

水杨酸刺激下半夏试管块茎悬浮培养及其生物碱的含量

陶兴魁^{1,2}, 黄铭美¹, 薛建平^{1*}, 张爱民¹, 张兴桃², 王海潮²

(1. 淮北师范大学 生命科学学院, 资源植物生物学安徽省重点实验室, 安徽 淮北 235000;
2. 宿州学院 生物与食品工程学院, 宿州 234000)

[摘要] 目的:研究水杨酸刺激下半夏试管块茎悬浮培养及其体内生物碱含量的变化。方法:以半夏悬浮试管小块茎为材料,对其处理不同浓度的外源水杨酸刺激,分析块茎的生长情况,利用高效液相色谱法(HPLC)测定块茎中生物碱的含量。检测采用 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(4:96),柱温 35 °C,肌苷检测波长 250 nm,鸟苷检测波长 260 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。结果:外源添加不同浓度的水杨酸,处理不同的时间,半夏块茎的鲜重在第 25 天,水杨酸 150 μmol·L⁻¹时达到最大 7.483 8 g。同时积累了一定量的生物碱,鸟苷在 0.03 ~ 0.45 μg(R² = 0.999 6)线性关系良好,当水杨酸浓度为 50 μmol·L⁻¹时,培养 10 d,半夏块茎中鸟苷的质量分数达到最大值 1.353 3 mg·g⁻¹;肌苷在 0.003 ~ 0.045 μg(R² = 0.999 5)线性关系良好,在水杨酸浓度为 200 μmol·L⁻¹时,培养 30 d,半夏块茎中肌苷的质量分数达到最大值 0.149 8 mg·g⁻¹。结论:该研究结果为半夏试管块茎的组培快繁和生物碱的调控研究提供参考,对半夏产业的发展具有十分重要的意义。

[关键词] 半夏; 试管块茎; 外源性刺激; 水杨酸; 生物碱

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)18-0139-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191814

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190701.1719.008.html>

[网络出版时间] 2019-07-02 10:59

Suspension Culture and Alkaloid Content of Pinelliae Rhizoma Tuber Under Stimulation of Salicylic Acid

TAO Xing-kui^{1,2}, HUANG Ming-mei¹, XUE Jian-ping^{1*}, ZHANG Ai-min¹,
ZHANG Xing-tao², WANG Hai-chao²

(1. School of Life Science, Huaibei Normal University, Anhui Key Laboratory of Plant Resources and Biology, Huaibei 235000, China;

2. School of Biological and Food Engineering, Suzhou University, Suzhou 234000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the suspension culture of tuber and its alkaloid content based on the stimulation of salicylic acid. **Method:** The tubers of Pinelliae Rhizoma in suspension tube were treated with different concentrations of exogenous salicylic acid to analyze the growth status. The content of alkaloids in tuber was detected by HPLC. Test conditions: chromatographic column for Agilent Eclipse plus C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of acetonitrile water (4:96), the column temperature was maintained at 35 °C, detection wavelength for inosine 250 nm, guanosine 260 nm, volume flow rate 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The

[收稿日期] 20190507(031)

[基金项目] 安徽省高等学校自然科学研究项目(KJ2015ZD35);安徽省教育厅卓越人才教育培养计划项目(2013zjjh039);校企合作实践教育基地项目(2017sjjd032);宿州学院重点科研项目(2016yzd04);2017年度宿州学院平台开放课题(2017ykf02)

