

DOI:10.14188/j.ajsh.2022.02.003

药用植物组织培养生产次生代谢产物的研究进展

范沾涛^{1,2,3}, 韦 范^{1,2}, 乔 柱^{1,2}, 梁 莹^{1,2}, 谢唐贵¹, 刘吉华^{3*}, 韦坤华^{1,2*}

- (1. 广西药用植物园 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530023;
2. 广西药用植物园 广西壮族自治区中药资源智慧创制工程研究中心, 广西 南宁 530023;
3. 中国药科大学 江苏省中药评价与转化重点实验室, 江苏 南京 211198)

摘要: 次生代谢产物是药用植物的重要有效成分,但由于野生资源日益减少和栽培品种品质退化,给临床使用和质量控制带来许多困扰,利用组织培养技术生产有效成分,能缓解药用植物资源压力。本文总结了在植物组织培养过程中,外植体的选择、培养条件、培养方法等因素对次生代谢产物积累的影响,并简述了应用诱导子、添加前体物、添加抑制剂和应用基因工程技术四种促进次生代谢产物积累的方法,旨在为利用组织培养技术生产次生代谢产物提供理论参考,为药用植物资源的开发和利用提供科学指导。

关键词: 药用植物;组织培养;次生代谢产物

中图分类号: S603. 6

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2022)02-0130-11

Research progress in the production of secondary metabolites by tissue culture of medicinal plants

FAN Zhantao^{1,2,3}, WEI Fan^{1,2}, QIAO Zhu^{1,2}, LIANG Ying^{1,2}, XIE Tanggui¹, LIU Jihua^{3*},
WEI Kunhua^{1,2*}

- (1. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, Guangxi, China;
2. Guangxi Engineering Research Center of TCM Resource Intelligent Creation, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, Guangxi, China;
3. Jiangsu Key Laboratory of TCM Evaluation and Translational Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, Jiangsu, China)

Abstract: Many factors are involved in the production of secondary metabolites by tissue culture of medicinal plants. In this paper, the influences of the selection of explants, culture conditions and culture methods on the production of secondary metabolites are summarized, and four methods to improve the production of secondary metabolites, including the application of inducers, the addition of precursors, the addition of inhibitors and the application of genetic engineering technology, are described.

Key words: medicinal plant; tissue culture; secondary metabolite

收稿日期: 2021-12-01 修回日期: 2022-01-05 接受日期: 2022-04-28

作者简介: 范沾涛(1997-),男,硕士生,研究方向:中药资源开发。E-mail: ybyq2020@163.com

* 通讯联系人: 刘吉华(1969-),男,教授,研究方向:中药生物技术与新药创制, E-mail: liujihua@cpu.edu.cn; 韦坤华(1983-),女,博士,研究员,从事药用植物生物技术研究, E-mail: divinekh@163.com

基金项目: 中央引导地方科技发展专项资金项目(桂科 ZY20198018);广西创新驱动发展专项(桂科 AA18242040);对发展中国家科技援助项目(KY201904001);“广西八桂学者”专项经费项目;广西科研创新团队建设项目(桂药创 201905)

引用格式: 范沾涛, 韦范, 乔柱, 等. 药用植物组织培养生产次生代谢产物的研究进展[J]. 生物资源, 2022, 44(2): 130-140.

Fan Z T, Wei F, Qiao Z, *et al.* Research progress in the production of secondary metabolites by tissue culture of medicinal plants [J]. Biotic Resources, 2022, 44(2): 130-140.

0 引言

随着经济的发展、人们对健康需求的提高以及人口进一步老龄化,中药资源的需求量不断提高。目前药用植物主要以人工栽培方式进行生产,相比于农作物,大多数药材的生产周期较长,有限的土地资源也限制了药材种植面积的扩大。传统的栽培方式难以满足中药资源不断增长的需求,同时中药资源需求的不断提高给野生中药资源的保护带来了极大的压力,部分野生中药资源因遭受滥采滥伐而濒临灭绝。采用药用植物组织培养的生产方式,可在有限时间与空间内生产药用植物次生代谢产物,有效解决中药资源的供需矛盾,实现中药资源的有效保护与合理利用。本文综述了药用植物组织培养生产次生代谢产物的研究进展,为通过组织培养技术生产次生代谢产物提供科学指导。

1 利用组织培养生产药用植物次生代谢产物的优点

组织培养技术是在人为创造的无菌条件下,将活的离体器官(如根、茎、叶、茎段、原生质体)、组织或细胞置于培养基内,并放在适宜的环境中不断培养,以获得细胞、组织或个体的技术^[1]。植物代谢过程中产生的各种次生代谢物,在传统医药和食品领域起着重要作用,主要用于医药、食品添加剂和工业产品的生产。传统的栽培方法是通过种子繁殖和扦插等方式获得优良的药用植物品种,该方法耗时长,成本高,通常次生代谢产物含量低,难以大量生产^[2]。而植物组织、细胞和器官培养技术可在离体培养的微环境中控制植物成分的生长和生产。这个过程可以通过调节各种生长参数和因素来实现,从而使生产最优化,不受地理或季节变化的影响,降低了生产成本。据统计,近1 000种药用植物的离体培养技术获得了成功,提供了600多种次生代谢产物,其中有些药用植物次生代谢产物含量大于或等于原植物的含量,并且人参皂苷、紫杉醇、青蒿素等的离体培养生产已经达到了工业化水平^[3]。目前,为了大量地生产次级代谢产物,细胞、不定根、毛状根已经成功地应用于大规模培养。例如,人参(*Panax ginseng*)不定根培养已经达到30 000 L,金丝桃(*Hypericum aviculariifolium*)不定根已经达到500 L,紫锥菊(*Echinacea purpurea*)不定根已经达到1 000 L^[4]。有的公司每年生产40~45吨人参不定根,形成一个利用植物组织培养生产药品、食品和化妆品的成功范例^[5]。我国某公司通过植物细胞技术已经筛

选出顶级的天山雪莲(*Saussurea involucrata*)培养物,实现雪莲培养物的工业化生产,年产量达5 000公斤。运用植物组织培养技术规模化合成中药重要活性物质,解决天然中药材来源与提高药用成分含量,属于生物医药中的中药现代化领域,其产品不仅可广泛用于医药、食品、化妆品、护理品,还有助于解决中药资源的可持续标准化供应问题;带动相关制药工业和制药装备工业的发展;有利于维护生态平衡,保护自然环境;避免人工种植中药材的物种退化;同时符合国家战略规划,有助于实现中药材产业现代化。

