

## 长春花组织培养研究进展

曾智发<sup>1</sup>, 柳润辉<sup>1,2</sup> (1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

**[摘要]** 长春花含有 100 多种吲哚类生物碱, 具有抗肿瘤、降血压等多种生物活性, 有较高的药用价值, 但是含量偏低。长春花组织培养可从提高繁殖系数、调控次生代谢产物的累积等来提高长春花生物碱类成分含量。本文就外植体和培养基的选择、药用成分累积的影响因素、悬浮细胞培养应用、影响毛状根因素和基因工程技术应用等方面, 综述了长春花组织培养的主要研究进展, 为进一步开发利用长春花药物资源提供参考。

**[关键词]** 长春花; 组织培养; 次生代谢产物

**[中图分类号]** R931.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)04-0258-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.04.004

## Progress on tissue culture of *Catharanthus roseus*

ZENG Zhi-fa<sup>1</sup>, LIU Run-hui<sup>1,2</sup> (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** *Catharanthus roseus* (L.) G. Don contained more than 100 known indole alkaloids, some of which had anti-cancer, lowering blood pressure and other biological activity. *Catharanthus roseus* had a high medicinal value, but the content of alkaloids was very low. In order to improve the content of alkaloid, the technology of tissue culture had been applied in *Catharanthus roseus*, such as improving the propagation coefficient and controlling the accumulation of secondary metabolites. To provide reference in further development and utilization of *Catharanthus roseus* drug resources, the main research progress of tissue culture of *Catharanthus roseus* including the impact factors of medicinal components accumulation, suspension cell culture applications, the impact factors of hairy roots and application of genetic engineering technology were reviewed in this paper.

**[Key words]** *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; tissue culture; secondary metabolites

长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 为夹竹桃科 (Apocynaceae) 长春花属 (*Catharanthus*) 多年生常绿草本植物, 又称雁来红、日日新、四时春和三万花等, 原产于非洲东部, 现广泛栽培于热带和亚热带地区, 我国华东、中南及西南有栽培。长春花全草入药, 具有解毒抗癌、清热平肝等功效, 主治多种肿瘤、高血压、痈肿疮毒以及烫伤等<sup>[1]</sup>。文献报道, 已从长春花中发现 100 多种吲哚类生物碱, 其中长春碱 (vinblastine) 和长春新碱 (vincristine) 具有抗肿瘤活性; 文多灵碱 (vindoleine) 和长春质碱 (catharanthine) 是长春碱和长春新碱的前体, 具有降血糖作用; 阿玛碱 (ajmalicine) 可治疗高血压; 蛇根碱 (serpentine) 具有镇定作用等。然而长春花中的生物碱含量太低, 尤其是长春碱和长春新碱仅为百分之几至十万分之几, 不能满足市场的需求, 化学合成和半合成的结果也不太理想<sup>[2,3]</sup>。长春花生物碱类产品的大规模生产就有可能导致许多不良后果: 过度利用野生长春花导致资

源枯竭; 因生产需要过度扩大长春花的种植面积, 从而毁坏自然林地、沙滩地<sup>[4]</sup>。

目前有关长春花的研究主要集中在长春花的药理作用、化学提取、组织培养、长春碱和长春新碱的合成和化学修饰、生物转化和基因工程等。长春花组织培养技术主要通过愈伤组织的诱导和细胞悬浮及毛状根的大量培养, 直接提取长春新碱和长春碱等次生代谢产物作为药物成分; 借助基因工程技术来阐释长春花植物体内生物碱类成分的合成调控机制, 筛选出有利于长春花中特定的有效药用成分积累的途径。本文对此进行综述, 为进一步研究、开发利用长春花药用成分提供资料。

### 1 外植体与培养基的选择

外植体是指进行培养的植物材料, 包括各种植物器官、组织、细胞和原质体。长春花一般采用芽、叶、茎等部位作为外植体, 培养基大多以 MS 为基本培养基, 蔗糖浓度 3%, pH 5.8~6.0, 另外不同培养阶段对培养基的要求也不尽相同。陈泉等<sup>[5]</sup>以长春花无菌苗的芽为外植体, 在 MS (基础培养基) 培

