

药用植物细胞的大规模培养技术

胡凯 谈锋*

西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715

The Technology for Scale-up Cell Culture of Medicinal Plants

HU Kai, TAN Feng*

School of Life Sciences, Southwest Normal University, Chongqing 400715

提要 对药用植物细胞和器官进行大规模培养生产各种次生代谢药物的技术进行了简要介绍。

关键词 药用植物; 大规模细胞培养

植物细胞能积累多种次生代谢产物, 包括生物碱、有机酸、色素、糖苷类、挥发油、酶类、植物激素、植物杀菌素等。当今世界市场上已知300多种生物产品中, 90%以上的产品主要成分能从高等植物中找到。但由于这些化合物的结构复杂, 目前只能由高等植物进行生物合成, 难以用其它方法制造, 因而成本相当高。目前发现60多种药用植物细胞培养物能产生特定的药用次生代谢产物, 超过30种细胞培养物中的含量接近或超过亲本中的药物成分含量。

采用大量培养药用植物细胞和器官来生产各种植物药可以避免常规栽培中不利气候条件、病虫害危害、地理环境和个体差异的限制。通过人为调节细胞生长和代谢合成, 实现工业化生产, 可提高效益、降低成本, 而且采用现代生物技术可以筛选出高表达量的细胞株和寻找到新的药用成分。由此看来, 药用植物细胞的大规模培养显然是实现中药现代化的一条重要途径。

1 高表达细胞株的筛选

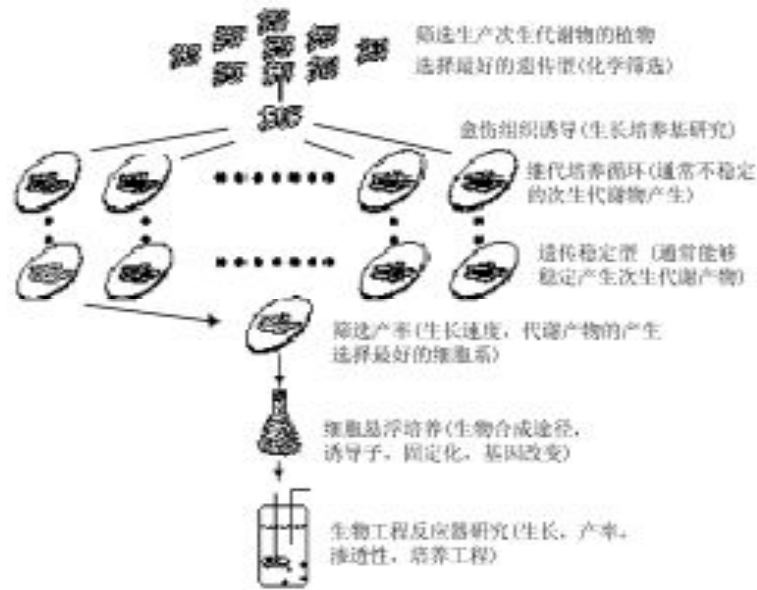
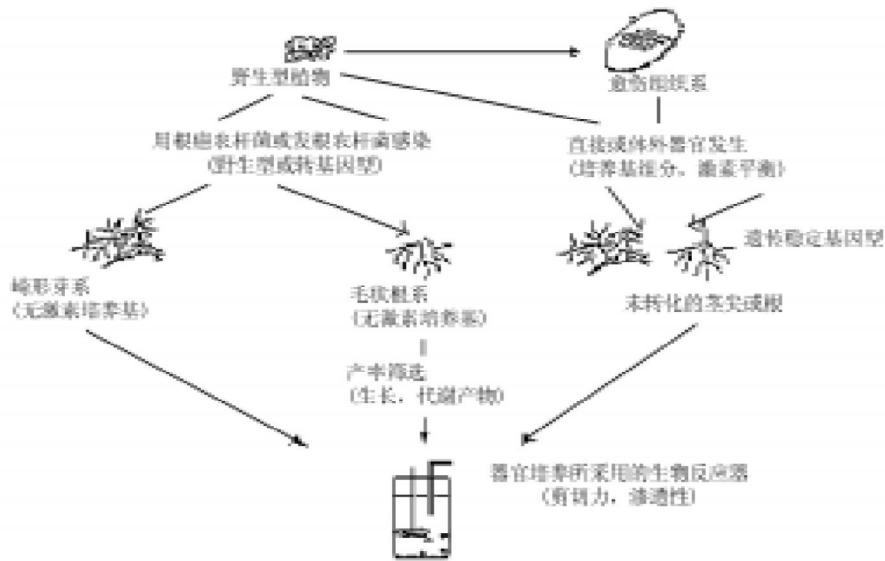
药用植物细胞培养用的细胞株的筛选过程一般是先通过愈伤组织的诱导, 再通过长时期的继代培养, 寻找出生长速度快、次生代谢产物积累多的单细胞系, 进而培养出遗传稳定性高的细胞株系(图1)^[1]。一般包括胚源性细胞株和其他外植体诱导而来的细胞株。由于不同细胞来源细胞株次生代谢产物的积累能力有很大的区别, 所以在细胞株的筛选过程中应注意选取次生代谢产物本身

