

光质对悬浮培养黄芩细胞生长及黄芩苷积累的影响

张进杰*, 徐茂军, 周桂飞

(浙江工商大学生物工程系, 杭州 310035)

摘要:研究了不同光质、光强和光期对悬浮培养黄芩(*Scutellaria baicalensis*)细胞的生长、细胞中苯丙氨酸氨基裂解酶(PAL)活性及黄芩苷含量的影响。白光、紫外光、红光和蓝光对悬浮培养黄芩细胞 PAL 活性和黄芩苷含量有不同的影响。白光、紫外光和蓝光对 PAL 活性和黄芩苷的积累具有诱导促进作用,其中紫外光的促进作用最强,白光和蓝光的促进作用较弱,而红光照射对 PAL 活性和黄芩苷的积累有一定的抑制作用。在 0-60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 紫外光照射强度范围内, PAL 活性和黄芩苷含量随着紫外光照射强度的增加而显著提高。实验结果同时表明,红光照射显著促进黄芩细胞的生长,紫外光抑制黄芩细胞的生长,而蓝光和白光对悬浮培养黄芩细胞生长的促进作用不明显。与黑暗(对照)相比,每天 8 h 光照强度为 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的紫外光、16 h 光照强度为 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的红光交替处理,在培养 12 d 后,细胞的鲜重和黄芩苷含量为对照的 1.16 和 3.2 倍,黄芩苷的产量达到 439 mg L^{-1} , 是对照的 3.8 倍。

关键词:黄芩; 悬浮培养; 光诱导; PAL; 黄芩苷

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)02-0135-06

Effects of Light Waves on Cell Growth and Baicalin Accumulation in Suspension Culture of *Scutellaria baicalensis* Georgi

ZHANG Jin-jie*, XU Mao-jun, ZHOU Gui-fei

(Department of Bioengineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

Abstract: We investigated influences of white light, UV-B, red light and blue light on phenylalanine ammoniolyase (PAL) activity, baicalin content and cell growth in suspension culture of *Scutellaria baicalensis* Georgi. PAL activity and baicalin accumulation were promoted significantly by UV-B, moderately by white and blue lights. Red light had negative effects on PAL activity and baicalin accumulation. Baicalin content and PAL activity remarkably increased with UV-B intensity rising from 0 to 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. The cell growth was promoted by red light, inhibited by UV-B, and unaffected by blue and white lights. Following treated with the alternation of 8 h UV-B of 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and 16 h red light of 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fresh cell weight and baicalin content were 1.16- and 3.2-fold, respectively, higher than the controls. The yield of the total baicalin was 439 mg L^{-1} which was 3.8-fold higher than control.

Key words: *Scutellaria baicalensis*; Cell suspension culture; Light inducement; Phenylalanine ammoniolyase; Baicalin

黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 为唇形科 (Labiatae) 黄芩属 (*Scutellaria*) 植物, 其干燥根是我国的传统中药, 最早收载于神农本草经, 被列为草根

的上品。黄芩的有效成分主要包括黄芩苷和黄芩素等多种活性物质。据报道, 黄芩有清热燥湿、泻火解毒、止血和安胎的功能^[1]。黄芩苷可有效抑制前列腺

收稿日期: 2006-07-05 接受日期: 2006-09-21

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(302785)资助

* 通讯作者 Corresponding author

增生,很可能成为理想的治疗前列腺增生药物^[2];黄芩苷元和千层纸黄素 A 分别对大肠癌细胞 WiDr 的增殖和宫颈癌细胞 HeLa S3 具有强烈抑制作用^[3,4];黄芩配合其他中药治疗肝癌有疗效^[5]。因此大规模开发黄芩,将会有很大的经济效益和社会效益。

虽然黄芩等中草药植物是一种可再生资源,但是由于受到栽培困难、生长速度慢、无计划采伐以及近年来对天然植物药需求不断增加等因素的影响,使许多植物药的供需矛盾日益突出^[6]。以细胞全能性为基础建立起来的植物细胞培养技术为植物药生产提供一条新途径。在经过多年的研究探索后,一些天然植物活性产物,如紫草宁、小檗碱等已可以采用细胞培养法生产^[7]。然而,目前能够利用细胞培养法产业化生产的植物活性物质的种类和数量都非常有限。制约细胞培养法产业化应用的关键问题之一是普遍存在的培养细胞中次生代谢产物的低产现象。因此,进一步深入研究植物细胞中次生代谢产物合成的高产调控机理,从而有针对性的优化培养条件具有重要的实际意义。

