

文章编号:1001-9383(2006)02-0079-05

西洋参细胞培养的研究进展*

张小兵, 闫静辉*, 李亚璞, 李春生, 吴萌, 陈英珠, 程华, 陈瑞琴

(河北省生物研究所, 河北石家庄 050081)

摘要:利用西洋参悬浮细胞培养技术生产人参皂甙,在理论和生产上,都具有重要意义。概述了国内外在西洋参愈伤组织培养、细胞悬浮培养和发酵培养方面的研究进展情况。

关键词:西洋参;愈伤组织培养;细胞悬浮培养;发酵培养

中图分类号:Q813.1 **文献标识码:**A

Progress on cell culture of *Panax quinquefolium*

ZHANG Xiao-bing, YAN Jing-hui, WU Meng, LI Ya-pu,

LI Chun-sheng, CHEN Ying-zhu, CHENG Hua, CHEN Rui-qin

(Hebei Institute of Biology, Shijiazhuang Hebei 050081, China)

Abstract: In terms of theory and practice, the research on cell culture of *Panax quinquefolium* and how to gain more ginsenoside is very significant. The progress epitomizes the process on callus culture, suspension culture and ferment of *Panax quinquefolium*'s cell.

Keywords: *Panax quinquefolium*; Callus culture; Suspension culture; Ferment

西洋参(*Panax quinquefolium*)与人参(*P. gieng*)是同属五加科(Araliaceae),为多年生草本名贵药材。西洋参具有滋补、强心、造血、健胃、镇静、降血脂、抗癌和抗衰老等多种医疗作用。与人参相比,其性较温和。现代化学及药理学研究表明:西洋参主要有效成分是人参皂甙(Saponin),目前尚不能人工合成^[1]。

西洋参原产于北美洲(主要是加拿大和美国),后经引种进入我国^[2],最适生长于海拔1000m左右的山地阔叶林地带。喜阴,宜斜射光和散射光,忌强光;怕高温,生长期最适宜温度18℃~24℃;要求栽培土层深厚,土质为疏松、肥沃、腐殖质含量丰富、透水性强的偏酸性的壤土或沙质壤土。无论野生或是栽培的西洋参,由于其自身的生理特性,生长缓慢,一般需四至六年才能收获入药。且西洋参的种子资源稀少,价格昂贵,国际市场每公斤种子价格约为1000美元^[3]。因此,开展西洋参细胞培养技术研究,利用西洋参细胞悬浮培养的方法生产人参皂甙,具有十分巨大的意义^[4]。

人们已成功的利用植物细胞工程技术对几种植物进

行了有用次生代谢物的工业化生产。1959年,Tulecke和Nickell在20L的玻璃瓶中建立了第一个植物细胞大量培养系统,并放大到30L和134L不锈钢发酵罐。1983年,日本三井石油化学公司利用紫草细胞培养,成功地进行了紫草宁的工业化生产^[5]。在西洋参细胞培养的研究中,如何提高培养物中的主要有效药用成分皂甙的含量和质量,扩大培养规模,最终实现工业化生产,是这一领域的研究重点。国内外研究者在西洋参愈伤组织培养、细胞悬浮培养、发酵培养等方面做了大量工作。

1 西洋参愈伤组织的诱导和培养

1.1 外植体

用于诱导西洋参愈伤组织的外植体,有不同参龄的根、根髓、茎段、叶片、叶柄、花药、花蕾、胚及胚培养幼苗的子叶和胚轴等^[6]。不同时期取材的不同外植体,其诱导率是不同的,并且差别非常大,诱导率最高可达100%^[7]。一般7~10天左右,接种在诱导培养基上的外植体上可出现白色或淡黄色絮状的愈伤组织。愈伤组织分为紧密型

收稿日期:2005-10-25

基金项目:河北省科技攻关招标项目(02245512D)