含量高的外植体。

1.1 毛状根和冠瘿瘤的培养 图2是毛状根和冠瘿瘤组织培养生产药用植物次生代谢产物的途径^[1]。毛状根培养是20世纪80年代发展起来的基因工程和细胞工程相结合的一项技术。它是将发根农杆菌的Ri质粒中含有的T-DNA整合到植物细胞的T-DNA上, 诱导植物细胞产生毛状根。这种毛状根具有激素自养的特性, 生长迅速, 遗传性状稳定。目前, 已有大约31个科100余种植物建立了毛状根培养系统, 其中大多为药用植物, 如黄花烟草、曼陀罗、颠茄、莨菪、长春花、紫草、红豆杉、人参、黄连等。Yang等^[2]和Kevers等^[3]曾分别对人参和西洋参的毛状根培养系统进行了研究。Aoki等^[4]筛选出莨菪碱含量差别很大的颠茄的不同毛状根株系, 发现用毛状根培养系统生产次生代谢产物在产率和经济成本都比悬浮细胞培养优越得多。王莉等^[5]在培养何首乌毛状根中发现培养30 d的毛状根增长11.03倍, 其中大黄酸的含量为 $2.49 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}(\text{DW})$, 为原植物的2.85倍, 大黄的含量为 $79.6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}(\text{DW})$, 为愈伤组织的1781倍。冠瘿瘤同样具有激素自养、生长迅速、遗传性状稳定的特点, 它是根癌农杆菌感染植物而形成的。Spencer等^[6]发现在柠檬留兰

收稿 2003-04-14 修定 2003-12-01

* 通讯作者(E-mail:tanfeng@swnu.edu.cn, Tel:023-68252698)。

图1 由药用植物细胞生产次生代谢物的路线^[1]图2 由植物器官培养生产次生代谢物的路线^[1]

香的冠瘿瘤组织中可产生柠檬留兰香油的腺体。雷和田等^[7]用Ti质粒和Ri质粒对栝楼进行双转化后发现经过双转化的毛状根有生长更迅速而蛋白含量不变的特点。澳大利亚的Mahagamasekera和Doran^[8]还发现将颠茄的毛状根与*Duboisia hybrid*的冠瘿组织共培养时,能产生大量莨菪碱,但两者在单独培养时都不产生莨菪碱。

1.2 反义技术 药用植物细胞培养生产的药物多数是次生代谢产物,其代谢途径常常是植物的分

支代谢之一。因此如何抑制与细胞生长和目的产物积累无关的分支代谢途径是提高产率的一个重要方法。采用现代分子生物学技术中的反义技术将有可能实现这一点。以人工合成的反义RNA导入到植物基因组内与要抑制的代谢途径的关键酶基因RNA结合成双链RNA来阻断基因的正常表达,进而促进目的产物合成基因的表达。番茄中的乙烯合成酶的反义RNA转入番茄后,乙烯合成减少97%^[9]。目前,采用毛状根培养生产药用代谢产物

表1 利用毛状根培养生产药用代谢产物^[10]

植物种类	药用代谢产物	参考文献
鬼针属	多炔	Mckinely等 ^[11]
金鸡纳树	喹啉生物碱	Hamill等 ^[12]
菊苣	香豆素	Bais等 ^[13]
曼陀罗属	莨菪烷	Rhodes ^[14]
决明属	蒽醌	Ko等 ^[15]
紫松果菊	生物碱类	Trypsteen等 ^[16]
甘草	甘草酸、甘草皂甙	Ko等 ^[17]
人参	皂甙	Yoshikawa 和 Furuya ^[18]
丹参	二萜类	Hu 和 Alfermann ^[19]
艾属	挥发油	Kennedy等 ^[20]
紫草	紫草宁	Shimomura 等 ^[21]
茜草	蒽醌	Shin 和 Kim ^[22]
人参	人参皂甙	Kunshi等 ^[23]

的情况见表1^[10~23]。

2 培养方法的选择

2.1 两步培养法 培养基的组成是细胞生长和次级代谢产物形成最直接、也是最重要的影响因素。众多实验表明,用同一种培养基同时达到细胞的最佳生长和最佳次级代谢产物的积累是不现实的。因此,人们提出了两步培养法,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合成的培养基即生产培养基。张浩等^[24]在黄连细胞培养中采用两步培养法取得了较好的效果。他们先用生长培养基培养3周,再在生产培养基中培养3周后,细胞干重达到 $16.72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,总生物碱量达到 $556 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,比一步培养法提高1.72倍。李弘剑等^[25]在黄花蒿细胞培养过程中也采用了两步培养法,分别在 N_6 和改良 N_6 培养基中培养,结果青蒿素合成量达到 $190 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2 两相培养技术 在药用植物细胞培养中,由于大多数次级代谢产物是疏水性的,在培养液中的溶解度很低,不能及时释放到培养液中,造成反馈抑制和被一些酶类水解,因而次级代谢产物产量很低,不能达到工业化生产的要求。细胞培养时可采用两相培养技术即细胞培养——分离耦合技术,于培养液中加入对细胞无毒性的吸附剂和萃取剂后,再及时将次级代谢产物分离出培养系统,这样可得到较高的产率。目前用得较多的吸

附剂主要是XAD-4和XAD-7,萃取剂主要是十六烷。梅兴国等^[26]用两相系统培养红豆杉细胞,40d细胞生物量达到 $17.85 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (DW),这虽比常规培养略低,但紫杉醇产量却有较大提高,达到 $30.19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