植物细胞内活性物质的生物合成受到多种内外因子的影响,其中光质和光强是环境中最重要的影响因素^[8]。Kreuzaler 等^[9]对欧芹(*Petroselinum hortense*)和 Ryder 等^[10]对菜豆(*Phaseolus vulgaris*)的研究表明,黄酮类物质合成途径的关键酶(包括 PAL, 4CL, CHS, CHI 等)的含量和活性可以受到光调节,其中关键酶—苯丙氨酸氨基裂解酶(Phenylalanine ammonialyase, PAL) 是最重要的光调节步骤。然而目前有关通过不同光质和光强来调控 PAL 活性和提高药用植物细胞中黄酮类次生代谢物质含量的研究报道尚不多见^[11-12]。本文研究不同光质、光强对黄芩悬浮细胞生长、PAL 活性和黄芩细胞中最主要的黄酮类活性物质—黄芩苷积累的影响,旨在探索提高黄芩悬浮培养细胞中有效活性物质含量的方法。

1 材料和方法

1.1 植物材料及培养条件

新鲜黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)由杭州药物种植场提供。黄芩愈伤组织由本实验室诱导选育。将在 MS 固体培养基上稳定继代 2 a 的愈伤组织培养 12 d 后,转入含有 50 ml MS 培养液的

250 ml 的三角瓶中进行黑暗悬浮培养,摇床转速 90 r min⁻¹,培养温度 25±1℃。接种量约为 60 g L⁻¹ 鲜重,培养液中附加 5–10 mol/L NAA 和 6–10 mol/L BA, 3%蔗糖, pH 6.0(灭菌前)。每隔 12 d 继代一次。

1.2 光质与光强实验

以 40 w 白色荧光灯(杭州佑昌照明电器有限公司,中国)为白色光源(White light)。以 30 w 紫外荧光灯(杭州佑昌照明电器有限公司,中国)为紫外光源(UV-B: 300 nm)。以 40 w 红色荧光灯(杭州佑昌照明电器有限公司,中国)经 PG501/3 红色滤光片(长春市荆禹光学科技有限公司,中国)过滤作为红光光源(Red light: 660 nm)。以 40 w 蓝色荧光灯(杭州佑昌照明电器有限公司,中国)经 PG627/3 蓝色滤光片(长春市荆禹光学科技有限公司,中国)过滤后作为蓝光光源(Blue light: 440 nm)。通过调节灯管与实验材料之间的距离控制照射强度,以 TSI-65A 型辐射能量计(Yellow Springs 公司)测定光强。

1.3 悬浮细胞生长的测定

悬浮细胞每两天收获 1 次,用蒸馏水冲洗 3 遍,减压抽滤至不滴水后称鲜重(Fresh weight, FW)。

1.4 黄芩悬浮细胞中 PAL 酶活性的测定

不同处理的黄芩悬浮细胞以 1 000×g 离心 5 min,收集沉淀细胞,按 1:2(V:W; ml g⁻¹)的比例加入提取液(50.0 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 10.0 mmol/L 巯基乙醇, 4.0 mmol/L EDTA, 1.0 μmol/L 亮抑蛋白酶肽),冰浴中研细,4℃下 10 000×g 离心 15 min。取上清液 1 ml 按 Grant 等^[13]的方法测定 PAL 酶活性。PAL 酶活性单位以 nmol(反式肉桂酸) mg⁻¹ protein h⁻¹ 表示。

1.5 黄芩苷含量的测定

黄芩苷的提取和含量测定方法参照苏健等^[14]的方法,稍做改进。将烘干样品研磨,取 0.5 g 黄芩干细胞粉用甲醇超声提取两次,每次干细胞:甲醇为 1:100 (W:V);混合两次提取液减压浓缩至浸膏状,用甲醇溶解定容至 50 ml,过 0.45 μm 有机滤膜,进高效液相仪检测,采用 C18 柱并进行全波长紫外扫描,在 280 nm 处有最大吸收。黄芩苷标品购自浙江中药鉴定所。测得其标准曲线为 $y=33987x+21.919$