作者简介:张小兵(1973-),男,河北景县人,工程师,主要从事生物技术的应用研究。

通信作者:闫静辉

和疏松型两种,结构紧密的为胚状体^[3],生长缓慢;质地疏松、淡黄色或嫩白色的愈伤组织,生长旺盛,可用于悬浮培养。30天左右,能够脱分化的外植体都可以诱导出愈伤组织。西洋参芽胞的脱分化先从表面发生,以后逐渐向内生长^[8];我们以西洋参参根为外植体的实验表明:外植体的脱分化是发生在导管和筛管部位,由内部向外隆起,膨大,最后胀破外皮露出愈伤组织。

1.2 培养基

可用于西洋参愈伤组织诱导和继代培养的基本培养基有 MS、6.7-V、Fox、B5 和 Blaydes 等^[6]。其中,MS 基本培养基效果最好,外植体脱分化出现时间最早(7天),诱导率最高(100%)^[7]。范代娣等报道,将 MS 基本培养基中的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的含量降低到 92.5mg/L,可使嫩茎愈伤组织诱导率和愈伤组织的生长速度有大幅度的提高^[9]。在西洋参愈伤组织的生长过程中,水解乳蛋白必不可少,在不添加水解乳蛋白的培养基上愈伤组织一个月后会褐变死亡^[10]。培养基中添加参叶提取物可起到与水解乳蛋白相同的效果。

1.3 植物激素的种类和浓度

植物生长素对西洋参愈伤组织的诱导和培养是必不可少。西洋参外植体脱分化所需的外源生长调节因子类型为生长素和细胞分裂素型,其中生长素起主导作用。NAA(α -萘乙酸)、IBA(3-吲哚丁酸)、IAA(3-吲哚乙酸)和 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)单独使用均可诱导外植体产生愈伤组织^[7,11-14],但 IBA、NAA 和 IAA 单独使用时,诱导率都不高,而且脱分化时间较迟。2,4-D 的效果最好,浓度为 2-3mg/L 时,诱导率可达 95.58%-100%。细胞分裂素(BA、KT)在有 2,4-D 存在的情况下,对外植体的脱分化有促进作用,其中 BA(苄氨基嘌呤)的最适浓度为 0.5mg/L,KT(6-糠氨基嘌呤)的最适的浓度为 0.3mg/L。

在继代培养基上,对西洋参愈伤组织增长起主导作用的是 2,4-D^[10],其浓度在 0.5-1.0mg/L 时效果最显著。2,4-D 浓度在 0.5mg/L 以下时对愈伤组织的生长无效,不加 2,4-D 的愈伤组织 10 天左右褐变死亡。我们的试验表明,若将 2,4-D 替换成 NAA,培养 2-3 代后,愈伤组织也会褐变;另外,若将继代培养基中的 2,4-D 浓度仍维持在 2-3mg/L 时,愈伤组织的增殖速度会逐渐降低,继代 2-3 次后大部分愈伤组织同样会褐化。在有适宜浓度的 2,4-D 存在时,IBA 对愈伤组织的生长有促进作用,6-BA(6-苄氨基嘌呤)对愈伤组织的生长起协调作用^[8]。

1.4 培养条件

西洋参外植体脱分化的温度范围较宽,在 20℃-27℃ 范围内,脱分化率都达到 80% 以上,其中最适温度为 (23±1)℃,此时愈伤组织均为淡黄色,质地松软^[7]。低温对愈伤组织的生长不利,4℃ 处理 15 天的西洋参愈伤组织可以正常生长,但存放 25 天以后的愈伤组织却全部褐

变^[10]。

暗培养利于外植体的脱分化和生长^[7]。当光强在 1000Lx 时诱导率很低,只有 20%。在弱光下,愈伤组织呈淡黄色或嫩白色,生长旺盛。

培养基的初始 pH 值灭菌前在 6.0-6.5 之间有利于西洋参芽胞外植体脱分化,高于 6.5 或低于 5.5 都不利脱分化^[7]。

脱分化过程是一个外植体、基本培养基、生长调节物质和外界环境条件等诸因素之间相互作用的复杂过程,但诸因素的互作机制还不清楚^[7]。

1.5 皂甙含量

西洋参愈伤组织固体培养经过 10 天左右的延迟期,然后进入生长期,35 天进入减慢期,40 天开始进入静止期^[22]。西洋参愈伤组织中含有各种主要皂甙成分(如 Rb1、Rg 等)及少量抗癌皂甙成分 Rh1^[15],总皂甙含量可达 6%^[15]。