[第一作者] 陶兴魁, 硕士, 实验师, 从事植物生物技术研究, E-mail: szxytk@163.com

[通信作者] * 薛建平, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事植物生物技术研究, Tel: 0561-3802025, E-mail: xuejp@163.com

results showed that the exogenous salicylic acid had a certain effect on the growth of suspension tuber of *Pinelliae Rhizoma*. When the salicylic acid concentration was $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the culture lasted for 25 days and the fresh weight reached the maximum value of 7.483 8 g. It also accumulates a certain amount of alkaloids. The linear range of guanosine was 0.03-0.45 μg ($R^2 = 0.999 6$). After 10-days cultivation in the salicylic acid concentration of $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, guanosine content of *Pinelliae Rhizoma* tubers reached a maximum of 1.353 3 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. The linear range of inosine 0.003-0.045 μg ($R^2 = 0.999 5$). When the salicylic acid concentration was $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, cultured for 30 days, the content of inosine in *Pinelliae Rhizoma* tubers reached the maximum value of 0.149 8 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. **Conclusion:** The results of this experiment provide a reference for the study of tissue culture and rapid propagation of *Pinelliae Rhizoma* tubers and regulation of alkaloids, which are of great significance for the development of *Pinelliae Rhizoma* industry.

[Key words] *Pinelliae Rhizoma*; tuber; exogenous stimulus; salicylic acid; alkaloid

半夏是天南星科半夏属多年生草本植物,主要分布在我国长江流域以及东北、华北等地区,以干燥块茎入药,是一种重要的中药材^[1]。半夏含有多种化学成分,具有多种药理活性,具有降逆止呕,抗肿瘤、镇咳、抗炎等药理作用^[2-3]。生物碱是半夏药材及饮片一类重要的有效成分,主要有胆碱、鸟苷、胸苷等,其中尿苷和鸟苷含量较高,鸟苷为半夏的指标性成分,肌苷为主要的鉴别性成分,尿苷或鸟苷含量高低普遍当做判别半夏药材及饮片质量优劣的重要依据^[4-5]。半夏中所含成分丰富,除了含有生物碱类、氨基酸类和甾醇类等药物成分以外,还含有大量的淀粉^[6]。目前市场对半夏的需求量很大,据统计,每年大约 500~600 万 kg,但是半夏的年产量只能满足 1/3 的需求,严重的供应不足^[7]。

高效液相色谱法(HPLC)简便、准确、快速、重复性好,已广泛运用在包括半夏在内的中药材有效成分的含量测定研究中^[8-9]。水杨酸(SA),是一种微溶于水的脂溶性有机酸,普遍存在于植物体内的一种小分子酚类物质,可以通过韧皮部运输。水杨酸在植物体内合成,具有抗病、调控植物生长代谢等功效^[10]。有学者研究水杨酸在植物非生物胁迫中的作用,指出水杨酸在植物生理中起着重要的作用,研究了水杨酸与活性氧(ROS)的关系,提出了一种非生物胁迫下水杨酸和活性氧细胞内信号转导途径^[11]。添加水杨酸处理丹参细胞,丹参细胞里酚类物质增加的同时,超氧化物歧化酶(SOD),过氧化物酶(POD)等酶的活性也相应的增强^[12]。XIAO等^[13]在对羟基苯丙酮酸双氧化酶基因进行克隆研究中,发现水杨酸能使丹参毛壮根细胞中酶的活性显著增高。张悦等^[14]在人参悬浮培养中,添加了低质量浓度的水杨酸($1 \times 10^{-3} \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)处理,结果显示皂苷的合成量显著提高。孟书亦等^[15]在黄芩愈

伤组织继代培养中添加不同浓度水杨酸,结果表明水杨酸浓度为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时过氧化氢酶(CAT)活性最大,黄芩苷含量是对照组的 1.63 倍。有关水杨酸调控植物细胞次生代谢物质方面研究很多,但在药用块茎植物有效成分的研究和调控方面研究较少^[16]。目前,半夏试管块茎快速繁殖及块茎有效成分的研究和人工调控技术发展得十分缓慢,致使半夏的培育和半夏药材的生产受到很大的制约。因此,本研究以外源水杨酸刺激为切入点,结合 HPLC 检测手段,进行水杨酸对半夏试管小块茎悬浮培养影响的研究以及水杨酸刺激下半夏试管小块茎中生物碱的含量变化的研究,为半夏试管块茎的生长和生物碱的调控研究提供参考。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦); PWN224ZH 型 1/1 万电子天平(OHAUS/奥豪斯); SHB-95B 型循环水式多用真空泵(上海满钺仪器设备有限公司); KQ-500GDV 型超声波清洗器(上海精密仪器仪表有限公司); Centrisart G-26C 型离心机,arium Pro 型超纯水器(德国赛多利斯)。