($r=0.99955$), 其中 x 为黄芩苷浓度(单位: mg L^{-1}), y 为对照品峰面积分值, 曲线适用浓度为 $0.0244\text{--}0.244 \text{ mg L}^{-1}$ 。依此算出各黄芩干细胞样品中黄芩苷含量。

2 结果和分析

2.1 悬浮细胞生长与黄芩苷积累的动态变化

暗培养条件下, 悬浮黄芩细胞初期生长缓慢, 4 d 后增长速度增加, 至 10 d 左右增长速度开始降低, 第 12 天达到最大鲜重 345 g L^{-1} (图 1)。黄芩苷含量变化如图 1 所示, 在细胞培养前期阶段, 黄芩苷含量有所降低, 随着细胞的迅速生长而逐渐升高, 12 d 以后达到最高, 为 $7 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ 。悬浮培养黄芩细胞内 PAL 活性在细胞生长的对数生长期稍有升高的趋势, 但变化量不大, 同样第 12 天达到最大值 $89 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 。

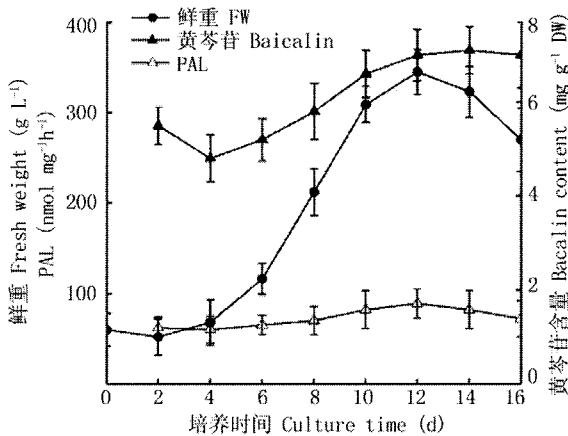


图 1 悬浮黄芩细胞生长、PAL 活性和黄芩苷的动态变化

Fig. 1 Changes in cell growth, PAL activity and baicalin content in suspension culture of *S. baicalensis*

2.2 不同光质对悬浮培养黄芩细胞鲜重、PAL 活性和黄芩苷含量的影响

分别测定了相同照射强度($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 不同光质连续照射下第 12 天悬浮黄芩细胞的单位培养液生产的黄芩细胞鲜重、细胞内 PAL 活性及黄芩苷含量 (图 2)。与对照相比, 白光、红光和蓝光对细胞鲜重都有促进作用, 其中红光处理细胞的鲜重达到对照的 1.2 倍; Van 等^[15]的研究表明植物经 UV-B 辐射后光合产物积累会同步下降, 与本实验结果类似。紫外光对细胞生长具有明显抑制作用, 细胞鲜

重只是对照的 75%; 白光、紫外光和蓝光对 PAL 活性都具有加强作用, 其中紫外光处理细胞的 PAL 活性为对照的 3.81 倍, 红光处理的细胞 PAL 活性为对照的 60%; 黄芩苷含量的变化趋势与 PAL 活性相似, 白光、紫外光和蓝光对黄芩苷的积累均有促进作用, 经紫外光处理的细胞黄芩苷含量达到对照的 3.7 倍, 而经红光处理的细胞黄芩苷含量仅为对照的 43%。

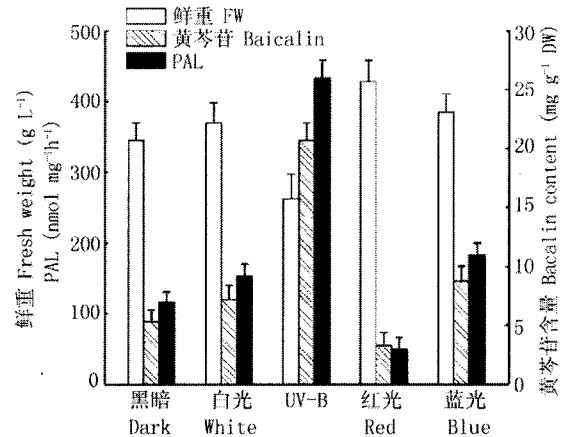


图 2 不同光质对黄芩细胞鲜重、PAL 活性及黄芩苷含量的影响

Fig. 2 Effects of light waves on cell growth, PAL activity and baicalin content in suspension culture of *S. baicalensis*