西洋参愈伤组织具有合成皂甙的能力。因此,用愈伤组织细胞培养生产皂甙在理论上是可行的;但是愈伤组织固体培养增殖慢,不适合进行大规模生产的要求。

2 西洋参细胞悬浮培养

西洋参细胞悬浮培养比固体愈伤组织生长速度提高近 80%,但皂甙含量却略有下降^[15]。因此,诱导和筛选适合液体培养并且人参皂甙高产、稳产的西洋参细胞株,以及优化对西洋参细胞悬浮生长和皂甙生产起关键性作用的各种条件成了此阶段工作的重点。

2.1 西洋参悬浮培养细胞无性系的诱导与筛选

如何提高西洋参细胞本身的人参皂甙的生产能力,是西洋参细胞培养生产皂甙的关键性问题。应用⁶⁰Co γ 辐照处理已在不少培养细胞中获得所需性状的突变体,成为植物细胞工程中高产细胞系筛选的重要手段。张美萍等将愈伤组织继代培养 10 天,再用⁶⁰Co γ 辐照,处理后在含前体醋酸镁的培养基上,继代 5 次。HPLC 检测发现用 4000Gy 剂量处理过的西洋参细胞总皂甙含量达 10.40%,皂甙产率达 10.386g/L,皂甙含量比对照高 1 倍,皂甙产量比对照提高近 4 倍,但所获得这个无性系生长缓慢^[20]。

人参皂甙的检测方法主要是比色法和 HPLC 法,也可以利用香草醛-浓硫酸对细胞培养物染色,根据颜色深浅初步判定皂甙含量的多少^[16]。

2.2 西洋参细胞悬浮培养生长周期

西洋参细胞悬浮培养生长曲线也基本符合“S”型,经过 5 天左右的延滞期后,大约 10-15 天进入对数生长期,25 天时细胞干重接近最大值,并且皂甙产率明显增加,30 天时皂甙产率接近最大值^[16,19,20]。在延滞期细胞大小较均匀一致,皂甙含量低;生长期细胞出现液泡化,大小不同;静止期细胞形状各异,出现大量的导管,并且皂甙含量较高。皂甙的合成高

峰期在细胞生长高峰期之后,并且西洋参皂甙合成与细胞分化呈正相关^[16]。

在整个培养过程中,可溶性蛋白质的含量的高峰期和呼吸速率的高峰期分别比细胞生长高峰期早 10~15 天和 5~10 天,培养液内的过氧化物酶的活性变化与细胞生长成同步平行关系,而培养液内的含糖量及电导率与西洋参悬浮细胞生长呈镜像关系^[18]。糖利用率(URS)可达到 81.79%^[19],大量元素和微量元素的消耗率最大能达到 50% 左右^[22]。培养液的 pH 值在培养过程中会缓慢降低^[19,21,23]。

2.3 影响西洋参细胞悬浮培养生长和人参皂甙生产的培养条件

2.3.1 化学方面的条件

(1)基本基质 在 MS、6.7-V 和 Fox 等三种培养基上,西洋参培养物的收获量不论鲜重还是干重,差异均不明显,但培养物的皂甙含量和产量,却以 MS 基质上的最高^[24]。

(2)无机盐 西洋参悬浮培养细胞对于硝态氮和氨态氮的选择性不强,而对氮源浓度变化比较敏感。使用 KNO_3 或 NH_4NO_3 对于培养细胞生长的影响无明显差异。氮量不足或过多都使培养细胞的生长量降低。实验表明,无论对西洋参细胞悬浮培养细胞的生长,还是对其人参皂甙的含量而言,MS 培养基中的氮量偏多,需加以调节^[25]。降低培养基中的氮源浓度,改变培养基中的硝态氮和氨态氮的比例,可以提高细胞的生长量和人参皂甙的产量^[19,24,25]。 NH_4^+ 比 NO_3^- 有利于培养细胞中人参皂甙含量的提高^[25],而仅加入 NO_3^- 却更有利于培养细胞的生长^[19]。