**[作者简介]** 曾智发 (1985-), 男, 硕士研究生, Tel: 13916289413, E-mail: zzhf123@yahoo.com.cn.

**[通讯作者]** 柳润辉. Tel: 13611879691, E-mail: lyliurh@126.com.

培养基上组合不同激素,得到生长旺盛、叶色浓绿的壮苗,芽增殖系数多达4.83;进一步生根培养,得到的发根早且根系状态好,长势旺,无愈伤组织,也没有新芽诱出,生根率最高,平均根数多。唐忠海等<sup>[6]</sup>以根、茎、叶为外植体,叶片对愈伤组织的诱导率高达88%,为最高,根次之,茎的诱导率最低。严春艳等<sup>[7]</sup>以长春花的幼嫩叶片为外植体,诱导的愈伤组织呈黄褐色疏松状,且诱导率高达90%。

## 2 影响长春花中主要药用成分积累的因素

植物组织培养不仅可以促进植物的生长发育,还能够增加植株内次生代谢产物的积累。长春花细胞组织培养及其细胞生长和生物碱的合成,受内部机制和外部环境共同调控<sup>[8]</sup>。为了提高长春花中生物碱类成分的含量,长春花组织培养大都进行了不同的物理、化学因素的调控。

### 2.1 化学因素

**2.1.1 植物调节剂** 不同种类、浓度和比例的植物生长调节剂,可以调节培养物的生长发育进程、分化方向和器官发生。长春花组织培养中,常用生长素有IAA(吲哚乙酸)、NAA(萘乙酸)、2,4-D(二氯苯氧乙酸),常用细胞分裂素有6-BA(苄基腺嘌呤)、KT(激动素),生长素和细胞分裂素可单独使用,也可进行不同浓度的组合,根据培养阶段和外植体情况而定。2,4-D有利于长春花的正常愈伤组织生长,但却抑制突变愈伤组织的生长,对于二者的吲哚总碱的积累有抑制作用,而采用NAA或IAA替代2,4-D后,吲哚总碱含量有所增加,两种生长素的组合比单一的生长素更利于吲哚总碱积累,尤其是NAA和IAA共同作用最有利于吲哚总碱积累<sup>[9,10]</sup>。长春花细胞培养早期添加外源性细胞分裂素或者后期添加乙烯(通过乙烯利降解)均可以极大地提高长春花细胞中阿玛碱的含量,两者联合使用对阿玛碱含量的影响具有相加效应<sup>[11]</sup>。Garnier等<sup>[12]</sup>进一步对比外源性细胞分裂素和内源性细胞分裂素对愈伤组织中生物碱含量的变化,最后发现外源性细胞分裂素可以提高正常愈伤组织中阿玛碱和蛇根碱的含量,内源性细胞分裂素则不能产生类似的效果。

**2.1.2 诱导及诱变作用** 诱导子(elicitor)是指能够引起目标生物体发生生理变化的各种生物与非生物因子。广义的诱导子包括各种生物与非生物因子。狭义的诱导子专指生物来源的诱导子和人工合成的生物诱导子类似物。外源施加的诱导子能够通过信号分子转导途径,促进长春花生物碱合成途径中相关基因的表达,以诱导特定的次生代谢产物形成和积累<sup>[13]</sup>。

非生物诱导子常用辐射诱变、化学诱变、金属离子等筛选出有利于长春花生物碱类成分积累的变异体系。长春花种子经<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 射线不同剂量处理,得到的高秆变异植株中文多灵碱和长春质碱含量比未辐射照射组分别多出24%和26%<sup>[14]</sup>。长春花愈伤组织通过不同浓度的甲基磺酸乙酯(EMS)处理,可获得生长快且吲哚碱含量高的长春花突变细胞系<sup>[15]</sup>。李铁军等<sup>[16]</sup>以秋水仙素为诱导剂,筛选得到长春花同源四倍体,获得的四倍体的茎、叶、花、果变大,单株干重也高于二倍体。茉莉酸甲酯诱导培养的长春花悬浮细胞内外的Ca<sup>2+</sup>浓度可以明显影响阿玛碱的含量<sup>[17]</sup>。