2.3 不同光照时间对悬浮培养黄芩细胞的 PAL 活性及黄芩苷含量的影响

采用相同光强($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)不同光质每天分别照射 0、4、8、12、16、20、24 h, 测定了各种处理条件下悬浮培养黄芩细胞在第 12 天的 PAL 活性和黄芩苷含量(表 1)。实验结果表明, 经 4 种不同光质分别处理后, 黄芩细胞的 PAL 活性和黄芩苷含量的变化趋势基本一致。经光强为 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 的白光、紫外光和蓝光分别处理的细胞, PAL 活性和黄芩苷含量随着每天光照时间的增加而呈上升趋势。白光和蓝光每天光照时间的增加对 PAL 活性和黄芩苷积累的增加作用分别在 20 h 和 8 h 达到饱和, 且这两种光质对 PAL 活性和黄芩苷积累的增加作用不是很明显。紫外光处理的细胞在每天光照 16 h 左右时 PAL 活性和黄芩苷积累的增加达到饱和, 细胞每天经紫外光处理 20 h 后, PAL 活性和黄芩苷含量分别达到对照的 3.9 倍和 3.73 倍, 而每天处理 24 h, PAL 活性和黄芩苷含量却有下降的趋势, 这可能是每天 24 h 光强为 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 的紫外光超出了黄芩细

表 1 不同光照时间对 PAL 活性和黄芩苷含量的影响

Table 1 Effects of light durations on PAL activity and baicalin content in cell suspension culture of *S. baicalensis*

光照时间 Light duration (h d ⁻¹)	白光 White light		紫外光 UV-B		红光 Red light		蓝光 Blue light	
	PAL (nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	黄芩苷 Baicalin (mg g ⁻¹ DW)	PAL (nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	黄芩苷 Baicalin (mg g ⁻¹ DW)	PAL (nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	黄芩苷 Baicalin (mg g ⁻¹ DW)	PAL (nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	黄芩苷 Baicalin (mg g ⁻¹ DW)
0	90.6	7.12	90.6	7.12	90.6	7.12	90.6	7.12
4	98.8	10.25	140.2	12.37	86.2	6.53	116.9	8.52
8	102.2	11.17	249.6	18.72	80.5	6.10	125.3	9.02
12	105.7	13.45	302.8	21.16	72.1	5.22	135.5	10.25
16	112.5	14.21	336.3	25.84	65.4	4.61	142.2	11.63
20	121.3	14.63	351.7	26.55	59.6	3.73	145.8	12.42
24	120.6	14.21	345.6	26.35	55.5	3.26	146.2	12.83

胞的承载负荷,对细胞造成的伤害所致。经光强为 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的红光处理的黄芩细胞随每日光照时间的增加, PAL 活性和黄芩苷含量呈现出逐渐减少的趋势。

2.4 不同紫外光照射强度对悬浮培养黄芩细胞鲜重、PAL 活性及黄芩苷含量的影响

在所实验的几种光质中,紫外光对悬浮培养黄芩细胞的 PAL 活性及黄芩苷积累的诱导促进作用最强,因此进一步考察不同紫外照射强度对细胞鲜重、PAL 活性和黄芩苷含量的综合影响(图 3)。实验结果表明每天光处理 16 h, $0\text{--}60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 强度的紫外光,悬浮培养黄芩细胞的 PAL 活性及黄芩苷含量显著上升,当紫外光照射强度超过

$60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时, PAL 活性和黄芩苷含量虽然有小幅度上升,但是变化不大。而紫外光对黄芩细胞生长的抑制作用则随着光强的增加而不断加强。因此,采用低强度的紫外光既可以有效地促进黄芩苷积累,又可以将紫外光对黄芩细胞生长的抑制作用降至最低程度,在我们的实验中,每天光照 16 h, 光照强度 $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 为紫外光促进黄芩苷积累的最佳强度。