适当降低 MS 培养基中 MgSO_4 和 CaCl_2 的浓度,可以提高培养物的产量; MgSO_4 同时也可以提高培养物中皂甙的积累,但 CaCl_2 却不利于皂甙积累^[9,24]。

(3)碳源 培养基中糖是碳源的主要来源,是构成培养基的一个重要组分。因此,调节培养基中糖的种类、浓度和作用方式,从而调节碳源,对西洋参悬浮培养细胞的生长及其人参皂甙含量的提高很有必要。蔗糖和葡萄糖比较,综合生长和人参皂甙含量来看,蔗糖更有利于皂甙产率的提高。在蔗糖的加入方式中,培养一开始加入总量的一半(即 1.5%),培养两周后,再加入另一半,可使培养细胞的生长率提高到 120.9mg DW/L·Day,皂甙产率可达到 100.7mg/L^[25]。

(4)添加剂 在一定浓度的范围内,椰乳(CM)和水解乳蛋白(LH)均能促进西洋参悬浮培养细胞的生长^[25]。红花、丹参、人参和西洋参的四种愈伤组织的条件培养液均不利于西洋参悬浮培养细胞的生长,却可以促进皂甙的合成^[26]。烟酸是 NADPH(辅酶 II)的组成成分,对皂甙的合成代谢有促进作用,将 MS 基本基质的烟酸浓度增加一倍,培养物的干鲜重的增加量、皂甙含量和皂甙产量都

有增加;ATP 是生物细胞中所有能量的储运者,一定浓度的 ATP 不仅促进细胞生长,还促进皂甙合成^[20]。

(5)生长调节物质 植物生长素和细胞分裂素两大类植物激素,对西洋参悬浮培养细胞生长和皂甙积累有直接的影响。其中,生长素 2,4-D 和细胞分裂素 BA 浓度为 0.5mg/L 时对培养细胞生长最为有利,IBA 浓度为 3.5 mg/L 时培养细胞中人参皂甙的含量最高^[25]。

(6)前体 对于代谢途径已经清楚的次生代谢物,在培养基中补加适当的前体物质、中间代谢物或旁路抑制剂,可以有效的提高目的次生代谢物的产量。但是,补加直接前体对终产物的增加并不一定起作用,所以寻找最有效的前体和前体的加入方式是问题的关键所在。目前,西洋参皂甙合成途径并不清楚。张美萍实验了四种间接前体:醋酸镁、L-亮氨酸、甲羟戊酸和辅酶 A。醋酸镁一开始培养就加入,能使培养物的鲜重、干重和皂甙含量有明显提高;甲羟戊酸对培养物有毒害作用,但有利于西洋参皂甙的合成。据实验结果推测西洋参的皂甙合成途径可能与人参的皂甙合成途径一样:醋酸→甲羟戊酸→三十六碳六烯→人参皂甙^[20]。

方绮民在西洋参细胞悬浮培养时添加乙酸钠、牦牛儿醇和角鲨烯,发现乙酸钠对西洋参细胞生长有促进作用,角鲨烯对提高皂甙含量最为有效^[26]。

(7)诱导子 植物体中甾族类皂甙能抑制多种致病真菌的生长,被称为“植物抗毒素”。植物甾族类皂甙作为对病原性真菌感染的反应,在植物中积累。病原性真菌作为一种诱导子能促进甾族类皂甙的合成。西洋参中的皂甙属于甾族类皂甙。并且诱导子能使与细胞生长相关的酶活化,其中包括参与木质素代谢的 POD 酶,细胞内和培养液中 POD 活性明显升高,导致此阶段细胞干重积累量增加^[21]。