前体化合物饲喂和诱导子、抑制子的添加也很重要。次级代谢产物的积累量少的一个重要原因在于植物体内合成代谢处于植物代谢的众多分支之中,因此前体化合物的供给不足和信号诱导的缺乏会严重影响次级代谢产物的积累。李弘剑等^[25]在黄花蒿细胞培养中分别加入前体物质青蒿酸和植物固醇生物合成抑制剂双氯苯咪唑或以氯化胆碱处理,青蒿素产量分别提高3倍和8倍多。Kim等^[27]在人参培养物中添加一种真菌诱导子(*Botrytis cinera*),24h后苯醌的产量达到 $(46.13 \pm 10.42) \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW);添加一种酵母制备物12h后,苯醌的产量达到 $(65.10 \pm 4.96) \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW)。Zamir^[28]和Fett-Neto等^[29]认为前体物质在促进红豆杉积累紫杉醇中具有重要作用。周忠强等^[30]在红豆杉细胞培养中加入诱导子水杨酸和茉莉酸甲酯,前体物质乙酸钠、苯丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸、肉桂酸、苯甲酸钠和丙酮酸钠,抑制子氯化胆碱和赤霉酸后,紫杉醇产量提高368.5%。

3 大规模培养药用植物细胞的生物反应器

植物细胞培养反应器初期大多采用微生物反应器。由于植物细胞与微生物细胞形态结构不同,对剪切力耐受性差和对氧需求低等原因,多数微生物反应器并不适合植物细胞的生长。目前用于药用植物细胞培养的反应器主要有搅拌式、非搅拌式和其他一些类型的生物反应器。机械搅拌式生物反应器有较大的操作范围,混合程度高,适应性广,适合大规模生产,但其剪切力大,容易损伤细胞,直接影响细胞的生长代谢和次级代谢产物的积累。Zhong等^[31]在中国红豆杉细胞培养中发现,5s混合时间所造成的剪切力比10min混合时间对细胞的伤害小。目前人们对搅拌形式、叶轮结构和空气分布器进行了改进,力求减少剪切力、满足供氧、混合的要求。曹阳等^[32]采用70L的环形通气与螺旋桨叶搅拌相结合的大型生物反应器培养长春花细胞,15d后生物

量达到 $205.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。黄艳等^[33]用倾斜式平板搅拌通气型生物反应器悬浮培养水母雪莲细胞生产黄酮类物质, 培养12 d, 细胞干重达到 $13.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 黄酮产量为 $416 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 但同时也发现由于反应器剪切力的影响, 产率比摇瓶培养的还低。

用非搅拌式生物反应器培养植物细胞和器官的主要有气升式反应器、转鼓式反应器和各种固定化床以及膜反应器(表2)^[34]。Liu等^[35]用一种改进的气升式内旋生物反应器培养青蒿毛状根, 培养20 d后, 青蒿素产量达到了 $577.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。喷雾反应器在器官培养中也经常用到。刘春朝等^[36]利用新型的雾化生物反应器培养青蒿不定芽, 通过中心导流筒的各个出孔, 使营养雾在几分钟内

可以充满整个培养室, 从而明显提高了供氧和减小了剪切力对细胞生长的影响, 25 d后, 青蒿素产量为 $46.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 是摇瓶培养的3.2倍。兰文智等^[37]用一种连续灌注简易流化床生物反应器培养红豆杉细胞生产紫杉醇, 取得了比传统搅拌和气升式生物反应器更好的效果。膜式固定化细胞生物反应器效率很好, 易于放大和控制细胞的生长, 下游处理很方便, 是目前应用较多的一种固定生物反应器^[38]。在用膜固定的方式培养长春花细胞时, 发现膜生物反应器非常适合这种细胞的生长和生物碱的释放。Tyler等^[39]采用的一种植物细胞表面固定化培养系统, 可减小剪切力的影响, 并能促进植物细胞凝聚, 增加次生代谢产物合成和

表2 药用植物细胞培养生产次生代谢产物的培养效果和生物反应器的应用^[34]

培养器官	生物反应器	培养效果	植物
细胞	机械搅拌式反应器、气升式反应器、固定床反应器、流化床反应器、中空纤维反应器等	生长慢, 次生代谢物含量较低, 采用固定化培养可促进生长和代谢, 可以大规模培养	人参、长春花、红豆杉、毛地黄、青蒿、乌茄、水母雪莲、黄连、紫草等
芽	雾化反应器、喷淋反应器, 鼓泡塔、径向留反应器	生长慢, 次生代谢物含量高, 需光照, 浸没培养	青蒿、长春花、毛地黄、唐菖蒲等
体细胞胚	气升式反应器、螺旋式搅拌反应器、自旋过滤反应器	生长慢, 次生代谢物含量高	红豆杉、青蒿、人参等
毛状根	雾化反应器、气升式反应器、搅拌反应器、转鼓反应器、鼓泡塔反应器	生长迅速, 分支多, 次生代谢物含量高, 不需外源激素, 放大培养容易	红豆杉、青蒿、长春花、人参、丹参、辣根、何首乌、菘蓝、颠茄等
冠瘿组织	搅拌式反应器、中空纤维固定反应器等	生长迅速, 次生代谢物含量高, 不需外源激素, 悬浮培养为颗粒, 易放大培养	丹参、洋地黄、金鸡纳、柠檬留兰香等