2.5 紫外光和红光交替处理对悬浮培养黄芩细胞黄芩苷总产量的影响

紫外光虽然对 PAL 活性和黄芩细胞内黄芩苷的合成作用具有显著的诱导促进作用,但同时也对悬浮黄芩细胞的生长具有明显的抑制作用,而红光照射对悬浮培养黄芩细胞的生长具有明显的促进作用,因此考察了红光和紫外光交替处理(红光/紫外光每天照射时数分别为 0 h/24 h、4 h/20 h、8 h/16 h、12 h/12 h、16 h/8 h、20 h/4 h、24 h/0 h; 照射强度为紫外光: $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 红光: $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 对悬浮培养黄芩细胞的生长、PAL 活性及黄芩苷含量的影响。第 12 天收获细胞。实验结果(图 4)表明,随着紫外光照射时间的缩短,红光照射时间的延长,单位体积培养液的鲜黄芩细胞产量显著增高,而 PAL 活性的有逐渐减少趋势。在每天 8 h 紫外光、16 h 红光交替处理下,单位体积培养液黄芩苷产量达到最高值 439 mg L^{-1} , 为对照(黑暗培养)处理的 3.8 倍,且鲜重和黄芩苷含量达到 402 g L^{-1} 和 $22.6 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$, 分别为对照的 1.16 和 3.2 倍。因此,通过不同光质的合理组合可以很有效地提高单位体积培养液中悬浮黄芩细胞中黄芩苷的总量。

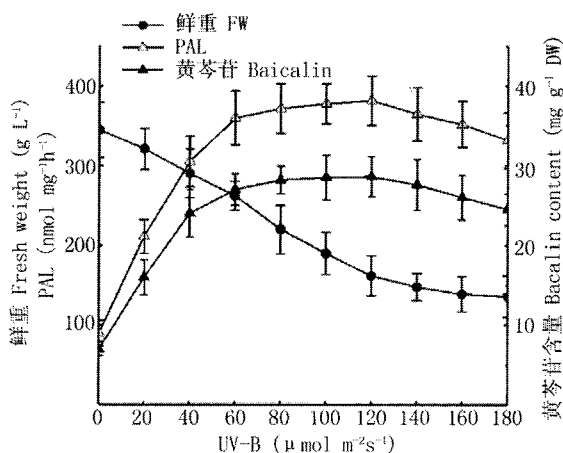


图 3 紫外光照射强度对黄芩细胞鲜重、PAL 活性和黄芩苷积累的影响

Fig. 3 Influences of UV-B intensities on cell growth, PAL activity and baicalin content in suspension culture of *S. baicalensis*

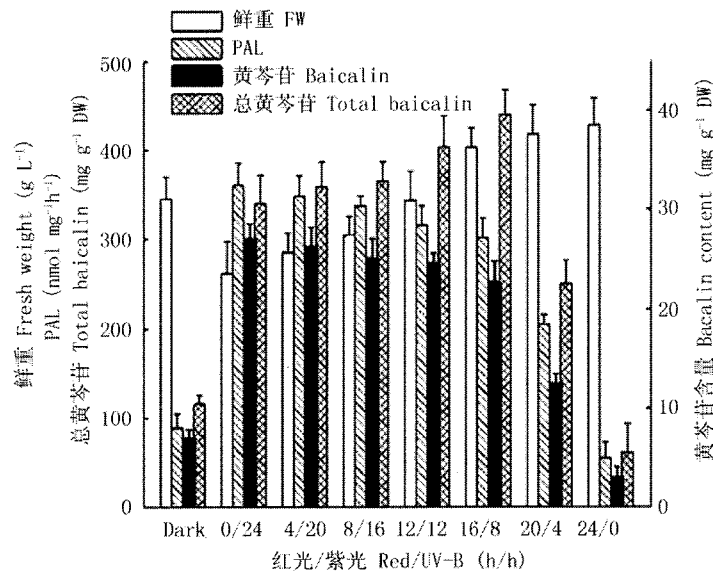


图 4 紫外光和红光交替照射对悬浮培养黄芩细胞的生长、PAL 活性及黄芩苷积累的影响

Fig. 4 Influences of the alternation of UV-B and red light on cell growth, PAL activity and baicalin content in suspension culture of *S. baicalensis*