方绮民实验了尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)、大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)、密环真菌(*Armillaria mellea*)、葡枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)、根霉(*Rhizopus sp.*)、文氏曲霉(*Aspergillus sp.*)和烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)等真菌。发现除根霉外,其余均不利于细胞的生长;除烟曲霉菌丝体外,其余六种能不同程度地诱导西洋参细胞的皂甙合成;其中,葡枝根霉不但能不减慢细胞地生长,而且还能使皂甙含量提高二倍,因此它诱导地细胞皂甙产率最高^[26]。刘长军在西洋参细胞培养物中加入刺盘孢菌(*Colletotrichum nicotianae*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、黑曲霉(*Aspergillus nigran*)和米曲霉(*Aspergillus oryzae*)等,发现刺盘孢菌丝体对皂甙合成的生理效应活性最高,能使细胞总皂甙含量达到干重的 16.3%,比对照提高约 1.3 倍;并且还发现黑曲霉诱导子能促进多糖的大量积累^[21]。

人参寡糖素和黑节草寡糖素作为诱导子具有提高西

洋参悬浮培养细胞中皂甙含量和促进细胞生长的双重作用,并能影响 Rb 组和 Rg 组皂甙的比例^[19,26]。

悬浮培养的植物细胞能常规性的向培养液中释放部分代谢产物,细胞在诱导子处理后能增加向培养液中排放次生代谢物的量。西洋参细胞培养物在刺盘孢菌丝体诱导子的刺激下能将总皂甙的 85% 外排到培养液中^[21]。

2.3.2 生物方面的条件

影响植物细胞生长及代谢物质生成的生物方面的因素主要是细胞龄和接种量等。

(1)细胞龄 在培养过程的不同时期,西洋参悬浮细胞的生理状况、生长及人参皂甙生产能力差异十分显著,而且使用不同细胞龄的“种”细胞,其后代的生长和次生代谢物质生产状况也会大不一样。通常,使用处于对数生长后期或静止期前期的细胞作为接种细胞较合适^[28]。在西洋参细胞悬浮培养中,以培养 20-25 天左右的愈伤组织悬浮细胞为继代培养的“种子”最合适^[18,19]。此时,正处于细胞生长的对数期和快速生长期,细胞分裂旺盛,最适合合作继代培养。

(2)接种量 在植物细胞培养中,接种量也是一个影响因素。在再次培养中,往往取前次培养液的 5%-20% 作为种子;也可以以接种细胞的湿重为基准,其接种浓度为 15-50g(湿细胞)/L^[28]。原晓勇认为以 0.25-0.35g(干重)/L 培养液的接种量较好^[29]。张美萍认为在装液 20ml 的 100ml 三角瓶中,接种量为 0.8g 湿细胞较好^[23]。

2.3.3 物理方面的条件

(1)温度 培养温度对植物细胞生长及次生代谢物生成有主要影响。但西洋参悬浮培养方面没有最佳培养温度的报道,一般是采用愈伤组织培养时的温度,所报道的培养温度一般在 22-28℃^[15,16,19-21,23-27,29]。

(2)培养方式和转速 原晓勇^[29]对往复式摇床、旋转式摇床和慢速转床进行了实验,结果表明以旋转式摇床为最好。西洋参细胞悬浮培养,往复式摇床转速一般是 120rpm 较好。细胞因碰撞而造成的损伤较小,同时又能达到较适宜的 $K_L a$ 值、 D_o 值和分散度。

(3)装液量 植物细胞的呼吸速率一般为 0.5×10^{-7} mol O_2 /atm·ml·min^[30]。周立刚在西洋参细胞大量培养的工艺学研究中确定 500ml 的三角瓶装 100~200ml 的培养液较适合于植物细胞悬浮培养,即培养液体积为三角瓶总容量的 1/5 至 2/5。并且确定在测定 D_o 值时,一定要使温度恒定在某一数值,这样读数才会有意义^[27]。

(4)pH 值 在培养过程中,通常 pH 作为一个重要的参数被控制在一定范围内。植物细胞培养的适宜 pH 值一般为 5~6^[28]。培养液的 pH 值在高压灭菌后,往往会略有下降。张美萍的实验表明:在灭菌前,培养液 pH 值为 6.0 时,鲜重、干重增加最多,pH 值 6.5 时,皂甙含量最高^[23]。在培养过程中,培养液 pH 值会缓慢下降^[19,23],至