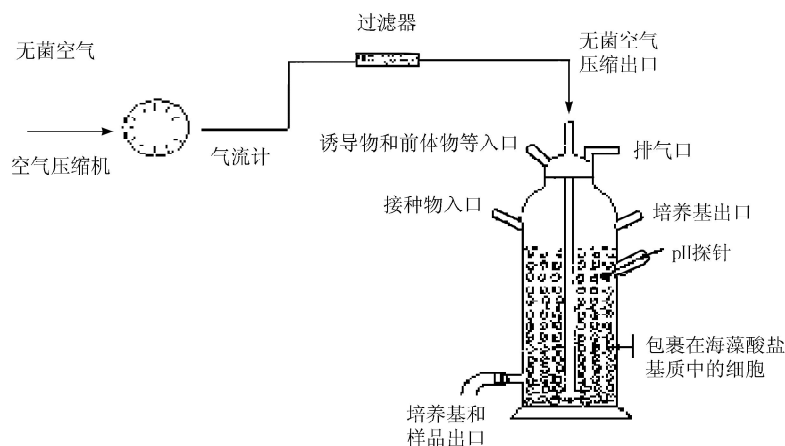
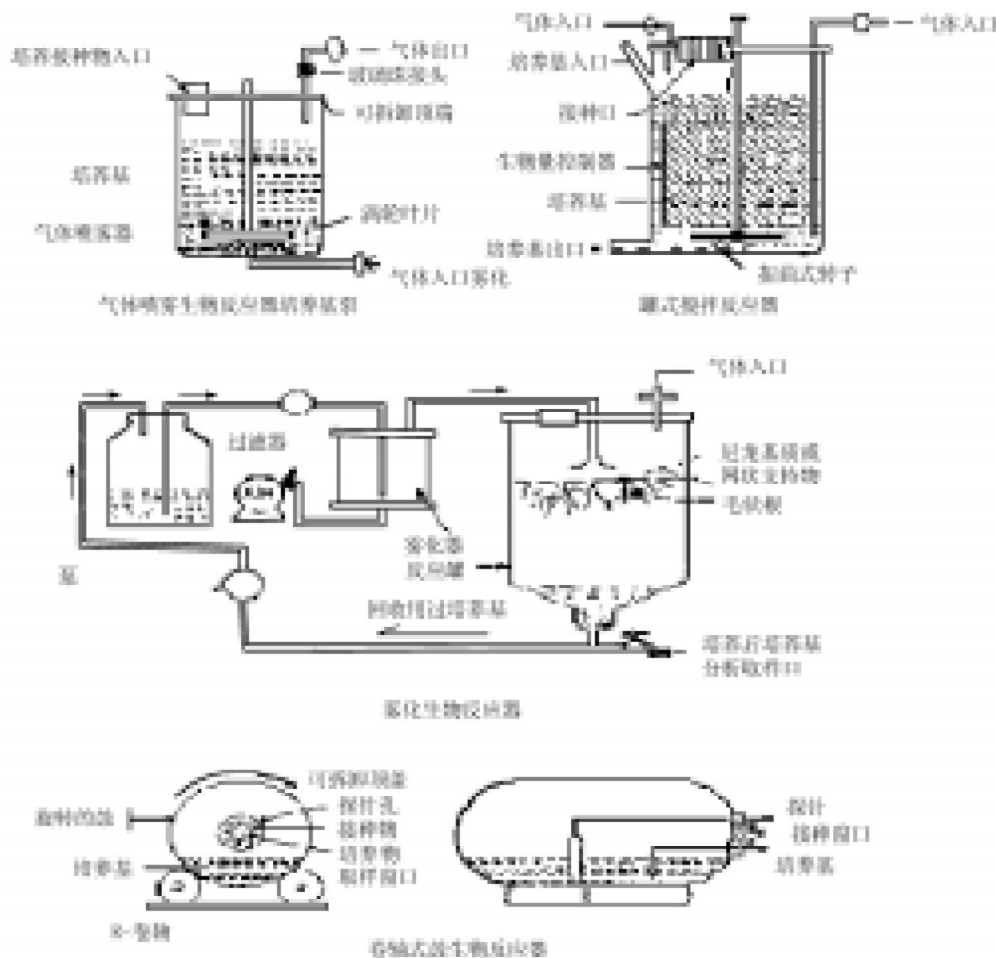


图3 用柱式生物反应器培养固定化药用植物细胞生产药物^[9]

图4 用于毛状根培养的生物反应器^[9]

积累。目前用于药用植物细胞培养的生物反应器见表2^[34]。图3是利用生物反应器培养固定化细胞生产药物的装置^[9]。药用植物毛状根培养生产次生代谢物常用生物反应器结构如图4^[9]所示。

4 几种药用植物细胞和器官培养的实例

4.1 红豆杉细胞和毛状根培养生产紫杉醇

紫杉醇是上世纪70年代首次从短叶红豆杉树皮中分离到的具有抗癌活性的二萜烯类化合物。紫杉醇能与微管蛋白结合,并促进其聚合,抑制癌细胞有丝分裂,阻止癌细胞的无限增殖。目前用红豆杉细胞培养生产紫杉醇是一个比较可行的方法。通过筛选高表达的细胞株,大量培养时加入前体物质^[40]、诱导子^[41~43]或抑制剂等可提高紫杉醇的产量。梅兴国等^[44]在培养红豆杉细胞时加入抑制类胡萝卜素合成的Clomazone,发现紫杉醇的产

量比不加Clomazone提高了3倍。Zhang等^[45]在不同接种量和不同培养时间的云南红豆杉细胞悬浮培养液中加入诱导子(Ag^+ 、茉莉酸甲酯等),发现接种量为 $200\text{ g(FW)}\cdot\text{L}^{-1}$ 的二十天龄细胞的产量达到 $39.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。罗杰等^[46]发现补料批式培养红豆杉细胞生产紫杉醇的效果比批式培养好。随着分子生物学的发展和紫杉醇代谢酶类研究的深入,紫杉醇生物合成途径开始被人们所了解^[47~49],许多紫杉醇代谢途径中的酶都已经克隆^[50,51]。因此目前趋向于用现代分子遗传学的方法来提高紫杉醇的产率。通常是用分离和克隆出的关键酶的基因加上强启动子或者经过修饰后,构建在质粒载体上,通过根癌农杆菌转化到红豆杉基因组中,构建转基因模式红豆杉植株、紫杉醇高产细胞系^[51]或者诱导具有产紫杉醇能力的