生物诱导子来源包括真菌、细菌、病毒等。张向飞等<sup>[18]</sup>发现来源于镰刀菌 *Fusarium solani* 和黑曲霉 *Aspergillum niger* 的真菌诱导子对吲哚总碱及其中阿玛碱和长春质碱的积累均有较明显的正向调节作用。石岳香等<sup>[19]</sup>从长春花茎秆韧皮部分离出内生真菌,研究其对长春花中长春花生物碱合成的影响,发现内生真菌本身不能直接合成长春花生物碱,而可能对生物碱的合成起促进作用。茉莉酸甲酯作为一种植物胁迫信号,是诱导STR和TDC表达中的最重要的第二信使<sup>[20]</sup>。茉莉酸甲酯的添加剂量和添加时间可以明显影响长春花悬浮细胞中阿玛碱含量,最高可使含量增加300%<sup>[21]</sup>。茉莉酸甲酯还可以大大增强长春花毛状根中G10h、Tde、Str和Sgd的表达量,从而提高异胡豆苷、阿玛碱和水甘草碱的含量<sup>[22]</sup>。

**2.1.3 前体物质的添加** 前体是目的产物合成途径中的中间代谢物,通过前体饲喂可以定向地提高某些次生代谢产物的含量,并大大缩短培养周期。添加香叶醇、10-羟基香叶醇和马钱子苷其中任何一种,可以显著增加它波宁碱的积累,添加色胺和色氨酸则没有影响<sup>[23]</sup>。但并非所有前体饲喂都可增加次生代谢产物含量,在茉莉酸甲酯诱导培养的长春花毛状根中添加马钱子苷、色胺及两者组合物等前体物质,异胡豆苷、阿玛碱和水甘草碱等生物碱的含量无明显变化<sup>[24]</sup>。这可能与长春花中的次生代谢产物具体步骤及其生物合成机制不明确有关,而且生物碱合成途径的前体活性受到诸多因素影响。Lee-Parsons等<sup>[25]</sup>测定茉莉酸甲酯如何改变马钱子苷、色胺、马钱子苷和色胺的组合物,以及香叶醇等生物碱合成途径的前体活性,结果显示:在诱导和非诱导的培养过程中,添加过量的马钱子苷会使色胺受限;在诱导培养中,茉莉酸甲酯可以增加香叶醇的活性,而非诱导培养中,添加香叶醇可以增加阿玛碱的含量。

**2.1.4 pH值** pH值是酸碱度环境,它主要影响植物酶的生化反应等生理过程,同时也影响一些培养基中离子的溶解度。培养基初始 pH 在 4.5~7.5 范围内变动时,对愈伤组织生长及吲哚总碱的积累影响不大<sup>[9]</sup>。

## 2.2 物理因素

**2.2.1 光照条件** 植物利用光照进行光合作用,为植物的生长和次生代谢产物的积累提供能量。所以不同的光照条件对长春花的生长发育及其总生物碱的积累有重要影响。弱光条件明显抑制了长春花有性生殖,抑制了长春碱含量的增加,促进了长春花叶片中文多灵碱和长春质碱两种生物碱的积累<sup>[26]</sup>。周忆堂探讨不同光照条件(透光率分别为 100%、42.5%、12.5%)对长春花个体生长及生物碱合成累积等生理过程的影响,发现 42.5% 光强最有利于长春花植株生长以及生物碱积累<sup>[27]</sup>。长春花愈伤组织在黑暗和光照(12~14 h/d)下的生长曲线均呈“S”型,总碱产量变化曲线类似于生长曲线,但光照条件下的细胞生长速度较快<sup>[28]</sup>。

**2.2.2 其它因素** 长春花的生物碱类成分含量还受到植株的组织部位、愈伤组织继代周期、继代数等因素影响。Aslam 等<sup>[22]</sup>采用 HPLC 定量分析长春花愈伤组织等各种离体组织中长春新碱,结果显示长春新碱的含量取决于特定的组织和生长周期:长春新碱含量在 20~25 周有所提高,而且在叶片诱导的愈伤组织和萌发胚较高。