2 影响药用植物组织培养生产次生代谢产物的因素

2.1 外植体的选择

能够发生次生代谢的细胞株往往来自适当生理状态下的外植体^[6]。通常,不同植物或器官所含有的次生代谢产物的含量和种类不同。一般由次生代谢活动旺盛的植物或器官诱导出的愈伤组织中的次生代谢产物含量较高^[7]。对从野生葡萄(*Vitis vinifera*)不同器官培养获得的愈伤组织细胞培养物进行研究,结果发现茎诱导的愈伤组织中苯丙氨酸解氨酶和苯乙烯合成酶基因表达量比叶和叶柄诱导的愈伤组织中的要高^[8]。有研究学者对姜黄(*Curcuma longa*)进行研究,分别用叶鞘、叶片、叶基部、顶端芽和侧芽诱导培养愈伤组织,6次继代培养后,以侧芽为外植体的愈伤组织中姜黄素和总酚的含量明显高于其他愈伤组织^[9]。用荷包牡丹(*Lamprocapnos spectabilis*)的叶片、叶柄和节间外植体进行愈伤组织诱导,发现外植体类型对愈伤组织中花青素和多酚有显著影响,叶柄愈伤组织和节间愈伤组织的花青素含量和多酚含量高于全叶愈伤组织的花青素含量和多酚含量^[10]。有研究表明,与由花诱导的愈伤组织相比,由蔷薇(*Rosa gallica*)叶片和茎诱导的愈伤组织的花青素和叶绿素产量最高^[11]。有研究表明外植体类型会影响凤仙花(*Impatiens balsamina*)根培养物中的萘醌产量,由叶外植体培养产生的萘醌总量高于由根外植体培养产生的萘醌总量^[12]。因此,利用植物组织培养技术生产次生代谢物时,选择生长快速且具有较高次生代谢物合成能力的外植体非常重要。

2.2 培养基的成分

2.2.1 碳源

糖在培养基中的类型和浓度是影响次生代谢产物生物合成的重要因素。植物组织培养通常使用葡

葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖等作为能量和碳源进行异养生长。相比于果糖和葡萄糖,蔗糖被发现是诱导马来沉香(*Aquilaria malaccensis*)愈伤组织产生最高生物量的最有效碳源;浓度为15 g/L的蔗糖显著诱导愈伤组织增殖,产生的生物量高于葡萄糖的1.2倍,高于果糖的2倍^[13]。研究蔗糖浓度对三七(*Panax notoginseng*)不定根培养过程中三种人参皂苷(Rg1、Re和Rb1)积累的影响,结果发现在30 g/L蔗糖处理下,三种人参皂苷含量最高^[14]。苦艾(*Artemisia absinthium*)细胞悬浮培养中,在最大生物量和次生代谢产物积累方面,双糖(蔗糖和麦芽糖)处理优于单糖(果糖和葡萄糖)处理;在蔗糖和麦芽糖处理下,生物量最大,总酚和总黄酮生物合成含量最高^[15]。有研究发现,当蔗糖浓度高于5%时,可抑制刺参(*Oplopanax elatus* Nakai)不定根中酚类化合物的积累,这表明高浓度蔗糖引起的高渗透胁迫对刺参体内总酚的积累产生了不利影响^[16]。用不同浓度的蔗糖对龙葵(*Solanum nigrum*)愈伤组织进行培养,发现随着培养基中蔗糖含量的增加,愈伤组织中龙葵碱含量显著增加^[17]。用不同浓度的蔗糖对夏枯草(*Prunella vulgaris*)悬浮细胞分别进行培养,结果发现在20~25 g/L蔗糖处理下,生物量、酚类物质、黄酮类物质、蛋白质含量和抗氧化活性均达到最大值^[18]。用不同水平的果糖、半乳糖、葡萄糖和蔗糖为碳源培养山茱萸(*Anisodus acutangulus*)毛状根时,发现用蔗糖含量为3%的培养基培养的毛状根生物碱含量最高^[19]。从上述可知,植物的生长和次生代谢物合成与碳源有关,要促进次生代谢产物积累,碳源的组成和浓度都是要考虑的重要影响因素。

2.2.2 氮源

氮源是植物正常生长的必要条件,不同 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比值的氮源对植物的生长和代谢有显著的影响,且单独以硝酸盐或铵盐为氮源,都不利于植物的生长和代谢。有研究分析了MS培养基中不同浓度的总氮对野生秋葵(*Abelmoschus esculentus*)愈伤组织中花青素的影响,发现在中氮水平培养基中,花青素积累增强,而高氮水平和低氮水平培养基中,花青素产量下降^[20]。在金铁锁(*Psammosilene tunicoides*)毛状根悬浮培养中,当培养基中 NH_4^+ 与 NO_3^- 的浓度比为1:2时,毛状根生物量和总皂苷的收获量都达到最高值^[21]。研究发现,硝态氮和铵态氮比例为5:1时,甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)细胞获最大生物量,以铵态氮为氮源,黄酮类物质积累量最高^[22]。为优化雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)毛状根的生物量和生产雷公藤碱乙和雷公藤次碱的培养基,研究

表明,10:50($\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$)处理的毛状根生物量最大,雷公藤碱乙和雷公藤次碱产量最大;虽然在50:10($\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$)浓度处理下,雷公藤碱乙和雷公藤次碱的含量最高,但是50:10($\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$)的生物量显著低于10:50($\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$)处理的生物量,导致雷公藤碱乙和雷公藤次碱的产量显著低于10:50($\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$)处理的;从而得出10:50($\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$)对雷公藤毛状根生长和生物碱积累最适宜^[23]。研究氮对甜叶菊(*Stevia rebaudiana*)次生代谢产物的影响,结果表明,高水平的氮导致莱鲍迪糖苷A的含量减少,在2.5~3.5倍氮培养基上生长的植株的莱鲍迪糖苷A水平显著降低,这与培养基中的氮供应呈负相关^[24];对照组中莱鲍迪糖苷A和甜菊糖苷含量均最高;然而,甜菊糖醇含量被发现与生长培养基中氮水平的增加呈正相关。从这些研究可知,选择合适的氮源有利于次生代谢产物的积累。

2.2.3 磷源

磷源是一种重要的营养物质,参与代谢产物的形成、能量代谢和生物合成。将甘草不定根接种于添加不同浓度磷酸盐的1/2 MS培养基中培养^[25],结果表明,在1.25 mmol/L磷酸盐处理下,多糖(15.66 mg/g)含量达到最大值;0.625 mmol/L磷酸处理的黄酮类化合物(7.54 mg/g)和甘草酸(0.57 mg/g)积累量最高;甘草次酸(0.32 mg/g)积累的最适磷酸盐浓度为0.312 5 mmol/L。在长春花(*Catharanthus roseus*)细胞悬浮培养中,添加不同水平的磷酸氢二铵和磷酸二氢铵,总氮($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$)和磷酸盐的增加会促进生物碱生物合成的增强^[26]。在太子参(*Pseudostellaria heterophylla*)不定根培养中,低磷酸盐浓度有利于生物量的产生,而高磷酸盐浓度则能显著提高太子参不定根培养中多糖的含量^[27]。在培养西洋参(*Panax quinquefolius*)毛状根的B-5培养基中添加0.83 mmol/L磷酸盐,6种人参皂苷(Rb1、Rb2、Rc、Rd、Re和Rg1)的总含量达到最大值,与对照组相比,人参皂苷的含量增加了20%^[28]。在人参的不定根培养中发现,当磷酸盐浓度为0.625 mmol/L时,根生长率达到峰值,然而当磷酸盐浓度为1.25 mmol/L时,人参皂苷含量达到最大值^[29]。这些结果说明,磷源对次生代谢产物的积累也起着重要的作用,不同植物的次生代谢产物积累所需要的磷浓度不同。