后期又会出现回升趋势^[21]。

(5)光 众所周知,植物对光特别敏感,光对植物有着特殊的作用。光照射条件不仅通过光周期、光的质量(即种类、波长)而且通过光照量(光强度)的调节来影响植物细胞的生理特性和培养特性。研究表明,光调节着细胞中的关键酶的活性,有时光能大大促进代谢产物的生成,有时却起阻害作用。而且,光还能改变多个次生代谢产物含量的比例,以及改变细胞代谢产物分泌的作用^[28]。在西洋参悬浮细胞培养中,一般皆采用暗培养。

3 西洋参细胞发酵培养

西洋参细胞发酵培养的研究还处于初级阶段。在进行植物细胞培养生物反应器的选型研究中,发现内循环气升式反应器对细胞生长及产物生成均优于通气搅拌反应器^[31]。但现在报道的西洋参细胞发酵培养的研究,大都是在搅拌式发酵罐中进行的。在搅拌式发酵罐中,西洋参细胞发酵培养的最佳搅拌速度是 60rpm^[27]。发酵培养的时间进程和悬浮培养的时间进程是很相似的^[19],培养细胞的生长随培养时间的延长而增加,一般 15-18 天放罐^[19,29],蔗糖利用率能达 79.93%^[19],pH 值在培养过程中也是缓慢下降^[19,29]。 D_o 值开始呈上升趋势,培养 7 天左右时 D_o 值达到最大值,第 10 天 D_o 值会突然下降^[29]。

细胞生长和次级代谢物皂甙的积累要求有一个稳定而又适宜的 pH 值和渗透压环境。pH 值稳定在 5.8 ± 0.2 时,西洋参细胞的生长速度和皂甙含量能比对照提高 1 倍左右^[19];加入甘露糖醇以改变培养液的渗透压,虽然人参皂甙的含量是对照 3 倍,但却严重抑制细胞的生长,致使生长速率为负^[27]。

4 展望

西洋参组织和细胞培养工作在细胞大量培养生产西洋参皂甙方面已经取得了较大进展,但目前,商业化生产仍有一定的困难。问题主要有高产细胞系筛选方面的工作很少,快捷、高效、简便的筛选优良细胞系的方法没有突破。同时,西洋参悬浮细胞系的保存也是一个必须解决的课题。

现在,分子生物学技术日新月异。石俊英等^[32]采用体细胞融合技术获得了 10 个西洋参和胡萝卜杂交愈伤组织,其中有 6 个杂交体愈伤组织人参皂甙 Rb1 含量比未融合前西洋参愈伤组织中的含量高,于荣敏等^[33]用根癌农杆菌 C_{58} 菌株感染诱导西洋参茎获得了冠瘿组织,王冲子等^[34]用发根农杆菌 15834 菌株感染西洋参无菌苗切段建立了发状根培养系统。因此有理由相信,利用西洋参细胞发酵技术工业化生产皂甙并不是一个遥远的目标。

参考文献:

[1] 杨崇仁,等.人参属植物的化学分类和资源利用[J].云南植

- 物研究,1988(增刊):47.
- [2] 吴广宜,王春荣,卫永第,等.西洋参皂甙的高效液相色谱分析[J].白求恩医科大学学报,1989,13(3):248-250.
- [3] 阳建国.西洋参的组织培养及其应用前景[J].湖南农业科学,1999(1):31-32.
- [4] 郑光植.植物次级代谢物细胞工程与资源开发利用[J].云南植物研究,1981(增刊1):125.
- [5] Fujita Y, et al. Secondary metabolites from plant cell-pharmaceutical applications and progress in commercial production. In: Plant Tissue and Cell Culture [C]. Alan R. Liss, 1987: 169.
- [6] 刘本叶,等.西洋参组织和细胞培养研究进展[J].中草药,1995,26(11):611-613.
- [7] 张美萍,等.西洋参脱分化基质优化及影响因素[J].吉林农业大学学报,2003,25(4):378-381.
- [8] 张美萍,等.西洋参愈伤组织培养及皂甙含量分析[J].吉林农业大学学报,1999,21(1):46-48.
- [9] 范代娣,等.西洋参组织培养及 MgSO₄ 含量对培养结果的影响[J].生物技术,1994,4(33):23-25.
- [10] 张磊,等.植物激素对西洋参愈伤组织生长和分化的影响[J].特产研究,1994,(4):27-29.
- [11] 孙国栋,张琪.西洋参试管苗的诱导[J].植物学通报,1983,1(1):43-44.
- [12] 桂耀林,郭仲葵,徐廷玉,等.西洋参组织培养中的胚胎发生[J].植物学报,1987,29(2):223-224.
- [13] Wang. AS. Callus induction and plant regeneration of American ginseng[J]. HortScience,1990,25(5):571-572.
- [14] 郭生桢,李惠芝,潘景丽.西洋参组织的诱导[J].中药科技,1979,(3):5-6.
- [15] 郑光植,等.三七、人参和西洋参细胞悬浮培养的比较研究[J].云南植物研究,1989,11(1):97-102.
- [16] 张美萍,等.西洋参愈伤组织悬浮培养物细胞分化与皂甙合成关系的研究[J].核农学报,2004,18(2):152-154.
- [17] Tabata M. Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application. Ed Wbarz et al Berlin Springer 1977.
- [18] 徐卫辉,等.西洋参悬浮培养过程中的生理生化特性研究[J].湖南师范大学自然科学学报,1993,16(4):350-354.
- [19] 周立刚,等.西洋参细胞大量培养的研究[J].生物工程学报,1990,6(4):316-321.
- [20] 张美萍,等.辐照西洋参培养物皂甙次生代谢调控的研究[J].核农学报,2003,17(3):207-211.
- [21] 刘长军,等.真菌诱导子对悬浮培养西洋参细胞的生理效应[J].武汉植物学研究,1996,14(3):240-246.
- [22] 张美萍,王义,孙春玉,等.西洋参愈伤组织悬浮培养基中蔗糖和无机元素的消耗状况[J].植物资源与环境学报,2003,12(3):60-61.
- [23] 张美萍,等.基质 pH 值和接种量对西洋参愈伤组织悬浮培养物的影响[J].中药材,2003,26(10):701-702.
- [24] 张美萍,王义,李春玉,等.不同培养基及其元素组成对西洋参愈伤组织悬浮培养物生长和皂甙含量的影响[J].植物资源与环境学报,2003,12(2):14-16.
- [25] 方绮民,等.西洋参细胞悬浮培养中的化学调节[J].云南师范大学学报,1992,12(1):79-85.
- [26] 方绮民,等.西洋参细胞悬浮培养中皂甙生物合成的代谢调节[J].生物工程学报,1992,8(3):261-265.
- [27] 周立刚,郑光植.西洋参细胞大量培养的工艺学研究[J].生物工程学报,1991,7(3):230-234.
- [28] 梁世中,钟建江,吉田敏臣,等.植物细胞培养生产有用物质的技术(I)[J].工业微生物,1991,21(3):27-31.
- [29] 原晓勇,等.西洋参悬浮细胞培养条件的研究[J].西北大学学报(自然科学版),1994,24(1):51-55.
- [30] Scragg, A. H. and fowler, M. W. : In "Cell Culture and Somatic Cell", Genetics of Plants, Vol. 2, Cell growth, Nutrition, Cytodifferentiation and Cryopreservation" (Vasil, I. K. ed.) [C]. Academic Press, Inc. (London) Ltd. ,1988,103-128.
- [31] 钟建江,梁世中,吉田敏臣,等.植物细胞培养生产有用物质的技术(II)[J].工业微生物,1991,21(6):29-32.
- [32] 石俊英,牟彩萍,向凤宁,等.西洋参和胡萝卜体细胞融合培养杂种鉴定及愈伤组织中人参皂甙 Rb1 含量分析[J].山东中医药大学学报,2003,27(6):448-451.
- [33] 于荣敏,宋永波,张辉,等.西洋参冠瘿组织培养及其人参皂甙 Re 和人参皂甙 Rg1 的产生[J].生物工程学报,2003,19(3):372-375.
- [34] 王冲子,丁家宜,等. Ri 质粒转化西洋参的研究 I 西洋参毛状根培养系统的建立及鉴定[J].药物生物技术,1999,6(2):80-84.