## 3 长春花悬浮细胞培养的应用

利用细胞培养法获得长春花中生物碱类成分的一般步骤为:诱导愈伤组织→愈伤组织继代培养→细胞悬浮培养→扩大细胞培养,因此长春花细胞悬浮培养是长春花细胞工业化、产业化的必经步骤。与固体培养基相比,细胞悬浮培养具有繁殖速度快、能大规模培养和提供大量均匀一致的植物细胞培养物的特点,悬浮细胞培养受到许多外界条件的影响,如激素、光照、诱导子、培养基、pH 值、温度和营养等。

2,4-D、NAA 和 6-BA 3 种激素组合时,更有利于悬浮细胞的生长,且比单因子更有效;1/2 MS 和 B5 培养基有利于细胞的生长;蔗糖浓度为 30 g/L 时,细胞生长最快,低于或高于此浓度,其细胞生长速度都会下降;pH 值在 5.0~5.4 时最适于长春花悬浮细胞的生长<sup>[29]</sup>。长春花悬浮细胞在黑暗和光照(12~14 h/d)下培养的生长曲线均呈“S”型,但光照有利于细胞生长,比黑暗条件下提前了 3 d,达到了最大生长量<sup>[30]</sup>。添加不同浓度的外源脱落酸(ABA)、乙烯利和乙酰水杨酸(ASA)可明显提高长春花悬浮细胞的吲

哚总碱及其阿玛碱和长春质碱含量<sup>[31]</sup>。内生真菌和内生真菌诱导子不仅明显增加长春花悬浮细胞中生物碱合成的关键性酶 PAL(苯丙氨酸解氨酶)、TDC(色氨酸脱羧酶)活性,还明显提高了生物碱含量<sup>[32]</sup>。

## 4 影响长春花毛状根的因素

与愈伤组织和细胞悬浮培养相比,由发根农杆菌及其 Ri 质粒转化产生的毛状根具有无激素快速自主生长、遗传稳定、分化程度高、拥有亲本植株的特征和次生代谢途径等特点;更重要的是,毛状根的次生代谢物的含量不仅更高,而且还能产生某些植物愈伤组织和悬浮细胞所不能合成的有效成分<sup>[33]</sup>。毛状根生长及其次生代谢产物的形成受培养条件、外源激素、诱导子等各种理化因素的影响。刘红蕾等<sup>[34]</sup>认为长春花发根的生长与生物碱积累是两个相对独立的过程:发根本身具有合成及调节激素水平的因子,其生长基本不受外界色氨酸含量及激素水平的影响,但是适量添加色氨酸却有利于生物碱的积累;蔗糖的不同浓度、培养温度、摇床转速对生长影响较大,而对单位质量发根中生物碱的积累几乎没有影响;不同碳源对发根生长及产碱有较大影响。孙敏等<sup>[35,36]</sup>用 A<sub>4</sub> 和 R<sub>1000</sub> 2 种发根农杆菌菌株分别感染长春花的愈伤组织、真叶、叶柄及根,诱导出毛状根,并进行发根生长和产碱测定。其结果为:A<sub>4</sub> 的转化频率高于 R<sub>1000</sub>,乙酰丁香酮对转化频率有促进作用;毛状根的最佳生长条件为 1/2MS 培养基、蔗糖为碳源、水解乳蛋白为氮源;毛状根中的总生物碱含量高于长春花的原植株和愈伤组织,并且检测到长春碱和长春新碱。

## 5 基因工程技术在长春花中的应用

长春花生物碱代谢途径非常复杂,受到许多关键酶的调控,由于不表达一些合成途径的关键酶基因,使得长春花中部分生物碱不合成或者含量极低。基因工程技术可以使某些关键酶基因获得表达,从而提高生物碱含量,有助于阐释长春花生物碱生物合成机制和筛选出高产特定生物碱的长春花体系。