2.3 培养条件

2.3.1 光照

光是直接影响植物发育过程和次生代谢产物生物合成的关键诱导子之一。不同的光照强度、光质、

光周期会影响药用植物次生代谢产物的积累。珙菲亚(*Pfaffia glomerata*)在三种不同比例的红色(R)和蓝色(B)灯光下体外培养:(i)1R:1B,(ii)1R:3B,(iii)3R:1B;红光和蓝光配比相同(1R:1B)可增加生物量积累、花青素含量和20-羟基蜕皮激素产量(提高30%~40%)^[30]。分别在100%红、100%蓝、100%绿、RGB(40%红:40%绿:20%蓝)和100%白(对照)光照条件下培养红景天(*Rhodiola imbricata*)愈伤组织,结果表明,与其他光照条件相比,蓝光处理愈伤组织培养的红景天苷、总酚和总黄酮积累量最大^[31]。研究不同光谱光对罗勒(*Ocimum basilicum*)愈伤组织中苯丙烷代谢产物生物合成的影响,与对照组相比,蓝光处理下的生物量积累、总酚含量、总黄酮含量以及抗氧化剂DPPH、FRAP和ABTS的活性最大^[32]。分别在光照和黑暗条件下进行紫草(*Arnebia euchroma*)细胞的悬浮培养,观察光照对萘醌色素合成的影响,发现在光照条件下,直到培养第4天,萘醌色素含量都有所增加,但随着培养时间的延长,在光照条件下萘醌色素含量降低,而在黑暗条件下萘醌色素含量继续增加^[33]。用不同的光培养催眠睡茄(*Withania somnifera*)愈伤组织,发现紫光条件有利于愈伤组织中酚类化合物和黄酮类化合物的合成;红光处理下愈伤组织中生物量积累效果最好,以及绿原酸和醉茄素A含量显著增加^[34]。这些研究表明,不同的药用植物有各自的最佳光照条件,适当调整光照质量和光照量可以提高次生代谢产物的产量。

2.3.2 温度

药用植物离体培养温度一般为20~28℃,通常控制在25℃左右。温度不仅影响植物生长,还控制产物合成途径相关酶的活性,从而影响次生代谢产物的积累。在三分三(*Anisodus acutangulus*)毛状根培养中,当温度为25℃时毛状根的生物量和莨菪碱含量最高,低于25℃和超过30℃时毛状根生物量和莨菪碱含量显著下降^[35]。山羊豆(*Galega officinalis*)愈伤组织培养时,用四种不同温度(4℃、22℃、35℃和45℃)处理后,发现4℃处理下木质素、染料木素、对香豆酸、柚皮苷、芹菜素、反式阿魏酸、水杨酸和芦丁含量最高^[36]。用不同温度培养人参不定根,结果表明,人参总皂苷在25℃培养时含量最高;此外,研究还表明,低温刺激可促进人参皂苷的积累,10℃环境下处理7d,然后转移到25℃处理28d时,人参总皂苷含量较25℃处理增加了2.53倍^[37]。在翅萼石斛(*Dendrobium cariniferum*)体外培养中,当培养温度为(23±2)℃时,生物量积累最高,然而幼苗的

生长消耗了营养,导致生物活性化合物的积累很少;当培养温度为(25±2)℃时,虽然幼苗生长较慢,但此时多糖和生物碱积累量较其他培养温度最高^[38]。研究不同温度对水飞蓟(*Silybum marianum*)毛状根培养物生物量和水飞蓟素的影响^[39],结果表明,25℃/25℃培养下毛状根水飞蓟素产量(0.18 mg/g DW)高于15℃/20℃和30℃/25℃培养下水飞蓟素产量(分别为0.13和0.12 mg/g DW)。不同植物的最适温度不同,因此选择适宜的温度对药用植物次生代谢产物的合成十分重要。

2.3.3 pH值

培养基的pH值对植物生长和次生代谢产物积累有显著影响。植物生长直接受培养基营养成分的影响,但营养的吸收主要受培养基pH的影响。pH的变化会影响培养基成分的状态,从而影响次生代谢产物的积累。不同植物的高效生长、发育和次生代谢产物的产生都需要特定的pH值。对鬼臼(*Podophyllum hexandrum* Royle)不定根培养进行了不同pH处理的试验^[40],结果表明,当初始培养基pH为6时,鬼臼不定根培养过程中生物量和鬼臼毒素积累量最高。培养液中不同pH对铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)原球茎生物量及有效物质含量有影响,当培养液pH为5.8时,原球茎生长最好,且多糖和生物碱生产量达到最高^[41]。在睡茄(*Withania somnifera*)细胞培养中,高pH和低pH培养基都不能刺激生物量和睡茄内酯A的产生^[42],但在芽培养中,初始pH为4.5的培养基最适合生物量和苦艾素A的产生^[43]。研究发现在甜叶菊(*Stevia rebaudiana*)不定根培养中,较低的pH水平(pH=5.1)促进甜菊糖苷和莱鲍迪苷A的合成,但多酚类物质的产量减少;当pH为5.8时,杜克苷含量较高^[44]。研究pH对灰毡毛忍冬(*Lonicera macranthoids*)细胞悬浮培养物产量和绿原酸的影响^[45],发现培养基pH为5.5和6.0时生物量最高,分别为6.52 g/L和6.76 g/L,此时绿原酸含量最高。因此,调整pH值是提高次生代谢产物含量的一种有效方法。

2.4 植物生长调节剂

在植物组织培养中,植物生长调节剂不仅控制植物抗氧化潜能、基本生长和发育过程,而且还调控植物次生代谢产物的合成。在鬼臼不定根培养基中添加不同浓度的生长素,当IBA浓度为3 mg/L时,培养8周后鬼臼毒素积累量最高(4.1 mg/g DW)^[40]。研究植物生长调节剂对染料木(*Genista tinctoria*)愈伤组织异黄酮积累的影响^[46],发现在细胞分裂素组合

中,0.5 mg/L KIN与5.0 mg/L 2,4-D联合使用时,异黄酮含量最高(6 436.26 mg/100 g DW);在生长素组合中,0.5 mg/L TIBA与5.0 mg/L KIN联合使用时,异黄酮含量最高(10 474.23 mg/100 g DW),这是高等植物愈伤组织中异黄酮代谢产物含量最高的组合。组织培养狭叶香科(*Teucrium polium*)中的总黄酮含量取决于植物再生过程中使用的植物生长调节剂的类型;在添加0.5 mg/L TDZ的培养基上,黄酮类化合物含量最高,是对照植株的2.65倍;在添加较高浓度的细胞分裂素(2.0 mg/L KIN或BAP)的培养基上培养的狭叶香科中的黄酮类化合物水平较低^[47]。研究发现使用浓度为5 μ mol/L的细胞分裂素-生长素时,小石松(*Lycopodiella inundata*)愈伤组织生长良好,生物碱含量约为1%,而整个植株的生物碱含量在0.16%的范围内;使用2,4-D对其生物碱和愈伤组织生长速度均有显著的负向影响^[48]。在海冬青(*Eryngium maritimum*)不定根培养中,与无激素培养基相比,添加生长素的培养基中海冬青不定根的酚酸和三萜皂苷含量分别增加了84~227倍和8~16倍^[49]。利用墨旱莲(*Eclipta prostrata*)茎和叶外植体在含有不同浓度的TDZ、BAP或NAA的MS培养基上培养愈伤组织,结果表明,在MS+TDZ培养基上培养的愈伤组织的总类黄酮含量和总酚含量最高^[50]。可见植物生长调节剂的种类和浓度对植物生长和产物合成有显著影响,添加合适的植物生长调节剂对植物生长以及产物合成十分关键。

