂对曼地亚红豆杉悬浮培养细胞褐化具有明显的抑制作用,且以柠檬酸对细胞生长的影响最大。

本研究建立的曼地亚红豆杉细胞悬浮培养体系,对于通过细胞培养生产临床急需的抗肿瘤药物紫杉醇具有极其重要的价值,对工业化生产紫杉醇也将产生极大的促进作用。

[参考文献]

[1] 王昌伟,彭少麟,李鸣光,等. 红豆杉中紫杉醇及其衍生物含量影响因子研究进展 [J]. 生态学报,2006,26(5):1583-1590.
Wang C W, Peng S L, Li M G, et al. Review of factors affecting the taxoids content of *Taxus* spp [J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(5): 1583-1590. (in Chinese)

[2] Kingston D G I. Taxol, a molecule for all seasons [J]. Chem Commun, 2001, 75: 867-880.

[3] 冯 巍, 谈 锋, 谢 峻. 曼地亚红豆杉研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(10): 1589-1593.
Feng W, Tan F, Xie J. Advances in studies on *Taxus media* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, 38(10): 1589-1593. (in Chinese)

[4] 庄晓蕾, 张秀清, 于树宏, 等. 红豆杉细胞培养生产紫杉醇的研究进展 [J]. 中草药, 2000, 31(10): 794-798.
Zhuang X L, Zhang X Q, Yu S H, et al. Progress in the research on production of Taxol by *Taxus* cell culture [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2000, 31(10): 794-798. (in Chinese)

[5] 胡 凯, 祝顺琴, 谈 锋. 曼地亚红豆杉愈伤组织诱导和继代培养中抑制褐化的研究 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2004, 29(4): 659-663.
Hu K, Zhu S Q, Tan F. Studies on callus induction of *Taxus*

- media and darkening inhibition in callus subculture [J]. Journal of Southwest China Normal University: Natural Science Edition, 2004, 29(4): 659-663. (in Chinese)
- [6] Zhang Z Q, Yang J Y, Wu Y W. Taxol production in tissue culture of *Taxus chinensis* var *mairei* [J]. Acta Bot Boreal Occident Sin, 1998, 18: 488-492.
- [7] Baebler S, Camloh M, Kovac M, et al. Jasmonic acid stimulates taxane production in cell suspension culture of yew (*Taxus media*) [J]. Planta Med, 2002, 68(5): 475-480.
- [8] Yuan Y J, Li C, Hu Z D, et al. Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* for taxol production [J]. Process Biochemistry, 2002, 38: 193-198.
- [9] Wang Y D, Yuan Y J, Wu J C. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 19: 259-265.
- [10] Cusido R M, Palazon J, Osorio A, et al. Production of taxol and baccatibya selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture [J]. Plant Science, 1999, 146: 101-107.
- [11] 郝大程, 肖培根, 彭 勇, 等. 红豆杉药物资源的生物学和化学研究进展及趋势分析 [J]. 药学报, 2012, 47(7): 827-835.
Hao D C, Xiao P G, Peng Y, et al. Research progress and trend analysis of biology and chemistry of *Taxus* medicinal resources [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2012, 47(7): 827-835. (in Chinese)
- [12] 王亚飞, 王 强, 阮晓红, 等. 红豆杉属植物资源的研究现状与开发利用对策 [J]. 林业科学, 2012, 48(5): 116-125.
Wang Y F, Wang Q, Ruan X H, et al. Research status and utilization strategies of rare medicinal plants in *Taxus* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2012, 48(5): 116-125. (in Chinese)
- [13] 王 娟, 高文远, 尹双双. 药用植物细胞悬浮培养的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 3680-3683.
Wang J, Gao W Y, Yin S S. Research progress in medicinal plant cell suspension culture [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2012, 37(24): 3680-3683. (in Chinese)
- [14] Kim J H, Yun J H, Hwang Y S, et al. Production of taxol and related taxanes in *Taxus brevifolia* cell culture; Effect of sugar [J]. Biotechnol Lett, 1995, 17: 101-106.
- [15] Hirasuna T J, Pestchanker L J, Srinivasan V, et al. Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata* [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1996, 44: 95-102.
- [16] Hu Y M, Gan F Y, Lu C H, et al. Productions of Taxol and related *Taxanes* by cell suspension cultures of *Taxus yunnanensis* [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(3): 373-378.
- [17] Gao W Y, Jia W, Duan H Q, et al. Industrialization of medicinal plant tissue culture [J]. China J Chin Mater Med, 2003, 28: 385-390.
- [18] Marion Poll A, Caboche M. Relationship between auxin and amino acid metabolism of tobacco protoplast-derived cells [J]. Plant Physiol, 1984(75): 1048-1053.
- [19] 司徒琳莉, 李振山. 培养基成分对东北红豆杉细胞生长和紫杉醇产量的影响 [J]. 遗传, 2001, 23(4): 325-328.
Situ L L, Li Z S. The relation between the cell growth, the volume of *Taxus cuspidate* and the composition of its cell culture medium [J]. Hereditas, 2001, 23(4): 325-328. (in Chinese)
- [20] 李冬杰, 张进献, 魏景芳. 培养基和培养条件与红豆杉细胞培养中褐化的关系 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(1): 95-98.
Li D J, Zhang J X, Wei J F. Relationship between culture medium and culture condition and avoiding browning in cell culture of *Taxus* [J]. Plant Physiology Communications, 2005, 41(1): 95-98. (in Chinese)
- [21] 盛长忠, 王淑芳, 王宁宁, 等. 红豆杉愈伤组织培养中褐变现象的初探 [J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2001, 34(4): 120-122.
Sheng C Z, Wang S F, Wang N N, et al. Preliminary studies on decreasing browning in *T. chinensis* var. *mairei* tissue cultures [J]. Journal of Nankai University: Natural Science, 2001, 34(4): 120-122. (in Chinese)
- [22] Wang P Z, Zhao X, Zhang Z S. Study on the browning in cell suspension culture of *Taxus cuspidata* [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(5): 935-937.
- [23] 李 健, 宋晓平, 陈树林. 红豆杉属植物组织与细胞培养影响因素研究进展 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(10): 42-46.
Li J, Song X P, Chen S L. Advances in research on affecting factors of tissue and cell culture of *Taxus* [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2005, 33(10): 42-46. (in Chinese)
- [24] Khosroushahi A Y, Valizadeh M, Ghasempour A. Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata* [J]. Cell Biol Int, 2006, 30(3): 262-269.