3 讨论

光是影响植物形态建成和生理功能的重要环境因子。植物在进化过程中形成了对环境光信号反应的能力,不同光质刺激植物生长发育的效应不一样^[16-17],光对植物生长发育和抗病反应中的作用已引起了研究者的广泛重视^[18-19]。本研究结果表明,白光、红光和蓝光对悬浮培养黄芩细胞生长具有诱导促进作用,其中红光的促进作用最为明显,但抑制黄芩细胞 PAL 活性和黄芩苷的积累;白光、紫外光和蓝光对黄芩细胞 PAL 活性和黄芩苷积累均有增强作用,紫外光对黄芩细胞 PAL 活性和黄芩苷积累的增强作用最强,但紫外光照射抑制黄芩细胞的生长。

紫外光照射对植物有伤害作用^[20],在本实验中表现为随着紫外光照射强度的增加和照射时间的延长对黄芩细胞生长产生严重的抑制作用(图 2,图 3)。实验中紫外光照射促进黄芩苷积累的作用可能与紫外光能够激活黄芩悬浮细胞的防卫机制有关。苯丙烷代谢途径是植物细胞中许多防御性次生代谢物质合成代谢的共同途径,苯丙氨酸解氨酶(PAL)是这一途径的第一关键酶^[21]。在各种生物逆境胁迫下,植物细胞的特征反应之一是苯丙烷代谢途径的激活^[22]。因此苯丙烷代谢途径的关键酶 PAL 活性被广泛用作为植物防御反应激活的指标。本文实

验结果表明,紫外光照射对黄芩细胞中 PAL 活性和黄芩苷积累的变化趋势基本一样;并且紫外光照射对增加悬浮培养黄芩细胞中 PAL 活性和黄芩苷积累影响的最佳效果,存在光照时间和光照强度的依赖性。每天光照 16 h 的前提下,光照强度 $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 为紫外光促进黄芩细胞中 PAL 活性和黄芩苷积累的最佳强度。提示可能黄芩细胞对紫外光照射引起的防卫反应能力可能存在一极值点,超过此极值点,悬浮培养黄芩细胞内通过苯丙烷途径合成黄芩苷的能力就会下降。

Brain 等^[23]的研究认为红光能够刺激植物拟南芥细胞中光敏色素 A 的表达从而提高细胞光合作用的能力和增强植物的趋光性。本实验结果表明,红光处理悬浮培养黄芩细胞对黄芩细胞的生长具有促进作用。考虑到紫外光和红光照射对悬浮培养黄芩细胞的不同作用效果,采用紫外光和红光交替照射黄芩悬浮细胞。结果表明,在紫外光和红光最佳配比(每天 8 h 紫外光、16 h 红光交替处理)的条件下,单位体积细胞培养液黄芩苷产量可达对照(暗培养)的 3.8 倍。Croatean 等^[24]认为,光合作用对植物生物量的提高能提供较多的次生代谢物前体,同时又抑制了次生代谢产物的分解。因此推断,红光照射对黄芩细胞生长的促进作用,正为紫外光照射诱导 PAL 活性和促进黄芩苷的积累提供了前提条件,并且对紫外光抑制黄芩细胞的生长作用起到一