岳庆喜等<sup>[37]</sup>发现长春花细胞 C<sub>20</sub>hi 中合成阿玛碱的 7 个关键酶基因 asa、tdc、hmgr、g10h、scs、sss、sgd 的转录表达量明显高于母株细胞 C<sub>20</sub>D,尤其是 g10h、scs、sss 基因,C<sub>20</sub>hi 中阿玛碱的过量合成可能与 2,4-D 抑制了阿玛碱生物合成关键酶的表达水平有关。g10h 基因的表达与长春花生物碱(文多灵和长春质碱)含量呈显著的正相关,文多灵的含量和 str 基因的表达水平相关性好,g10h 和 str 基因可以作为长春花中文多灵和长春质碱含量的参考基因标

记<sup>[38]</sup>。韩梅等<sup>[39]</sup>分离和扩增得到长春花萜类吲哚生物碱合成途径中编码关键酶(DXR、SLS、G10H和STR)的cDNA基因片段,利用Gateway技术对这些目的基因进行质粒重组,并成功表达。这一结果使得短期内大规模的分离和克隆长春花中参与长春碱和长春新碱生物合成途径中的多个相关酶和基因成为可能。Ag112转录因子具有高选择性,它可以影响长春花悬浮细胞的分化方向,提高长春花悬浮细胞合成生物碱的关键酶基因编码表达,而且经过基因改造后能够表达Ag112的细胞系可以产生高含量的阿玛碱<sup>[40]</sup>。长春花中的单萜类生物碱的生物合成途径在细胞和细胞内的各种膜发生,ATP-结合盒转运蛋白与细胞中转运各种单萜类生物碱有关,因此,提高长春花细胞中ATP-结合盒转运蛋白基因CjMDR1的表达能够显著增加细胞中阿玛碱和四氢鸭脚木碱的含量<sup>[41]</sup>。

## 6 结语与展望

长春花的组织培养技术已经取得了很大的进展,长春花的初代愈伤组织的诱导相对容易,用茎、叶和芽诱导愈伤组织的诱导率相对较高,长春花悬浮培养在摇瓶中已经获得了成功,甚至采用70L环形通气搅拌生物反应器对长春花细胞的大规模悬浮培养也取得成功<sup>[42]</sup>,长春花毛状根的诱导培养也已获得成功,但仍未能进行大规模培养。目前可以用长春花愈伤组织、悬浮细胞和毛状根中生产阿玛碱、蛇根碱和长春质碱,但不能检测到长春碱和长春新碱,这可能与这些培养体系中不能或者极少合成双吲哚生物碱的重要前体文多灵有关<sup>[13]</sup>。

添加阿司匹林、布洛芬和萘普生等环加氧酶抑制剂,降低长春新碱和长春碱的旁路合成,虽然未能提高长春花悬浮细胞中长春新碱和长春碱的含量,却显著提高长春新碱和长春碱的前体——长春质碱的含量<sup>[43]</sup>,这说明不同的理化因素可以改变长春花生物碱合成途径中某些关键酶的活性或者关键酶基因的表达,进而特异性地影响长春花中某些生物碱的积累。长春花细胞中文多灵的合成在转录水平上受到抑制,即检测不到关键酶基因D4H和DAT基因的表达,但这两种基因并未丢失<sup>[44]</sup>。因此,利用不同的理化因素调控,或者通过基因工程等技术诱导长春花细胞和毛状根中D4H和DAT等关键酶基因的表达,以促进文多灵的生物合成,选育出能够合成长春新碱和长春碱的细胞和毛状根培养体系,为工业化、产业化开发长春花药用成分开辟出新的道路。

## 【参考文献】

[1] 南京中医学院. 中药大辞典[M]. 第2版. 上海:上海科学出版社,2006:628.

[2] Wang JY, Liu ZP. Alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* increases with addition of seawater salts to the nutrient solution [J]. *Pedosphere*, 2010, 20(6): 718.

[3] 伍春莲, 杨军, 陈卫英, 等. 长春花生物碱合成途径调控机制研究进展[J]. *药物生物技术*, 2010, 17(1): 91.

[4] 朱发伟, 邵宜. 生态制药与长春花产业[J]. *海峡药学*, 2009, 21(4): 82.

[5] 陈泉, 李建国. 长春花高效快繁技术研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(22): 10404.

[6] 唐忠海, 饶力群, 李兰岚. 长春花愈伤组织的诱导及限速酶活性的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18(4): 596.