冠瘿组织^[52]。也可通过发根农杆菌转化红豆杉枝叶或愈伤组织得到毛状根来生产紫杉醇。

4.2 人参细胞和毛状根的培养 人参为五加科植物,具有大补元气、固脱生津、安神益智的功能,是一种名贵的滋补强壮药物。它主要含有强生理活性的生物碱、皂甙、萜类和甾体类物质。前苏联 Б У Т е Н к о 等早在上个世纪50年代末、罗士韦等在1964年就开始了人参愈伤组织的培养。随后,各国的研究者都相继成功获得了人参的愈伤组织。目前主要研究方向是通过人参细胞悬浮培养和人参毛状根的培养生产各种次生代谢产物。Kim等^[27]用人参细胞悬浮培养生产苯醌类物质。Lu等^[53]在人参细胞悬浮培养中加入诱导子后皂甙的含量达到细胞干重的2.07%,是未加诱导子的28倍。于荣敏等^[54]探讨了不同理化因子对西洋参冠瘿组织培养合成人参皂甙的影响,发现在White培养基中,pH为5.6、肌醇为 $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、接种量为 $6\text{ g(FW)}\cdot\text{瓶}^{-1}$ 的人参皂甙1的积累量最多。现在日本和德国都已获得了人参细胞工业化生产的专利,开始了人参细胞大规模培养生产。由于人参细胞的次生代谢产物含量、生长速度和培养条件都无法与人参毛状根培养系统相比,所以目前研究的热点都集中在毛状根培养系统。日本学者Yoshimastu和Yomaguchi^[55]用发根农杆菌转化人参叶柄,已获得了能在离体条件下生长迅速的毛状根。Yang和Chai^[56]用发根农杆菌15834转化人参已得到一种高产的毛状根系统。赵寿经等^[57]培养以发根农杆菌A₄转化的毛状根,14 d后,鲜重增加7.97倍,人参皂甙含量为 $10.38\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{(FW)}$,超过六年生的人参根 $[6.45\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{(FW)}]$ 。同时,他们利用PCR方法,从人参毛状根中扩增并克隆了影响人参皂甙合成的基因*ro1C*^[58]。这表明今后有可能在基因水平上对毛状根积累皂甙进行调控,从而筛选出高表达的毛状根株系。

4.3 长春花培养生产生物碱 长春花是夹竹桃科长春花属植物。20世纪50年代人们发现其细胞和组织培养物中含有100多种次生代谢产物,其中大多为生物碱。它们的天然含量较低,但具有很强的生物活性,是目前应用最广的天然抗癌药物之一。Parul等^[59]研究各种天然长春花属植物中的生

物碱含量,发现其含量相当低而且种间和器官间差异显著。因而利用组织培养和细胞工程技术筛选高产细胞系和用毛状根的培养生产各种长春花生物碱成了目前研究的热点。在细胞培养中加入前体物质如马钱子甙,诱导子如茉莉酮酸、甲壳质、果胶酶等均能提高长春花次生代谢产物的积累量。Zhao等^[60]在培养长春花细胞的系统中加入KCl、甘露糖、前体物质(琥珀酸色氨酸和色氨酸)和一些生物代谢调节物后,观察到处理后细胞产生的长春花碱和西萝芙木碱是未经处理的4倍多。目前对长春花生物碱的基本代谢模式已比较清楚,但是其中关键限速酶还在研究之中^[61]。Canel等^[62]和Geerlings等^[63]研究色氨酸合成酶和色氨酸脱羧酶在长春花细胞合成吲哚类和喹啉类生物碱中的作用,发现采用基因工程方式超量表达这两种酶后,生物碱产量超过了 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,表明这两种酶对长春花生物碱合成速度的重要性。近年来,由于毛状根培养技术在植物次生代谢产物生产中的广泛应用,长春花的毛状根培养系统也经常有所报道^[64~66]。

4.4 紫草细胞培养生产紫草宁和色素 紫草宁及其衍生物为萜醌类化合物,具抗肿瘤、抗炎和抗菌活性,还有抗肝脏氧化损伤和抗受孕作用。紫草又是日化用品原料,日本已成功地以其中的色素研制开发出天然色素口红,因其不含人工色素,上市之初就深受消费者欢迎。日本学者Tabata等最先成功诱导了硬紫草愈伤组织,并生产出紫草宁及其衍生物^[67]。随后,人们为提高紫草宁产量又进行了大量的研究。目前的研究主要集中于怎样提高培养系统的产率,采用的方法主要有吸附培养^[68]和两相培养等。薛莲等^[69]用液体石蜡为有机溶剂,对紫草细胞进行双液相培养,观察到在有机相与水相的比例为1:5时,细胞的紫草宁产率为 $0.305\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\text{(DW)}$ 细胞,终产率为 $0.665\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\text{(DW)}$ 接种细胞,分别为悬浮培养产率的4.24倍与3.82倍。薛莲等^[70]还采用吸附固定化结合液体石蜡原位萃取培养紫草细胞,产率达到悬浮培养的12.7倍。Touno等^[71]研究茎诱导的细胞悬浮培养生产紫草宁,发现KT对提高细胞生长速率有重要作用,B₅液体培养基培养5周后紫草宁的产量达到细胞