2.5 培养方法

2.5.1 两阶段培养

两阶段培养法是指第一步主要使用适合细胞生长的培养基即生长培养基,第二步使用适合次级代谢产物积累的培养基即生产培养基。由于细胞生长和次生代谢物产生对培养基和培养条件的要求不同,一般采用两阶段培养法来提高生物量和次生代谢产物。在研究长春花(*Catharanthus roseus*)摇瓶悬浮液生产吲哚生物碱时,使用两种方式进行培养,一种方式直接放置于生长培养基中培养,另外一种方式采用两阶段培养技术进行培养,两种培养体系可产生高达20 g/L DW的生物量;但两阶段培养技术产生的细胞活性更高,吲哚生物碱产量比另外一种培养方式高10倍,且产物显著释放到培养基中^[51]。研究发现明党参(*Changium smyrnioides*)悬浮细胞采用两阶段培养后的第20 d,生物量的积累达到最大值,比只使用MS培养基的细胞数目提高了12.6%,第24 d总香豆素积累量达到最大值0.288 2 mg/L,比只使用White培养基的提高了

60.7%,细胞中佛手酚、佛手柑内酯含量达到了1.79%、0.36%,比一步法提高了1.75倍和2.86%^[52]。采用两阶段培养体系进行巴戟天(*Morinda coreia*)不定根培养,首先在添加1.0 mg/L IBA的液体培养基中增殖巴戟天不定根,然后把这些不定根转到两阶段培养体系,在不含IBA的液体培养基中培养,结果发现,蒽醌类化合物的产量是体内培养的4.09倍^[53]。两阶段培养法使细胞生长和代谢均能在适合条件下进行,较好地解决了细胞生物量增殖与次生代谢产物积累之间的矛盾,是促进次生代谢产物合成的一种较好的方法。

2.5.2 两相培养

两相培养技术是在培养体系中加入水溶性或脂溶性的有机物或者具有吸附作用的多聚化合物,使培养体系形成上、下两相;细胞在水相中生长,合成的次生代谢物质分泌出来后转移至有机相中。由于植物次生代谢产物在培养的植物细胞中合成和储存的位置不同,在细胞培养中的次生代谢产物含量低可能是由于反馈抑制、在培养基中合成产物被酶或非酶降解或可能产生的代谢物具有挥发性。因此,在液体培养基中添加液体或第二固相的人工堆积生产位点可以提高净生产率^[54]。两相共培养利用分配系统将培养基中的分泌产物重新分配到第二个非极性阶段,有效避免反馈抑制效应,在细胞、组织或器官培养生产次生代谢产物方面具有重要应用价值。采用两相培养法进行夏雪片莲(*Leucojum aestivum*)芽培养,胞内加兰他敏积累量是对照的1.7倍,胞外加兰他敏积累量是对照的1.9倍^[55]。采用固液两相培养技术对紫草(*Arnebia euchroma*)细胞进行了培养,其中固相为聚氨酯泡沫,实验中加入聚氨酯泡沫后紫草色素的合成及分泌提高了3倍多^[56]。以雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)不定根为材料,通过两相培养技术,研究有机溶剂邻苯二甲酸二丁酯(DBP)不同浓度及培养时间对雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的影响,结果显示,DBP浓度为6%、培养至第6 d时,不定根增长量为对照的1.06倍;DBP浓度为2%、培养至第8 d时,内酯醇含量达74.96 μ g/g,为对照组(53.67 μ g/g)的1.40倍^[57]。两相共培养还包括共培养不同物种的细胞、组织或器官,以提高代谢物的含量。采用添加吲哚-3-丁酸(25 μ mol/L)和蔗糖(50 g/L)的MS培养基,在容量为5 L的生物反应器中以不同比例共培养人参和松果菊(*Echianacea purpurea*)不定根,在25℃的黑暗条件下培养40 d,茉莉酸甲酯诱导30 d,当人参对松果菊的接种密度较高时,可促进人参皂苷和咖啡酸衍生物

的合成^[58]。两相培养技术是促进次生代谢产物合成的一条有效途径,在这一方面具有很好的研究前景。

3 调控药用植物组织培养生产次生代谢产物的途径

3.1 诱导子的应用

植物次生代谢产物是植物细胞在体内生长过程中对环境干扰的反应而产生的,是对入侵病原菌诱导子的防御反应。因此,越来越多人使用化合物来触发培养的植物细胞、组织或器官的防御反应,以提高体外培养中生物活性化合物的产量。这些诱导子可以是生物或非生物的,可能包括信号分子(如茉莉酸甲酯、水杨酸)、微生物细胞壁提取物(如酵母提取物、壳聚糖)、无机盐、重金属甚至物理制剂(如紫外线辐射)等^[59]。这为提高植物体外培养产量提供了另一种途径,并在许多细胞、组织和器官培养系统中取得了成功。在西洋参(*Panax quinquefolius*)悬浮培养中,使用一种非生物诱导子硝酸钴,使人参皂苷产量比对照增加两倍^[60]。研究生物诱导子粉红粘帚霉发酵液、茉莉酸甲酯和冠菌素对桃儿七(*Sinopodophyllum hexandrum*)不定根鬼臼毒素积累的影响^[61],结果表明,粉红粘帚霉发酵液、茉莉酸甲酯和冠菌素都能显著地促进不定根鬼臼毒素的积累。在八角莲(*Dysosma versipellis*)离体培养中使用真菌诱导子,经过3周的培养,内生真菌诱导子能提高八角莲离体根中鬼臼毒素的含量^[62]。在瓜叶栝楼(*Trichosanthes cucumerina*)细胞悬浮培养中,用200 $\mu\text{mol/L}$ 的茉莉酸甲酯诱导子处理6 d后可以生产更多的泻根醇酸,约为相应的对照组的两倍;而用1 mg/mL的壳聚糖诱导子处理8 d后泻根醇酸水平增加到几乎比对照组高出两倍的水平^[63]。对蛇根草(*Ophiorrhiza mungos*)进行悬浮培养时,当用酵母提取物和硝酸银作为诱导剂时,喜树碱的产量分别增加了13.3倍和8.7倍^[64]。可见使用适宜的诱导子对植物次生代谢产物的合成有一定的促进作用。