[7] 严春艳, 马伟丽, 于荣敏. 长春花愈伤组织诱导及培养条件优化[J]. *中药材*, 2008, 31(7): 955.

[8] 车秀芬, 杨小波. 长春花细胞组织培养研究进展[J]. *农业生物技术*, 2006(3): 11.

[9] 张向飞, 张荣涛, 曹岚, 等. 不同因子对长春花愈伤组织中药用成分积累的影响[J]. *中国药学杂志*, 2004, 39(11): 817.

[10] 聂莉莉, 朱晔荣, 李建华, 等. 不同因子对长春花突变愈伤组织生长和吲哚总碱积累的影响[J]. *北方园艺*, 2006(5): 153.

[11] Yahia A, Kevers C, Gaspar T, et al. Cytokinins and ethylene stimulate indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* by two distinct mechanisms [J]. *Plant Science*, 1998, 133(1): 9.

[12] Garnier F, Carpin S, Label P, et al. Effect of cytokinin on alkaloid accumulation in periwinkle callus cultures transformed with a light-inducible ipt gene [J]. *Plant Science*, 1996, 120(1): 47.

[13] 贺丽虹, 赵淑娟, 胡之璧. 诱导子对长春花生物碱生物合成的诱导与调控[J]. *植物生理学通讯*, 2008, 44(2): 350.

[14] 赵剑, 李建国. <sup>60</sup>Coγ射线辐射诱变提高长春花生物碱含量[J]. *分子植物育种*, 2009, 7(3): 607.

[15] 张秀芬, 张荣涛, 曹岚, 等. EMS诱变的长春花细胞系突变研究[J]. *中草药*, 2004, 35(11): 1293.

[16] 李铁军, 石俊英, 王丽珍, 等. 长春花同源四倍体的诱导与鉴定[J]. *中国现代中药*, 2010, 12(2): 25.

[17] Lee-Parsons, Ertürk S. Ajmalicine production in methyl jasmonate-induced *Catharanthus roseus* cell cultures depends on Ca<sup>2+</sup> level [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 24(11): 677.

[18] 张向飞, 张荣涛, 王宁宁, 等. 真菌诱导子对长春花愈伤组织中吲哚生物碱积累的影响[J]. *中草药*, 2004, 35(2): 201.

[19] 石岳香, 周敏, 唐忠海, 等. 长春花内生真菌的分离及鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(29): 12712.

[20] Menke FL, Champion A, Kijne JW, et al. A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2 [J]. *EMBO Journal*, 1999, 18(16): 4455.

[21] Lee-Parsons CW, Ertürk S, Tengtrakool J. Enhancement of ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures with methyl jasmonate is dependent on timing and dosage of elicitation [J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(20): 1595.

[22] Aslam J, Mujib A, Nasim SA, et al. Screening of vincristine yield in ex vitro and in vitro somatic embryos derived plantlets of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don [J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, 119(3): 325.

表1 药学与药物制剂专业实验教学改革前后变动情况的比较

实验类别	改革前		各占百分率(%)	改革后		各占百分率(%)
	实验项目数	学时数		实验项目数	学时数	
药学专业实验	84	348		34	370	
基础性	71	256	73.5	22	150	40.5
综合设计性	13	92	26.5	12	220	59.5
制剂专业实验	84	348		33	440	
基础性	71	256	73.5	17	160	36.4
综合设计性	13	92	26.5	16	280	63.6

药学专业和药物制剂专业的药学基础实验于2009年秋季学期在09级药学和药物制剂本科班开始投入使用,药学综合性与设计性实验于2011年9月在09级药学和药物制剂本科班开始投入使用。新的实验教材将在实验教学使用过程不断完善,最后完善好的教材将联系出版社进行公开出版。

## 【参考文献】

- [1] 廖昌军,臧志和. 药学实验教学示范中心建设的探索[J]. 药学实践杂志, 2010, 28(1):65.