干重的2.3%。调控其次生代谢过程中的关键限速酶将有可能发展成一种人为调节紫草素产量的模式培养系统。Yamamura等^[72]和Yamamoto等^[73]分别研究桂皮酸羟化酶和牻牛儿苗酸羟化酶的结果显示:这两种酶在紫草细胞内的表达量与紫草素的合成速度明显相关,并已将其基因克隆,说明通过外源基因调节紫草素的合成是可能的。除了紫草细胞培养之外,有人还对冠瘿细胞和毛状根培养系统进行了研究。祁建军等^[74]用根癌农杆菌转化紫草,结果在得到的细胞系中紫草素含量达到1.18%。Yazaki等^[75]利用农杆菌15834将外源的强启动子花椰菜花叶病毒35S启动子转入到紫草基因DNA中,并在毛状根的各个部位都检测到了35S启动子的表达,提高了合成紫草宁的相关酶类的表达,并利用毛状根来生产紫草宁获得成功。由于紫草细胞和毛状根培养时表现出光依赖性地抑制紫草宁的生物合成。因此Yazaki等^[76]还将一种暗诱导蛋白LeDI-2转入紫草中,研究发展了一种在紫草细胞和毛状根培养中提高紫草宁含量的光调控方法。

5 药用植物细胞培养面临的问题

植物细胞和器官培养生产药用次生代谢物的工业化早就引人注目。固定化细胞和毛状根已能够大规模培养。但不同的细胞或组织所需的生物反应器不同,没有一种现有的生物反应器是通用的。重要的是要有一种既能提供足够的生物量又能积累次生代谢产物的经济、可行的生物反应器。从目前的水平来看,任何一种化合物如果每千克价值低于1000美元,用细胞培养进行生产则是很困难的。除非生物反应器生产的化合物具有价格高,市场需求大时,才有可能实现。这项技术的主要障碍有:(1)工业化生产所要求的药用植物细胞和器官培养以及它们次生代谢产物的合成的基本知识还非常缺乏。植物细胞的活力以及在反应器中受各种理化因子的影响最近才开始有所研究,远远落后于人们对微生物和动物细胞培养的认识。(2)次生代谢物的合成需要一段很长的过程,其中还包括多种酶类之间的协同和相互抑制,这种生物合成比在微生物和哺乳动物细胞中合成重组蛋白或只有一两个基因决定的蛋白质的过程要复杂得多。这也是为什么植物细胞和组织培养

的商业化还没有取得成功的一个重要原因。(3)药用植物细胞和器官培养的经济成本相当昂贵。这项技术必须要有高成本的生物反应器以及能维持适宜生长条件的各种辅助控制仪器和严密的操作控制程序方可实现,而这些都需要很高的成本。

参考文献

- Bourgau F, Gravit A, Milesi S et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci*, 2002, 161: 839~851
- Yang DC, Chio HY, Kim YH et al. Effects of light on the pigment production and chloroplast development of ginseng hairy roots. *Koryo Insam Hakhoechi*, 1997, 21(1): 28~34
- Kevers C, Jacques Ph, Thonart Ph et al. *In vitro* root culture of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. *Plant Growth Regul*, 1999, 27(3): 173~178
- Aoke T, Matsumoto H, Asako Y et al. Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15834. *Plant Cell Rep*, 1997, 16: 282~285
- 王莉, 于荣敏, 张辉等. 何首乌毛状根培养及其活性成分的产生. *生物工程学报*, 2002, 18(1): 69~73
- Spencer A, Hamill JD, Rhodes MJC. Production of terpene by differentiated shoot cultures of *Mentha citrata* transformed with *Agrobacterium tumefaciens* T37. *Plant Cell Rep*, 1990, 8: 601~606
- 雷和田, 宋经元, 祁荫麟等. Ti 和 Ri 质粒对插接的双转化研究. *中国中药杂志*, 2001, 26(3): 162~165
- Mahagamasehera MG, Doran PM. Intergeneric co-culture of genetically transformed organs for the production of scopolamine. *Phytochem*, 1998, 47(1): 17~21
- Hamilton AJ, Lycett GW, Grierson D. An antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, 1990, 346: 284~287
- Ramachandra RS, Ravishankar GA. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, 2002, 20: 101~153
- McKinley TC, Michaels PJ, Flores HE. Is lipoxigenase involved in polyacetylene biosynthesis in Asteraceae. *Plant Physiol Biochem*, 1993, 31: 835~853
- Hamill JD, Parr AJ, Rhodes MJC et al. New routes to plant secondary products. *Biotechnology*, 1987, 5: 800~804
- Bais HP, George J, Ravishankar GA. Production of esculin by hairy root cultures of *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local. *Indian J Exp Biol*, 1999, 37: 269~273
- Rhodes MJC. In: Kurz GW (ed). *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. Berlin: Springer-Verlag, 1989. 58~72
- Ko KS, Ebizyky Y, Noguchi H et al. Secondary metabolites production by hairy roots and regenerated plants transformed by Ri