3.2 添加前体物

提高体外次级代谢产物产量的一个重要障碍是初级底物水平低,这可以通过前体饲喂来解决。外源应用前体物可以提高次生代谢产物的合成,基于理念:任何在次生代谢产物生物合成途径中是起始物或中间体的化合物,都有望促进次生代谢产物的合成^[65]。研究发现,投喂石蒜科生物碱前体4'-O-甲基降孤挺花啉显著提高了水仙(*Narcissus tazetta*)鳞茎中加兰他敏和石蒜碱的积累^[66]。有研究发现L-酪氨酸会影响菜豆(*Phaseolus vulgaris*)愈伤组织中

L-DOPA的积累,在所有测试浓度下,L-酪氨酸从第3天到第12天都提高了L-DOPA的含量;到第12天,L-DOPA浓度达到最大值200 mg/L,增加了17.75倍;结果表明,L-酪氨酸可作为合成L-DOPA的天然有效前体^[67]。在北美圆柏(*Juniperus virginiana*)愈伤组织和悬浮培养中添加前体物苯丙氨酸,愈伤组织在添加10 mmol/L苯丙氨酸处理21 d后,对鬼臼毒素的产量影响最大,鬼臼毒素含量为0.15 mg/g DW,比对照高400%左右;新衍生的悬浮培养物(第4代)在添加1 mmol/L苯丙氨酸后,鬼臼毒素在14 d后含量最高(0.48 mg/g DW),这比对照高出243%^[68]。在积雪草(*Centella asiatica*)毛状根培养中,分别使用不同浓度的角鲨烯和丙酮酸前体物,发现角鲨烯和丙酮酸前体物能促进积雪草毛状根三萜类化合物的积累^[69]。为提高肉桂三萜的含量,将角鲨烯、胆固醇和甾体酚等外源性甾醇饲喂肉桂(*Cinnamomum cassia*)的培养物,发现高剂量的甾体酚饲喂可促进三萜的产量增加^[70]。这些研究表明,添加前体物对次生代谢产物的合成具有积极的促进作用。

3.3 添加抑制剂

添加代谢抑制剂可抑制旁路代谢和切断其他非目标代谢物的合成途径,改变细胞中代谢物的方向,从而促进目标化合物的合成。在红豆杉(*Taxus cuspidata*)悬浮细胞培养中,分别添加洛伐它汀(甲羟戊酸途径抑制剂)和磷甘霉素(非甲羟戊酸途径抑制剂)进行处理,发现两种抑制剂对紫杉醇的积累都有促进作用,而磷甘霉素作用较大^[71]。在东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)悬浮细胞培养中,分别添加赤霉素和肉桂酸代谢抑制剂,发现两种代谢抑制剂对紫杉醇的生物合成都有促进作用,随着浓度的增加,紫杉醇单位产量先增加,然后达到最大值,然后略有下降,这是由于抑制了与紫杉醇合成无关的分支途径,所以反应倾向于紫杉醇合成的方向^[72]。在海南粗榧(*Cephalotaxus mannii*)悬浮培养第15日,添加30 mg/L丙氨酸(糖酵解途径中重要的限速酶丙酮酸激酶的抑制剂)时,对海南粗榧三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱的积累都有一定的促进作用,产物含量最高,为对照组的1.7倍^[73]。在嘉兰(*Gloriosa superba*)细胞悬浮培养中,分别添加不同剂量的乙烯抑制剂AgNO₃、AgNO₃处理的细胞悬浮培养物在培养15天和30天内,秋水仙碱和硫秋水仙苷生物合成含量均有所提高^[74]。可见使用抑制剂是提高次生代谢产物含量的一种有效手段。

3.4 基因工程技术的应用

随着分子生物技术的发展,利用基因工程手段来提高药用植物次生代谢产物的生物合成含量,已经成为目前药用植物次生代谢研究的热点。基因工程技术是对次生代谢途径进行修饰、调控甚至改变,以期促进次生代谢产物的积累。常用的调控手段有关键酶基因的超表达和支路途径的RNA干扰或者基因敲除等^[75]。利用含有pCAM:2×35S:gusA的工程化农杆菌(*Agrobacterium* sp.)LBA1334进行蟛蜞菊(*Sphagnetica calendulacea*)的转基因毛状根培养,发现转基因毛状根积累了422.01 μg/g DW的蟛蜞菊内酯,分别是体内培养(294.44 μg/g DW)和试管苗(308.28 μg/g DW)的1.43倍和1.37倍^[76]。芪合酶是何首乌(*Fallopia multiflora*)二苯乙烯苷合成途径的关键酶,研究发现将含有芪合酶基因的过表达载体和RNA干扰载体导入野生型发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)ATCC15834中,转化何首乌外植体诱导生成毛状根后,芪合酶过表达组的二苯乙烯苷含量是空白组的2.41倍,而RNA干扰组的二苯乙烯苷合成明显减少^[77]。利用发根农杆菌介导的转化技术,对红车轴草(*Trifolium pratense*)进行毛状根诱导,生长迅速的转基因毛状根系2364A中4种重要的异黄酮,大豆黄酮、染料木素、刺芒柄花素和鹰嘴豆芽素A的积累量显著增加,其中三种异黄酮的浓度均高于对照植株^[78]。有学者建立了过表达EbCHI的灯盏花(*Erigeron breviscapus*)毛状根培养,过表达EbCHI显著增加了转基因毛状根中灯盏花素的积累,其最高含量为2.21 mg/g DW,是天然根(0.21 mg/g DW)的10倍^[79]。共同引入关键基因DXS(编码MEP途径中的关键酶1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶)和GGPPS(编码通路中的香叶基香叶基二磷酸合酶),转基因丹参(*Salvia miltiorrhiza*)毛状根的丹参酮含量高达12.93 mg/g DW,而对照的丹参酮含量为0.61 mg/g DW^[80]。随着基因工程技术的研究深入,基因工程技术将在提高次生代谢产物含量方面发挥着重要作用。

4 展 望

近几十年来,药用植物离体培养技术发展迅速,成为解决珍稀药用植物资源短缺的有效手段。但是很多药用植物组织和细胞的次生代谢产物含量少于原植物,没有达到预期的目的,而且成本较高。展望未来,药用植物次生代谢产物的生产要想实现工业化发展,应从以下几个方面着手:(1)阐明特定生产策略中涉及的信号转导途径,以提高生物量和

分子的生物合成;(2)调控生产的控制因素和机制,包括基因操作以提高生产;(3)克隆参与生物合成的基因及其修饰设计目标分子的代谢通量;(4)分析代谢通量和中间体,以了解它们的生物合成途径和调控。随着科学技术的进一步发展,相信在不久的将来,药用植物次生代谢产物的工业化生产体系会变得更加成熟,为人们的健康和治疗疾病提供丰富的原料资源。