[收稿日期]2011-10-17

[修回日期]2011-12-30

(上接第261页)

- [23] Morgan JA, Shanks JV. Determination of metabolic rate-limitations by precursorfeeding in *Catharanthus roseus* hairy root cultures[J]. *Biotechnology*, 2000, 79(2):137.
- [24] Goklany S, Loring RH, Lee-Parsons CW, et al. Assessing the limitations to terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures through gene expression profiling and precursor feeding[J]. *Biotechnol Progress*, 2009, 25(5):1289.
- [25] Lee-Parsons, Royce AJ. Precursor limitations in methyl jasmonate-induced *Catharanthus roseus* cell cultures[J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(6):607.
- [26] 唐中华,郭晓瑞,于景华,等. 弱光对长春花 *Catharanthus roseus* 幼苗中可溶性糖、生物碱及激素含量的影响[J]. *生态学学报*, 2007, 27(11):4419.
- [27] 周忆堂. 不同光强对长春花 *Catharanthus roseus* 光合作用及次生代谢的影响研究[D]. 重庆:西南大学, 2008.
- [28] 郭胜娟,刘树楠,冯玲玲,等. 黑暗和光照对长春花培养细胞生长和生理生化特性的影响[J]. *武汉植物学研究*, 2004, 22(2):136.
- [29] 高艳娇,宋洪涛,黄玲. 不同理化因子组合对长春花悬浮培养的研究[J]. *中国水运*, 2010, 6(10):255.
- [30] 刘树楠,孙虎,姚红军,等. 光照对长春花悬浮细胞的生长和生理效应[J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2007, 41(4):583.
- [31] 张向飞,张秀省,王勇,等. 植物生长调节物质对长春花细胞中吲哚生物碱积累的影响[J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(3):303.
- [32] 石岳香,周敏,杨华,等. 内生真菌和诱导子对长春花悬浮细胞及生物碱合成的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 19(5):886.
- [33] 孟凡娟,王秋玉,谢立波,等. 利用发根农杆菌诱导毛状根的研究进展[J]. *北方园艺*, 2008, 12:81.
- [34] 刘红蕾,张玉臻,陶文沂. 营养及环境因子对农杆菌诱导的长春花发根生长和生物碱生成的影响[J]. *药物生物技术*, 2003, 10(3):155.
- [35] 孙敏,汪洪,王颖,等. 长春花转化毛状根诱导及培养条件的优化[J]. *西南师范大学学报:自然科学版*, 2002, 27(4):549.
- [36] 孙敏,曾建军. 长春花毛状根培养及抗癌生物碱产生的研究[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(10):741.
- [37] 岳庆喜,祝冬青,赵望,等. 长春花激素自养型细胞株 C<sub>20</sub>hi 中阿玛碱过量合成分子机制研究[J]. *药物生物技术*, 2008, 15(3):157.
- [38] 陈雨,孙小芬,赵静雅,等. 长春花萜类吲哚生物碱含量测定及相关基因的表达分析[J]. *天然产物研究与开发*, 2010, 22:93.
- [39] 韩梅,赵博,安志刚,等. 长春花萜类吲哚生物碱生物合成途径中重要酶(DXR、SLS、G10H、STR)基因的克隆与表达[J]. *植物研究*, 2007, 27(5):564.
- [40] Montiel G, Breton C, Thiersault M, et al. Transcription factor agamous-like 12 from arabidopsis promotes tissue-like organization and alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* suspension cells[J]. *Metabolic Engineering*, 2007, 9(2):125.
- [41] Pomahacova B, Dusek J, Duskova J, et al. Improved accumulation of ajmalicine and tetrahydroalstonine in *Catharanthus* cells expressing an ABC transporter[J]. *Plant Physiology*, 2009, 166(13):1405.
- [42] 曹阳,侯军,郑珍贵,等. 长春花细胞大型生物反应器培养的初步研究[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2002, 30(2):87.
- [43] Guo ZG, Lin Y, Xing XH. Enhanced catharanthine biosynthesis through regulation of cyclooxygenase in the cell suspension culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(3):783.
- [44] Vazquez-Flota F, De Luca V, Carrillo-Pech M. Vindoline biosynthesis is transcriptionally blocked in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures[J]. *Mol Biotechnol*, 2002, 22(1):1.

[收稿日期]2011-11-02

[修回日期]2011-12-28