鸟苷对照品(贵州迪大科技有限责任公司,批号 GZ-DD238-201203,纯度 98%); 肌苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 140669-201302,纯度 99.1%); 乙腈购自天津市四友生物医学技术有限公司,为色谱纯; 水为超纯水,其余试剂为分析纯。半夏为天南星科半夏属多年生草本植物半夏 *Pinellia ternata* 的块茎,由淮北师范大学资源植物生物学实验室提供。

2 方法

2.1 半夏块茎水杨酸液体培养基的制备 称量水杨酸适量,配制成 $0.005 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水杨酸溶液,滤膜过滤后,置于棕色瓶中备用。配制 $\text{MS} + 30 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

蔗糖的液体培养基,分装到锥形瓶中,每瓶 50 mL, 121 °C 高压锅灭菌,在超净工作台中加入水杨酸,配制成含不同浓度水杨酸(0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的液体培养基。

2.2 半夏试管块茎的悬浮培养 配制 MS + 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖对照组液体培养基和水杨酸处理组液体培养基 MS + 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 + 水杨酸(浓度 0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),将半夏块茎 1.0 g 分别转接到对照组和处理组培养基中培养,做 3 个重复,恒温振荡培养。培养 30 d,每间隔 5 d 取样收获,记录半夏块茎质量。

2.3 半夏块茎样品溶液的制备 半夏块茎在不同浓度的水杨酸、不同天数处理条件下培养,浓度梯度设为 50, 150, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时间梯度设为 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 d, 平行取样 4 份。样品用蒸馏水冲洗 4~6 次,干燥箱温度控制 60 °C 烘干,把半夏块茎研磨成粉末。准确称取半夏样品 0.200 g,加入超纯水 10 mL。超声(100 W, 40 kHz)提取 30 min,离心(12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)10 min,过滤残渣,重复上述操作,然后合并上清液。用滤膜过滤上清液后置于 99 °C 水浴锅浓缩至干,转移至 10 mL 量瓶中,定容,摇匀,即为半夏样品溶液。HPLC 检测鸟苷和肌苷的含量,每组半夏样品溶液进样 2 次,每次的进样量 10 μL 。

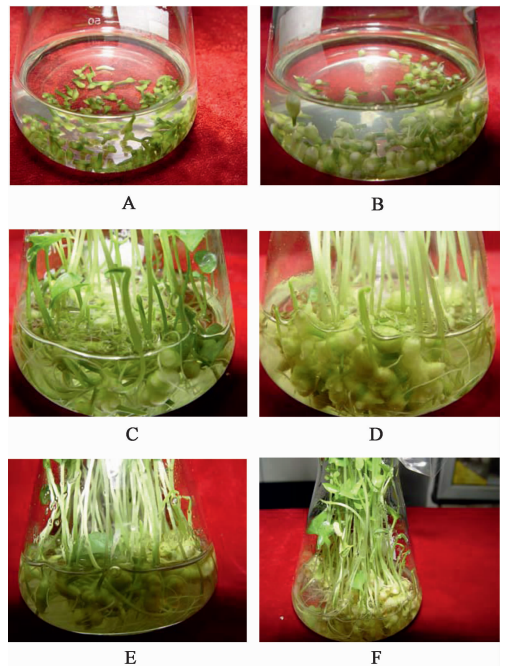
2.4 色谱条件^[8,17] 采用 Agilent 1200 高效液相色谱仪, C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(4:96),柱温 35 °C,肌苷检测波长 250 nm,鸟苷检测波长 260 nm,流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 10 μL 。