定的抵消作用,从而达到提高单位体积细胞培养液黄芩苷产量的目的。但紫外光和红光光信号对黄芩细胞的生长、PAL 活性和黄芩苷积累的协同调节作用机理尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Ding R X(丁如贤), Zhang H M(张汉明), Fu X(付翔). Rosette bud induction from stem segment of *Scutellaria baicalensis* [J]. Chin Trad Herb Drugs(中草药), 1998, 29(3):194-196.(in Chinese)
- [2] Dai Y(戴岳), Zhang C(张聪), Lin S M(林巳茂), et al. Studies on the effects of baicalin on prostatitis of rat [J]. Acta Chin Med(中医药学刊), 2003, 21(3):386-388.(in Chinese)
- [3] 西井奈绪美. 黄芩苷元对人大肠癌细胞 WiDr 的作用 [J]. 国外医学 中医中药分册, 2004, 26(3):185.
- [4] 小西真由子. 黄芩中的千层纸黄素 A 对宫颈癌细胞 HeLa S3 的作用 [J]. 国外医学 中医中药分册, 2004, 26(3):185.
- [5] Tang Y J(唐由君), Liu Z D(刘寨东), Xu Y(许云). Study on liver metastases of 22 peoples with Chinese medicine including *Bupleunum* and *Hypericum japonicum* Thunb [J]. Chin Imag J Integ Trad West Med(中国中西医结合影像学杂志), 2004, 2(2): 122-123.(in Chinese)
- [6] Vdrpoorte R, Alfermann A W. Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism [M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. 1-29.
- [7] Roberts S C, Shuler M L. Large-scale plant cell culture [J]. Curr Op Biotechn, 1997, 8:154-159.
- [8] Xie L L(谢灵玲), Zhao W L(赵武玲), Shen L M(沈黎明). Light regulation of the expression of PAL gene in soybean leaves and isoflavone synthesis [J]. Chin Bull Bot(植物学通报), 2000, 17(5): 443-449.(in Chinese)
- [9] Kreuzaler F, Ragg H, Fautz E, et al. UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* [J]. PNAS USA, 1983, 80:2591-2593.
- [10] Ryder T B, Hedrick S A, Bell J N, et al. Elicitor rapidly induces chalcone synthase mRNA in *Phaseolus vulgaris* cells at the onset of the phytoalexin defense response [J]. Mol Genet Evol, 1987, 2:219-233.
- [11] Olisson L C, Veit M, Weissenböck G, et al. Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus* [J]. Phytochemistry, 1998, 49:1021-1028.
- [12] Liakoura V, Manetas Y, Karabourniotis G. Seasonal fluctuation in the concentration of UV-absorbing compounds in the leaves of some mediterranean plants under field condition [J]. Physiol Plant, 2001, 111:491-500.
- [13] Grant J J, Loake G J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance [J]. Plant Physiol, 2000, 124:21-30.
- [14] Su J(苏健), Xiang D(向东), Zhang Y H(张礪华), et al. Determination of baicalin content in *Scutellaria amoena* C. H. Wright by HPLC [J]. West Chin J Pharm Sci(华西药理学杂志), 2005, 20(4):356-358.(in Chinese)
- [15] Van T K, Garrard L A, West S H. Effects of UV-B radiation on net photosynthesis of some crop plants [J]. Crop Sci, 1976, 16:715-718.
- [16] Matsumoto T, Nishida K, Noguchi M. Some factors affecting the anthocyanin by *Populus* cells in suspension culture [J]. Agri Biol Chem, 1973, 37:561-567.
- [17] Li S U(李树敏), Zhu W H(朱慰华). Studies on pigment cell culture of *Panax ginseng* [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1990, 32: 103-111.(in Chinese)
- [18] Fuglevand G, Jackson J A, Jenkins G I. UV-B, UV-A, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1996, 8:2347-2357.
- [19] Khanam N N, Ueno M, Kihara J, et al. Suppression of red light-induced resistance in broad beans to *Botrytis cinerea* by salicylic acid [J]. Physiol Mol Plant Path, 2005, 66:20-29.
- [20] Rosena O, Staij J V D, Bjorn L O. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation [J]. Tree, 1997, 12:22-28.
- [21] Jones D H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development [J]. Phytochemistry, 1984, 23:1349-1359.
- [22] Phyllin R I, Korhonen M S, Tauriainen A A. Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch [J]. Plant Physiol, 2002, 130:549-560.
- [23] Parks B M, Quail P H, Hangarter R P. Phytochrome A regulates red-light induction of phototropic enhancement in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 1996, 110:155-162.
- [24] Croteau R, Burbou A J, Loomis W D. Apparent energy deficiency in mono- and sesqui-terpene biosynthesis in peppermint [J]. Phytochemistry, 1972, 11:2937-2948.