参考文献

- [1] 陈红. 植物组织培养技术的现状及发展趋势[J]. 生物化工, 2018, 4(5): 137-139.
Chen H. Present situation and development trend of plant tissue culture technology [J]. Biol Chem Eng, 2018, 4(5): 137-139.
- [2] 杜尚广, 盛文涛. 影响植物组织培养生产次生代谢产物的因素[J]. 园艺与种苗, 2018, 38(11): 30-33, 43.
Du S G, Sheng W T. Influencing factors of the production of secondary metabolites in plant tissue culture [J]. Horti Seed, 2018, 38(11): 30-33, 43.
- [3] 李永成, 蒋志国. 药用植物的细胞悬浮培养技术与应用[J]. 生物技术通讯, 2015, 26(2): 271.
Li Y C, Jiang Z G. Cell suspension culture of medicinal plants and its application [J]. Lett Biotechnol, 2015, 26(2): 271.
- [4] Paek K Y, Murthy H N, Zhong J J. Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology [M]. Netherlands: Springer, 2014.
- [5] 王娟, 李金鑫, 李建丽, 等. 植物组织培养技术在中药资源中的应用[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(12): 2236-2246.
Wang J, Li J X, Li J L, et al. Application of plant tissue culture in field of Chinese medicine resources [J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42(12): 2236-2246.
- [6] 刘谦, 张永清. 利用药用植物组织培养生产次生代谢产物的研究进展[J]. 齐鲁药事, 2006, 25(6): 350-353.
Liu Q, Zhang Y Q. Research progress of using tissue culture to produce secondary metabolite of medicinal plant [J]. Qilu Pharm Aff, 2006, 25(6): 350-353.
- [7] 李琰, 董娟娥, 姜在民, 等. 杜仲愈伤组织中次生代谢产物积累动态研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(11): 2033-2037.
Li Y, Dong J E, Jiang Z M, et al. Study on dynamic accumulation of secondary metabolites in callus of *Eucommia ulmoides* [J]. Acta Bot Boreali Occidentalia Sin, 2004, 24(11): 2033-2037.
- [8] Tyunin A P, Suprun A R, Nityagovsky N N, et al. The effect of explant origin and collection season on stil-

- bene biosynthesis in cell cultures of *Vitis amurens* Rupr [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC, 2019, 136(1): 189-196.
- [9] Gurav S S, Gurav N S, Patil A T, *et al.* Effect of explant source, culture media, and growth regulators on callogenesis and expression of secondary metabolites of *Curcuma longa* [J]. J Herbs Spices Med Plants, 2020, 26(2): 172-190.
- [10] Kulus D, Tymoszuk A. Induction of callogenesis, organogenesis, and embryogenesis in non-meristematic explants of bleeding heart and evaluation of chemical diversity of key metabolites from callus [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(16): 5826.
- [11] Tarrahi R, Rezanejad F. Callogenesis and production of anthocyanin and chlorophyll in callus cultures of vegetative and floral explants in *Rosa gallica* and *Rosa hybrida* (Rosaceae) [J]. Turkish Journal of Botany, 2013, 37(6): 1145-1154.
- [12] Sakunphueak A, Panichayupakaranant P. Effects of donor plants and plant growth regulators on naphthoquinone production in root cultures of *Impatiens balsamina* [J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2010, 102(1): 9-15.
- [13] Jayaraman S, Daud N H, Halis R, *et al.* Effects of plant growth regulators, carbon sources and pH values on callus induction in *Aquilaria malaccensis* leaf explants and characteristics of the resultant calli [J]. J For Res, 2014, 25(3): 535-540.
- [14] Zhao Y, Guo W H, Sun X Y, *et al.* A culture system for the stable and high-efficiency proliferation of adventitious roots of *Panax notoginseng* and ginsenoside accumulation [J]. Ind Crops Prod, 2020, 157: 112882.
- [15] Ali M, Abbasi B H, Ahmad N, *et al.* Sucrose-enhanced biosynthesis of medicinally important antioxidant secondary metabolites in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2016, 39(12): 1945-1954.
- [16] Ghimire B K, Kim H Y, Seong E S, *et al.* Establishment of culturing conditions and assessment of antioxidant activity and somaclonal variation in the adventitious root suspension cultures of *Oplopanax elatus* Nakai [J]. Acta Physiol Plant, 2018, 40(3): 1-19.
- [17] Mu, Al-Kiyyam A, Shibli R A, *et al.* Improving solanine production in in vitro cultures of *Solanum nigrum* L. using different chemical and physical factors [J]. J Agr & Mar Sci, 2020, 24(6): 51-62.
- [18] Fazal H, Abbasi B H, Ahmad N, *et al.* Sucrose-induced osmotic stress and photoperiod regimes enhanced the biomass and production of antioxidant secondary metabolites in shake-flask suspension cultures of *Prunella vulgaris* L. [J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2016, 124(3): 573-581.
- [19] Liu Q, Cui L, Guo Y, *et al.* Optimization of nutritive factors in culture media for growth and tropane alkaloid production from *Anisodus acutangulus* hairy roots [J]. J Appl Pharm Sci, 2013, 3(1): 1-4.
- [20] Irshad M, Debnath B, Mitra S, *et al.* Accumulation of anthocyanin in callus cultures of red-pod okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Hongjiao] in response to light and nitrogen levels [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC, 2018, 134(1): 29-39.
- [21] 刘军, 陈显化, 金朝霞, 等. 氮源和磷源对金铁锁毛状根悬浮培养的影响 [J]. 大连工业大学学报, 2013, 32(6): 409-412.
- Liu J, Chen X H, Jin Z X, *et al.* Effects of N and P sources on suspension culture of *Psammosilene tunicoides* hairy roots [J]. J Dalian Polytech Univ, 2013, 32(6): 409-412.
- [22] 高艳丽, 高山林, 焦小珂, 等. 培养基中氮源对胀果甘草细胞悬浮培养生产黄酮类化合物的影响 [J]. 海峡药学, 2008, 20(10): 136-139.
- Gao Y L, Gao S L, Jiao X K, *et al.* Effect of nitrogen source on the production of flavonoids by suspension cell culture of *Glycyrrhiza inflata* Batal [J]. Strait Pharm J, 2008, 20(10): 136-139.
- [23] Zhang B, Chen M M, Pu S, *et al.* Identification of secondary metabolites in *Tripterygium wilfordii* hairy roots and culture optimization for enhancing wilforine and wilforine production [J]. Ind Crops Prod, 2020, 148: 112276.
- [24] Magangana T P, Stander M A, Makunga N P. Effect of nitrogen and phosphate on *in vitro* growth and metabolite profiles of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae) [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC, 2018, 134(1): 141-151.
- [25] Yin S S, Zhang Y, Gao W Y, *et al.* Effects of nitrogen source and phosphate concentration on biomass and metabolites accumulation in adventitious root culture of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. Acta Physiol Plant, 2014, 36(4): 915-921.
- [26] Mishra M R, Srivastava R K, Akhtar N. Effect of nitrogen, phosphorus and medium pH to enhance alkaloid production from *Catharanthus roseus* cell suspension culture [J]. International Journal of Secondary Metabolite, 2019, 6(2): 137-153.
- [27] Yin S S, Gao W Y, Liang Y Y, *et al.* Influence of sucrose concentration and phosphate source on biomass and metabolite accumulation in adventitious roots of *Pseudostellaria heterophylla* [J]. Acta Physiol Plant,