2.5 鸟苷的线性关系考察 配制 0.3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的鸟苷对照品溶液,分别精密吸取 0.10, 0.30, 0.60, 0.90, 1.20, 1.50 mL,各置于 10 mL 的量瓶中,用超纯水稀释定容,配制成不同浓度的鸟苷对照品溶液。分别测定系列浓度下鸟苷对照品峰面积值,得到鸟苷对照品的标准曲线,鸟苷在 0.03~0.45 μg 与峰面积线性关系良好,线性回归方程为 $A = 48\ 704C - 29.27$ ($R^2 = 0.999\ 6$)。

2.6 肌苷的线性关系考察 配制 0.03 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的肌苷对照品溶液,分别取精密吸取 0.10, 0.30, 0.60, 0.90, 1.20, 1.50 mL,各放置于 10 mL 量瓶中,用超纯水稀释定容,配制成不同浓度的肌苷对照品溶液。分别测定系列浓度下肌苷对照品峰面积值,得到肌苷对照品的标准曲线,肌苷在 0.003~0.045 μg 与峰面积范线性关系良好,线性回归方程为 $A = 33\ 554C - 3.47$ ($R^2 = 0.999\ 5$)。

3 结果

3.1 液体悬浮培养对半夏块茎生长的影响 半夏块茎在液体培养基中培养,能够适应周围生长环境,长成完整的试管苗植株。半夏试管块茎开始时呈浅绿色,此时还没有开始分化(图 1A)。培养 5 d 后,小块茎上长出 1~3 条白色的小根,有叶芽冒出,颜色绿中泛白(图 1B)。培养 10 d 后,半夏块茎的叶芽和根继续增长,体积增大,颜色转绿。培养 15 d 后,半夏块茎的根长长,叶子形成,颜色鲜绿,长势健壮(图 1C)。培养 20 d 后,半夏的根数稳定,块茎体积膨大至 3 倍左右,叶柄粗壮,颜色转为浅绿(图 1D)。培养 25 d 后,半夏的根、叶柄和块茎变化较小,长势减弱(图 1E)。培养到 30 d 时,高度不再增加,块茎体积不再变化(图 1F)。



A. 培养 0 d; B. 培养 5 d; C. 培养 15 d; D. 培养 20 d; E. 培养 25 d; F. 培养 30 d

图 1 半夏块茎生长趋势

Fig.1 Growth tendency of Pinelliae Rhizoma tuber

3.2 不同水杨酸浓度和培养时间对半夏块茎鲜重增长的对比 对照组(未经水杨酸处理)半夏块茎在 0~15 d 时,鲜重不断增加,培养到 20 d 时略微比 15 d 时有所降低,培养到 25 d 时,达到最大值。而处理组(经水杨酸处理)的半夏块茎,其鲜重呈持续增大的趋势,10~15 d 和 20~25 d 均是鲜重增长较快的阶段。比较可知,水杨酸浓度在 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,半夏试管块茎的鲜重达到最大值。由实验统计结果表明,半夏试管块茎经过不同天数和不同浓度

水杨酸处理,鲜重在 25 d,水杨酸 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大 7.4838 g 。见图 2。

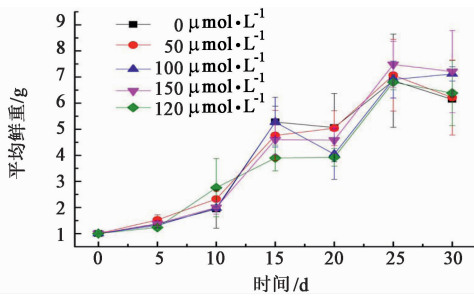


图 2 不同水杨酸浓度和培养时间对半夏块茎鲜重增长的对比
Fig. 2 Comparison of fresh weight growth of Pinelliae Rhizoma tuber with different SA concentration and cultivation time