- plasmids. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36:417~420
- 16 Trypsteen M, Van Lijsebettens M, Van Severen R et al. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Echinacea purpurea*. *Plant Cell Rep*, 1991, 10:85~89
 - 17 Ko KS, Noguchi H, Ebizyka Y et al. Oligoside production by hairy root cultures transformed by Ri plasmids. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37:245~248
 - 18 Yoshikawa T, Furuya T. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep*, 1987, 6:449~453
 - 19 Hu BZ, Alfermann AW. Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemicals*, 1993, 32:699~703
 - 20 Kennedy AI, Deans SG, Svoboda KP et al. Volatile oils from normal and transformed root of *Artemisia absinthium*. *Phytochemicals*, 1993, 32:1449~1451
 - 21 Shimomura K, Satake M, Kamada H. Production of useful secondary metabolites by hairy roots transformed with Ri-plasmid. In: Somers D, Gengenbach BG, Biesboer DD et al (ed). *Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. Minneapolis: University of Minneapolis, 1986. 250
 - 22 Shin SW, Kim YS. Production of anthraquinones derivatives by hairy root cultures of *Rubia cordifolia* var. *pratensis*. *Korean J Pharmacogn*, 1996, 27:301~308
 - 23 Kunshi M, Shimomura K, Takida M et al. Growth and ginsenoside production of adventitious and hairy root cultures in an interspecific hybrid ginseng (*Panax ginseng* × *P. quinquefolium*). *Nat Med*, 1998, 52:1~4
 - 24 张浩, 陈炜, 晁若冰等. 黄连细胞二步法悬浮培养生产黄连生物碱类成分的探索. *华西医科大学学报*, 1997, 28(1):37~39
 - 25 李弘剑, 张毅, 郭勇等. 黄花蒿培养细胞中青蒿素合成代谢的体外调节. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(3):479~483
 - 26 梅兴国, 黄伟, 王传贵等. 红豆杉细胞两相培养生产紫杉醇的研究. *生物技术*, 2000, 10(1):10~12
 - 27 Kim CY, Im HW, Kim HK et al. Accumulation of 2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone in suspension cultures of *Panax ginseng* by a fungal elicitor preparation and a yeast elicitor preparation. *Microbiol Biotechnol*, 2001, 56:239~242
 - 28 Zamir LO, Nedeia ME, Garneau FX. Biosynthetic building blocks of *Taxus canadensis* taxanes. *Tetrahedron Lett*, 1992, 33:5235~5236
 - 29 Fett-Neto AG, Melasan SJ, Nicholson SA et al. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell culture of *Taxus cuspidata*. *Biotech Bioeng*, 1994, 44(8):967~971
 - 30 周忠强, 梅兴国, 吴奇君等. 东北红豆杉细胞培养生产紫杉醇的调控研究. *生命科学研究*, 2001, 5(3):238~241
 - 31 Zhong JJ, Pan ZW, Wang ZY. Effect of mixing time on taxoid production using suspension cultures of *Taxus chinensis* in a centrifugal impeller bioreactor. *J Biosci Bioeng*, 2002, 94(3):244~250
 - 32 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. *西北农林科技大学学报*, 2002, 30(2):87~90
 - 33 黄艳, 赵德修, 吕东平等. 搅拌式生物反应器悬浮培养水母雪莲细胞的研究. *生物工程学报*, 2001, 17(5):561~565
 - 34 刘春朝, 王玉春, 欧阳藩等. 生物反应器技术用于植物组织培养的研究进展. *化工冶金*, 1999, 20(3):329~326
 - 35 Liu C, Wang Y, Guo C et al. Enhanced production of artemisinin by *Artemisia annua* L. hairy root cultures in a modified inner-loop airlift bioreactor. *Bioprocess Eng*, 1998, 19(5):389~392
 - 36 刘春朝, 王玉春, 康学真等. 利用新型雾化生物反应器培养青蒿不定芽生产青蒿素. *植物学报*, 1999, 41(5):524~527
 - 37 兰文智, 余龙江, 吴元喜. 连续灌注培养红豆杉细胞生产紫杉醇的研究. *华中科技大学学报*, 2002, 30(5):91~93
 - 38 Keith B, Tom S. Mini-Review the application of membrane biological reactors for the reactor for the treatment of wastewaters. *Biotech Bioeng*, 1996, 49:601~610
 - 39 Tyler RT, Karz WG, Paiva NL et al. Bioreactor for surface-immobilized cells. *Tissue Organ Cult*, 1995, 42(1):81~90
 - 40 Strobel GA, Stierle A. Factors influencing the *in vitro* production of radiolabeled taxol by pacific yew *Taxus brevifolia*. *Plant Sci*, 1992, 84:65~74
 - 41 Baebler S, Camloh M, Kovac M et al. Jasmonic acid stimulates taxane production in cell suspension culture of yew (*Taxus x media*). *Planta Med*, 2002, 68(5):475~476
 - 42 Zhang CH, Wu JY. Ethylene inhibitors enhance elicitor-induced paclitaxel production in suspension cultures of *Taxus* spp. cells. *Enzyme Microbiol Technol*, 2003, 32(1):71~77
 - 43 Wang CG, Wu JY, Mei XG. Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Macrobiol Biotechnol*, 2001, 55(4):404~410
 - 44 梅兴国, 汪爱顺, 杨新. Clomazone 对中国红豆杉细胞培养的影响. *生命科学研究*, 2002, 6(1):46~50
 - 45 Zhang CH, Wu JY, HE GY. Effects of inoculum size age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanensis* cell cultures. *Microbiol Biotechnol*, 2003, 60(4):396~402
 - 46 罗杰, 胡道伟, 刘凌等. 不同培养方式的红豆杉细胞悬浮培养比较研究. *华中科技大学学报*, 2002, 30(7):114~116
 - 47 Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M et al. Inhibition of paclitaxel and baccatin III accumulation by mevinolin and fosmidomycin in suspension cultures of *Taxus baccata*. *J Biotechnol*, 2003, 101(2):157~163
 - 48 Ketchum REB, Rithner CD, Qiu D et al. *Taxus* metabolomics: methyl jasmonate preferentially induces production of taxoids oxygenated at C-13 in *Taxus x media* cell cultures. *Phytochemistry*, 2003, 62(6):901~909
 - 49 Walker K, Long R, Croteau R. The final acylation step in Taxol biosynthesis: Cloning of the taxoid C13-side-chain *N*-benzoyltransferase from *Taxus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002,