- 2013, 35(5): 1579-1585.
- [28] Kochan E, Szymczyk P, Kuźma Ł, *et al.* Nitrogen and phosphorus as the factors affecting ginsenoside production in hairy root cultures of *Panax quinquefolium* cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactor [J]. Acta Physiol Plant, 2016, 38(6): 1-13.
- [29] Huang T, Gao W Y, Wang J, *et al.* Selection and optimization of a high-producing tissue culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. Acta Physiol Plant, 2010, 32(4): 765-772.
- [30] Silva T D, Batista D S, Fortini E A, *et al.* Blue and red light affects morphogenesis and 20-hydroxyecdysone content of *in vitro* *Pfaffia glomerata* accessions [J]. J Photochem Photobiol B Biol, 2020, 203: 111761.
- [31] Kapoor S, Raghuvanshi R, Bhardwaj P, *et al.* Influence of light quality on growth, secondary metabolites production and antioxidant activity in callus culture of *Rhodiola imbricata* Edgew [J]. J Photochem Photobiol B Biol, 2018, 183: 258-265.
- [32] Nazir M, Ullah M A, Younas M, *et al.* Light-mediated biosynthesis of phenylpropanoid metabolites and antioxidant potential in callus cultures of purple basil (*Ocimum basilicum* L. var *purpurascens*) [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC, 2020, 142(1): 107-120.
- [33] Gupta K, Garg S, Singh J, *et al.* Enhanced production of naphthoquinone metabolite (shikonin) from cell suspension culture of *Arnebia* sp. and its up-scaling through bioreactor [J]. 3 Biotech, 2014, 4(3): 263-273.
- [34] Adil M, Haider Abbasi B, Ul Haq I. Red light controlled callus morphogenetic patterns and secondary metabolites production in *Withania somnifera* L. [J]. Bio-technol Rep Amsterdam Neth, 2019, 24: e00380.
- [35] 曹然, 张明生, 刘诗雅, 等. 不同理化因子对三分三毛状根生长及其莨菪碱含量的影响[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(2): 195-201.
- Cao R, Zhang M S, Liu S Y, *et al.* The influence of physical and chemical factors on the growth and hyoscyamine production in hairy root cultures of *Anisodus acutangulus* [J]. J Agric Biotechnol, 2014, 22(2): 195-201.
- [36] Karakas F P, Bozat B G. Fluctuation in secondary metabolite production and antioxidant defense enzymes in *in vitro* callus cultures of goat's rue (*Galega officinalis*) under different abiotic stress treatments [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC, 2020, 142(2): 401-414.
- [37] Wang S H, Liang W X, Yao L, *et al.* Effect of temperature on morphology, ginsenosides biosynthesis, functional genes, and transcriptional factors expression in *Panax ginseng* adventitious roots [J]. J Food Biochem, 2019, 43(4): e12794.
- [38] Lin W, Wang J J, Xu X M, *et al.* Rapid propagation *in vitro* and accumulation of active substances of endangered *Dendrobium cariniferum* Rehb. F [J]. Bioengineered, 2020, 11(1): 386-396.
- [39] Rahimi S, Hasanloo T. The effect of temperature and pH on biomass and bioactive compound production in *Silybum marianum* hairy root cultures [J]. Res J Pharmacogn, 2016, 3(2): 53-59.
- [40] Rajesh M, Sivanandhan G, Arun M, *et al.* Factors influencing podophyllotoxin production in adventitious root culture of *Podophyllum hexandrum* Royle [J]. Acta Physiol Plant, 2014, 36(4): 1009-1021.
- [41] 王洪秋, 朴炫春, 蒋晓龙, 等. 促进铁皮石斛原球茎中多糖和生物碱积累研究[J]. 北方园艺, 2017(15): 117-123.
- Wang H Q, Piao X C, Jiang X L, *et al.* Enhancement of polysaccharide and alkaloid accumulation in protocorm-like-bodies of *Dendrobium candidum* [J]. North Hortic, 2017(15): 117-123.
- [42] Nagella P, Murthy H N. Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of withanolide A [J]. Bioresour Technol, 2010, 101(17): 6735-6739.
- [43] Naik P M, Manohar S H, Praveen N, *et al.* Effects of sucrose and pH levels on *in vitro* shoot regeneration from leaf explants of *Bacopa monnieri* and accumulation of bacoside A in regenerated shoots [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC, 2010, 100(2): 235-239.
- [44] Ahmad N, Rab A, Ahmad N, *et al.* Differential pH-induced biosynthesis of steviol glycosides and biochemical parameters in submerge root cultures of *Stevia rebaudiana* (bert.) [J]. Sugar Tech, 2018, 20(6): 734-744.
- [45] Li Q, Tang M, Tan Y Y, *et al.* Improved production of chlorogenic acid from cell suspension cultures of *Lonicera macranthoids* [J]. Trop J Pharm Res, 2016, 15(5): 919-927.
- [46] Luczkiewicz M, Kokotkiewicz A, Glod D. Plant growth regulators affect biosynthesis and accumulation profile of isoflavone phytoestrogens in high-productive *in vitro* cultures of *Genista tinctoria* [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC, 2014, 118(3): 419-429.
- [47] Rad F A, Jafari M, Khezrinejad N, *et al.* An efficient plant regeneration system via direct organogenesis with *in vitro* flavonoid accumulation and analysis of genetic fidelity among regenerants of *Teucrium polium* L. [J]. Hortic Environ Biotechnol, 2014, 55(6): 568-577.
- [48] Bienaimé C, Melin A, Bensaddek L, *et al.* Effects of plant growth regulators on cell growth and alkaloids production by cell cultures of *Lycopodiella inundata* [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC, 2015, 123(3): 419-429.