为了进一步探究处理及各因子水平之间的不同,对实验数据进行方差分析,培养天数对半夏试管块茎鲜重增长影响因素达到极显著差异 ($P < 0.01$),水杨酸浓度以及两者交互作用没有显著性影响,方差分析结果见表 1。

表 1 半夏块茎鲜重方差分析

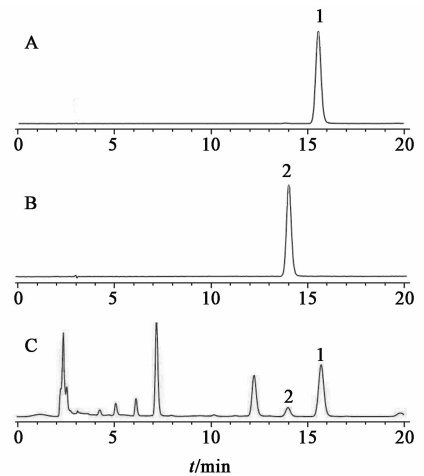
Table 1 Variance analysis of fresh weight of Pinelliae Rhizoma tuber

来源	自由度	MS	SS	F	P
天数	6	89.963	539.777	161.136	<0.01
水杨酸浓度	4	0.327	1.308	0.586	>0.05
天数和水杨酸浓度	24	0.488	11.704	0.873	>0.05
误差	70	0.558	39.081		

3.3 半夏块茎样品含量测定 根据每组半夏块茎样品溶液的进样,取峰面积的平均值进行统计计算,同时测定鸟苷和肌苷作为对照。分析结果可见,测定了半夏块茎样品中生物碱成分鸟苷和肌苷的含量,峰形独立,峰面积清晰。见图 3。

当水杨酸浓度为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,培养 10 d,鸟苷的含量达到最大值 $1.3533 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。当水杨酸浓度为 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,培养 15 d,鸟苷的含量达到最大值 $1.2533 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。当水杨酸浓度为 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,培养 15 d,鸟苷的含量达到最大值 $1.3411 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。见图 4。

为了进一步探究处理间及各因子水平之间的不同,对实验数据进行方差分析,培养天数对半夏试管块茎的鸟苷含量影响因素达到极显著差异 ($P < 0.01$),水杨酸浓度没有显著性影响,水杨酸浓度和天数两者交互作用有显著性影响 ($P < 0.05$),结果见方差分析表 2。



A, B. 对照品; C. 供试品; 1. 鸟苷; 2. 肌苷

图 3 半夏块茎的 HPLC

Fig. 3 HPLC of Pinelliae Rhizoma sample

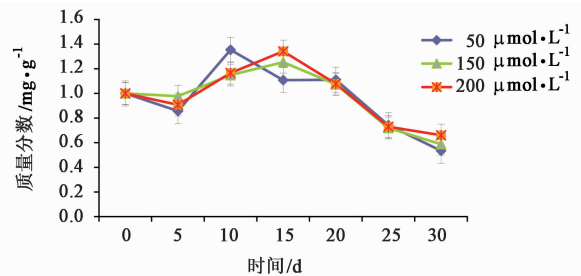


图 4 不同水杨酸浓度和培养时间对半夏鸟苷质量分数的影响

Fig. 4 Effect of different salicylic acid concentrations and cultivation time on content of Guanosine in Pinelliae Rhizoma

表 2 半夏块茎鸟苷含量方差分析

Table 2 Variance analysis of guanosine content of Pinelliae Rhizoma tuber

来源	自由度	MS	SS	F	P
天数	5	0.628	3.139	83.896	<0.01
水杨酸浓度	2	0.004	0.008	0.550	>0.05
天数和水杨酸浓度	10	0.020	0.202	2.704	<0.05
误差	38	0.007	0.284		

由图 5 可知,当水杨酸浓度为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,培养 30 d,肌苷的质量分数达到最大值 $0.1131 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。当水杨酸浓度为 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,培养 30 d,肌苷的质量分数达到最大值 $0.1444 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。当水杨酸浓度为 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,培养 30 d,半夏试管块茎中肌苷的质量分数达到最大值 $0.1498 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