- 99(17):9166~9171
- 50 Wang W, Shi Q, Zhu P et al. cDNA cloning, expression and characterization of taxadiene synthase, a diterpene cyclase from *Taxus chinensis*. *Acta Bot Sin*, 2002, 44(2):181~187
- 51 Wildung MR, Croteau RA. cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *Biol Chem*, 1996, 271:9201~9204
- 52 盛长忠, 王淑芳, 张心平等. 土壤农杆菌 C58 遗传转化东北红豆杉的初步研究. *南开大学学报*, 1999, 32(4):27~30
- 53 Lu MB, Wong HL, Teng WL. Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep*, 2001, 20:674~677
- 54 于荣敏, 宋永波, 李锐等. 西洋参冠瘿组织培养条件对其人参皂甙 Rb1 含量的影响. *药物生物技术*, 2002, 9(4):216~219
- 55 Yoshimatsu K, Yomaguchi H. Traits of *Panax ginseng* hairy roots after cold storage and cryopreservation. *Plant Cell Rep*, 1996, 15:555~560
- 56 Yang DC, Choi YE. Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep*, 2000, 19:491~495
- 57 赵寿经, 杨振堂, 李昌禹等. 发根农杆菌诱导人参产生发根及离体发根中人参皂甙含量的测定. *吉林农业大学学报*, 2001, 23(2):57~63
- 58 赵寿经, 李昌禹, 臧埔等. 影响人参发根中皂甙含量基因的定位及其克隆. *特产研究*, 2001, 23(4):1~6
- 59 Parul M, Uniyal GC, Sharma S et al. Pattern of diversity for morphological and alkaloid yield related traits among the periwinkle *Catharanthus roseus* accessions collected from in and around Indian subcontinent. *Genet Resour Crop Evolution*, 2001, 48(3):273~286
- 60 Zhao J, Hu Q, Guo Q-Y et al. Effects of factors, and bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus culture of *Catharanthus roseus*. *Microbiol Biotechnol*, 2001, 55(6):693~698
- 61 Geerlings A, Redondo FJ, Contin A et al. Biotransformation of tryptamine and secologanin into plant terpenoid indole alkaloids by transgenic yeast. *Microbiol Biotechnol*, 2001, 56:420~424
- 62 Canel C, Lopes-Cardoso MI, Whitmer S et al. Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta*, 1998, 205(3):414~419
- 63 Geerlings A, Hallard D, Martinez Caballero A et al. Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* 'Ledgeriana' hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep*, 1999, 19:191~196
- 64 Morgan JA, Barney CS, Penn AH et al. Effects of buffered media upon growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* hairy roots. *Microbiol Biotechnol*, 2000, 53(3):262~265
- 65 Moreno-Valenzuela OA, Galaz-Avalos RM, Minero-Garcia Y et al. Effect of differentiation on the regulation of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Plant Cell Rep*, 1998, 18:99~104
- 66 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. *西南师范大学学报(自然版)*, 2002, 27(4):549~552
- 67 吉文亮, 秦民坚, 王峥涛等. 紫草组织培养研究概况. *中国野生植物资源*, 2000, 19(4):9~12
- 68 谢文化, 梁世中, 余若黔等. 添加吸附树脂紫草细胞培养生产紫草色素. *华南理工大学学报*, 1999, 27(6):27~31
- 69 薛莲, 孟琴, 吕德伟. 紫草细胞的双液相培养研究. *化学反应工程与工艺*, 2000, 16(1):40~44
- 70 薛莲, 孟琴, 吕德伟. 用吸附固定法培养紫草细胞. *植物生理与分子生物学报*, 2002, 28(5):369~374
- 71 Touno K, Harada K, Yoshimatsu K et al. Shikonin derivative formation on the stem of cultured shoots in *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Rep*, 2000, 19:1121~1126
- 72 Yamamura Y, Ogihara, Mizukami H. Cinnamic acid 4-hydroxylase from *Lithospermum erythrorhizon*: cDNA cloning and gene expression. *Plant Cell Rep*, 2001, 20:655~662
- 73 Yamamoto H, Inoue K, Li SM et al. Geranylhydroquinone 3'-hydroxylase, a cytochrome P-450 monooxygenase from *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Planta*, 2000, 210:312~317
- 74 祁建军, 宋经元, 雷和田等. 根瘤农杆菌转化紫草的研究. *云南植物研究*, 2002, 24(5):656~658
- 75 Yazaki S, Tanaka H, Matsuoka et al. Stable transformation of *Lithospermum erythrorhizon* by *Agrobacterium rhizogenes* and shikonin production of the transformants. *Plant Cell Rep*, 1998, 18:214~219
- 76 Yazaki k, Matsuoka H, Shimomura K et al. A novel dark inducible protein LeDI-2, and its involvement in root specific secondary metabolism in *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Physiol*, 2001, 125(4):1831~1841