- 523-533.
- [49] Kikowska M, Thiem B, Sliwinska E, *et al.* The effect of nutritional factors and plant growth regulators on micropropagation and production of phenolic acids and saponins from plantlets and adventitious root cultures of *Eryngium maritimum* L. [J]. J Plant Growth Regul, 2014, 33(4): 809-819.
- [50] Khurshid R, Khan T, Zaeem A, *et al.* Biosynthesis of precious metabolites in callus cultures of *Eclipta alba* [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC, 2018, 135(2): 287-298.
- [51] Isah T, Umar S, Mujib A, *et al.* Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant *in vitro* cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC, 2018, 132(2): 239-265.
- [52] 周萍. 明党参悬浮培养体系的建立及香豆素含量的调控研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- Zhou P. Study on establishment of cell suspension culture system of *Changium myrsinioides* wolff and regulation of coumarin content [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2016. .
- [53] Kannan N, Manokari M, Shekhawat M S. Enhanced production of anthraquinones and phenolic compounds using chitosan from the adventitious roots of *Morinda coreia* Buck. and Ham [J]. Ind Crops Prod, 2020, 148: 112321.
- [54] Murthy H N, Lee E J, Paek K Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC, 2014, 118(1): 1-16.
- [55] Ivanov I, Berkov S, Pavlov A, *et al.* In situ galanthamine extraction during the cultivation of *Leucojum aestivum* L. shoot culture in two-phase bubble column cultivation system [J]. Eng Life Sci, 2019, 19(12): 1000-1005.
- [56] 赵鸣. 平贝母细胞团块悬浮培养体系的建立及诱导生物碱的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- Zhao M. Establishment of cell mass suspension culture system and study on alkaloid induction from *Fritillaria ussuriensis* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014.
- [57] 李琰, 公冶祥旭, 朱惠君, 等. 雷公藤不定根两相培养初步研究[J]. 植物科学学报, 2016, 34(3): 469-474.
- Li Y, Gongye X X, Zhu H J, *et al.* Preliminary study on two-phase culture of *Tripterygium wilfordii* adventitious root [J]. Plant Sci J, 2016, 34(3): 469-474.
- [58] Wu C H, Murthy H N, Hahn E J, *et al.* Establishment of adventitious root co-culture of ginseng and echinacea for the production of secondary metabolites [J]. Acta Physiol Plant, 2008, 30(6): 891-896.
- [59] Ramirez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, *et al.* Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories [J]. Mol Basel Switz, 2016, 21(2): 182.
- [60] Biswas T, Kalra A, Mathur A K, *et al.* Elicitors' influenced differential ginsenoside production and exudation into medium with concurrent Rg3/Rh2 panaxadiol induction in *Panax quinquefolius* cell suspensions [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(11): 4909-4922.
- [61] 杨涛, 李鑫, 方彦昊, 等. 濒危藏药桃儿七根生物反应器生产鬼臼毒素的研究[J]. 中药材, 2019, 42(11): 2486-2490.
- Yang T, Li X, Fang Y H, *et al.* Study on the production of podophyllotoxin in root bioreactor of endangered Tibetan medicine *Sinopodophyllum hexandrum* [J]. J Chin Med Mater, 2019, 42(11): 2486-2490.
- [62] 谭小明, 余丽莹, 唐红珍, 等. 外源激素 IBA 和真菌诱导子对八角莲离体根生长及其鬼臼毒素合成的影响[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2226-2230.
- Tan X M, Yu L Y, Tang H Z, *et al.* Effects of exogenous IBA and fungal elicitor on growth of *in vitro* roots culture of *Dysosma versipellis* and production of podophyllotoxin [J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(11): 2226-2230.
- [63] Lertphadungkit P, Suksiriworapong J, Satitpatipan V, *et al.* Enhanced production of bryonolic acid in *Trichosanthes cucumerina* L. (Thai cultivar) cell cultures by elicitors and their biological activities [J]. Plants, 2020, 9(6): 709.
- [64] Deepthi S, Satheeshkumar K. Enhanced camptothecin production induced by elicitors in the cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* Linn [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC, 2015, 124(3): 483-493.
- [65] Raghavendra S, Satish D, Dileep K M, *et al.* Differential effects of elicitor and precursor feeding on the enzyme tyrosine hydroxylase and their influence on the production of L-Dopa in the cell suspension cultures of *Mucuna pruri* H. J [J]. Pharmacogn. Phytochem, 2018, 7(4): 179-185.
- [66] Tarakemeh A, Azizi M, Rowshan V, *et al.* Screening of Amaryllidaceae alkaloids in bulbs and tissue cultures of *Narcissus papyraceus* and four varieties of *N. tazetta* [J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 172: 230-237.
- [67] Rahmani-Nezhad S, Dianat S, Saeedi M, *et al.* Evaluating the accumulation trend of l-dopa in dark-germinat-

- ed seeds and suspension cultures of *Phaseolus vulgaris* L. by an efficient uv-spectrophotometric method [J]. *Química Nova*, 2018, 41(4): 386-393.
- [68] Kašparová M, Martina J, Tůmová L, *et al.* Production of podophyllotoxin by plant tissue cultures of *Juniperus virginiana* [J]. *Nat Prod Commun*, 2017, 12(1): 101-103.
- [69] Baek S, Ho T T, Lee H, *et al.* Enhanced biosynthesis of triterpenoids in *Centella asiatica* hairy root culture by precursor feeding and elicitation [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2020, 14(1): 45-53.
- [70] Chen Y T, Shen Y C, Chang M C, *et al.* Precursor-feeding strategy on the triterpenoid production and anti-inflammatory activity of *Antrodia cinnamomea* [J]. *Process Biochemistry*, 2016, 51(8): 941-949.
- [71] 刘智,余龙江,李春艳,等. 磷甘霉素和洛伐它汀处理对中国红豆杉悬浮培养细胞生物合成紫杉醇的影响[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31(2): 199-204.
- Liu Z, Yu L J, Li C Y, *et al.* Effects of fosmidomycin and lovastatin treatment on taxol biosynthesis in suspension culture cells of *Taxus chinensis* [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2005, 31(2): 199-204.
- [72] Wang S, Li C, Wang H, *et al.* Effect of elicitors, precursors and metabolic inhibitors on paclitaxel production by *Taxus cuspidata* cell culture [J]. *J For Res*, 2016, 27(6): 1257-1263.
- [73] 蒋旋嫻,李永成. L-丙氨酸对海南粗榧悬浮细胞合成三尖杉酯类碱的影响[J]. *广西植物*, 2017, 37(4): 497-503, 425.
- Jiang X X, Li Y C. Improved cephalotaxine production of *Cephalotaxus mannii* suspension cells by L-alanine [J]. *Guihaia*, 2017, 37(4): 497-503, 425.
- [74] Mahendran D, Kishor P B, Sreeramanan S, *et al.* Enhanced biosynthesis of colchicine and thiocolchicoside contents in cell suspension cultures of *Gloriosa superba* L. exposed to ethylene inhibitor and elicitors [J]. *Ind Crops Prod*, 2018, 120: 123-130.
- [75] Pei T L, Ma P D, Ding K, *et al.* SmJAZ8 acts as a core repressor regulating JA-induced biosynthesis of salivianolic acids and tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *J Exp Bot*, 2018, 69(7): 1663-1678.
- [76] Kundu S, Salma U, Ali M N, *et al.* Development of transgenic hairy roots and augmentation of secondary metabolites by precursor feeding in *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski [J]. *Ind Crops Prod*, 2018, 121: 206-215.
- [77] 朱宽鹏,赵树进. 芪合酶基因Fm-STS在何首乌毛状根中的过量表达及dsRNA干扰[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(8): 41-48.
- Zhu K P, Zhao S J. Double-stranded RNA-mediated gene silencing and over-expression of FmSTS in *Polygonum multiflorum* thunb hairy roots [J]. *China Biotechnol*, 2012, 32(8): 41-48.
- [78] Anil Kumar M, Sravanthi Pammi S S, Sukanya M S, *et al.* Enhanced production of pharmaceutically important isoflavones from hairy root rhizocloned of *Trifolium pratense* L. [J]. *Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2018, 54(1): 94-103.
- [79] Chen R B, Chen X H, Zhu T T, *et al.* Integrated transcript and metabolite profiles reveal that *EbCHI* plays an important role in scutellarin accumulation in *Erigeron breviscapus* hairy roots [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 789.
- [80] Shi M, Luo X Q, Ju G H, *et al.* Enhanced diterpene tanshinone accumulation and bioactivity of transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by pathway engineering [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(12): 2523-2530.

□

(编辑:张丽红)