为了进一步探究处理间及各因子水平之间的不同,对实验数据进行方差分析,半夏试管块茎的肌苷含量影响,因素培养天数达到极显著差异 ($P <$

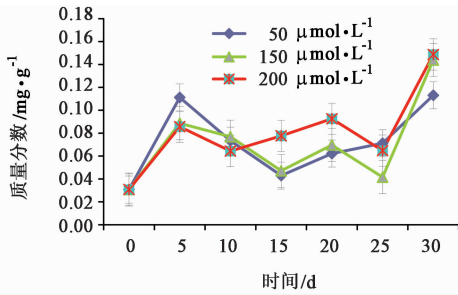


图 5 不同水杨酸浓度和培养时间对半夏肌苷质量分数的影响
Fig. 5 Effect of different salicylic acid concentrations and cultivation time on content of inosine in Pinelliae Rhizoma

0.01), 水杨酸浓度以及两者交互作用没有显著性影响, 结果见方差分析见表 3。

表 3 半夏块茎肌苷含量方差分析

Table 3 Variance analysis of inosine content of Pinelliae Rhizoma tuber

来源	自由度	MS	SS	F	P
水杨酸浓度	2	0.001	0.002	0.919	>0.05
天数	5	0.008	0.042	8.583	<0.01
天数和水杨酸浓度	10	0.001	0.008	0.823	>0.05
误差	38	0.001	0.038		

4 讨论

水杨酸对半夏块茎的生长具有一定的影响。由实验结果表明, 半夏块茎的鲜重整体呈增长趋势。水杨酸处理组, 在 0~10 d 时, 增长量较小, 10~15 d 时, 生物量积累迅速, 在 15~20 d 和 25~30 d 这两个阶段, 鲜重不升反降, 20~25 d 时又有一个迅速增长期, 达到最大值。推测可能是开始半夏试管块茎不适应添加外源水杨酸的环境, 逐渐适应后, 生物量随之积累; 中间时间段可能是部分块茎细胞凋亡导致鲜重有所降低。实验发现, 处理组和对照组中半夏块茎生物量的积累基本呈现一致的升降趋势。与细胞分裂素或生长素不同, 水杨酸虽能促进细胞的生长, 但高浓度的水杨酸处理或内源水杨酸的积累会对细胞生长产生氧化胁迫伤害, 具有抑制作用^[18]。研究报道喜树细胞培养体系的建立与喜树异碱 A 和 B 的生物合成及过程调控中发现, 在培养的稳定期第 9 天添加适量的外源水杨酸, 有利于提高喜树异碱 A 和 B 的产量^[19]。本实验得到的实验结果与前人研究的基本一致。

前人在半夏块茎次生代谢生产和调控方面开展了一些相关的研究。薛建平等研究用低浓度的水杨酸(0.01~0.5 mmol·L⁻¹) 喷洒半夏植株, 半夏块茎

的产量和块茎中的生物碱成分均有很大程度提高^[19]。LIU 等^[20] 研究发现: 以半夏块茎为外植体诱导获得的试管小块茎里生物碱的含量是大田收获块茎中含量的 4.46 倍, 鸟苷的含量是栽培块茎的 10.6 倍。刘永红等^[21] 在液体培养基中添加低浓度水杨酸(1.5~3 mg·L⁻¹), 结果检测到半夏块茎中鸟苷、肌苷碱含量均有不同程度的增加。薛建平前人的这些研究, 为半夏的栽培和半夏药材有效成分的生产调控提供技术支持, 一定程度上缓解了市场对半夏供不应求的现状。

本研究结果表明, 半夏试管块茎经过不同天数和不同浓度水杨酸处理, 鲜重在 25 d, 水杨酸 150 μmol·L⁻¹ 时达到最大 7.483 8 g。半夏块茎生物碱鸟苷的含量的整体趋势为先增加, 后减少, 鸟苷的含量最高达到 1.353 3 mg·g⁻¹。培养天数对半夏试管块茎的鸟苷含量达到极显著影响, 水杨酸浓度和天数两者交互作用有显著性影响。半夏块茎生物碱肌苷的含量的整体趋势为先下降, 后增加, 肌苷的含量最大值达到 0.149 8 mg·g⁻¹, 培养天数对半夏试管块茎的鸟苷含量达到极显著影响。

[参考文献]

[1] 刘永红, 郭建宏, 刘文婷, 等. 药用植物半夏生物碱类成分研究进展[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2015, 43(9): 171-177.

[2] 龚道锋, 王甫成, 纪东汉, 等. 中药半夏化学成分及其药理、毒理活性研究进展[J]. 长江大学学报: 自科版, 2015, 12(18): 77-79.

[3] 肖琦, 阳文武, 张德伟, 等. 半夏总生物碱含量影响因素及药理作用研究进展[J]. 中国药业, 2016, 25(3): 123-126.

[4] 吴皓, 李伟, 张科卫, 等. 半夏药材鉴别成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(9): 836-839.

[5] 何丹, 杨林, 秦少容, 等. 超高效液相色谱法测定半夏不同炮制品中核苷类成分含量[J]. 医药导报, 2015, 34(2): 231-234.

[6] 王晖, 马慧芬, 徐赟晨, 等. 炮制对半夏淀粉基础物理化学性质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 32-36.

[7] 张瑾, 谈献和. 半夏资源研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(5): 104-106.

[8] 黄蛟, 易进海, 刘玉红, 等. 天南星、半夏、白附子中 8 种核苷成分的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 59-62.

[9] 龙月红, 邢朝斌, 劳凤云, 等. 高效液相色谱测定不同生境黄芩中的黄芩苷[J]. 中国实验方剂学杂志,

- 2012, 18(6):97-100.
- [10] 汪尚,徐鹭芹,张亚仙,等.水杨酸介导植物抗病的研究进展[J].植物生理学报,2016,52(5):581-590.
- [11] YUAN S, LIN H H. Role of salicylic acid in plant abiotic stress [J]. Z Naturforsch C, 2008, 63(5/6):313-320.
- [12] DONG J, WAN G W, LIANG Z S. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture [J]. J Biotechnol, 2010, 148(2/3):99-104.
- [13] XIAO Y, DI P, CHEN J F, et al. Characterization and expression profiling of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene (Smhppd) from *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(7):2019-2029.
- [14] 张悦,王义,蒋世翠,等.水杨酸诱导下人参培养物差异表达基因片段的克隆[J].基因组学与应用生物学,2009,28(2):245-250.
- [15] 孟书亦,马秀杰,韩梅,等.水杨酸对黄芩愈伤组织抗氧化酶活性及黄芩苷含量的影响[J].分子植物育种,2017,15(10):4179-4183.
- [16] Manorma S, Archana S, Ashwani K, et al. Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cells through stress stimulus [J]. Am J Plant Physiol, 2011, 6(2):50-71.
- [17] 祝军委,冯果,冯泳.小半夏加茯苓汤中鸟苷含量的高效液相色谱测定[J].时珍国医国药,2013,24(8):1818-1820.
- [18] 郝林.水杨酸参与生物学过程的交谈机制[J].沈阳师范大学学报:自然科学版,2010,28(4):449-457.
- [19] 薛建平,张爱民,方中明,等.2007,水杨酸对半夏植株生长的影响[J].中国中药杂志,32(12):1134-1136.
- [20] LIU Y H, LIANG Z S, ZHANG Y J. Induction and in vitro alkaloid yield of calluses and protocorm-like bodies (PLBs) from *Pinellia ternata* [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 2010, 46(3):239-245.
- [21] 刘永红,梁宗锁,杨东风,等.半夏小块茎悬浮培养及其生物碱类化合物的测定[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2009,37(11):168-174.

[责任编辑 顾雪竹]