植物科学学报 2015，33(2)：264~270
Plant Science Journal

DOI：10.11913/PSJ.2095-0837.2015.20264

Ri 质粒介导的毛状根体系建立及其在植物次生代谢产物合成中的研究进展

刘 彤[1]，杨淑慎[1*]，方荣锋[1]，张广昊[2]

（1. 西北农林科技大学生命科学学院，陕西杨凌 712100；2. 大连工业大学生物工程学院，辽宁大连 116034）

摘 要：发根农杆菌 Ri 质粒可诱导植物产生毛状根体系，该体系具有遗传性状稳定且增殖速度快的特点，可用于药用植物次生代谢产物的生产研究，为利用生物反应器技术进行药用植物有效成分工业化水平的发酵培养开辟了新途径。本文主要综述了发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物毛状根体系遗传转化机理，并对毛状根体系在药用植物次生代谢产物生产中的研究现状进行了深入分析，为从基因水平上调控植物次生代谢产物的合成提供新思路。

关键词：毛状根；发根农杆菌 Ri 质粒；药用植物次生代谢产物

中图分类号：Q813　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2095-0837(2015)02-0264-07

Establishment of Hairy Root System Mediated by Ri Plasmid and its Advances in Biosynthesis of Plant Secondary Metabolites

LIU Tong[1], YANG Shu-Shen[1*], FANG Rong-Feng[1], ZHANG Guang-Hao[2]

(1. *College of Life Sciences*, *Northwest A&F University*, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. *College of Bioengineering*, *Dalian Polytechnic University*, Dalian, Liaoning 116034, China)

Abstract: The hairy roots of plants can be induced by the root inducing plasmid (Ri) of *Agrobacterium rhizogenes*. With high growth rate and genetic stability, the hairy root system can be used in the biosynthesis of secondary metabolites as wild-type roots. The *in vitro* hairy root culture system provides a new process with active medicinal plant ingredients in the industrial fermentation of commercial-scale bioreactor technology. This paper summarizes the genetic transformation mechanism of hairy roots induced by the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*, and the current research on secondary metabolites of hairy roots and directions of future research, thereby offering a new perspective on the study of secondary metabolites of hairy roots at the level of gene expression.

Key words: Hairy roots; Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*; Secondary metabolism of medicinal plants

1900 年 Stewart 等[1]第一次提出“毛状根(hairy root)”这一概念，1907 年 Smith 和 Townsend 发现发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)可诱导植物产生毛状根的现象[2]，1982 年 Chilton 等[3]指出发根农杆菌侵染植物的过程中可在感染部位或其附近产生大量毛状根的现象与发根农杆菌 Ri 质粒有关。自此，Ri 质粒遗传转化机理的研究受到广泛关注[4]。

毛状根因具有生长繁殖速度快、遗传性状稳定、次生代谢产物含量高等特点被用于药用植物代谢工程的研究，尤其是以根为材料提取有效成分的药用植物毛状根研究成为近 30 年的热点关注内容，主要包括有效成分合成途径机制解析、毛状根

收稿日期：2014-05-26，退修日期：2014-07-04。
基金项目：陕西省科学技术研究发展计划项目(2009K01-11)。
作者简介：刘彤(1989-)，女，硕士，研究方向为细胞工程(E-mail：tongno.1@163.com)。
* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail：yangshushen2002@163.com)。

体系建立条件的探索与完善、前体诱导子添加及分子水平上介导表达等[5]。

中国是世界上使用和出口中药材最多的国家，而其中 80%以上的中药材来自药用植物。随着中药现代化研究的深入和中药产业规模的扩大，药用植物的用量也在不断增加，从而导致中药材与农作物栽培用地矛盾，为了缓解这一矛盾，以毛状根为药源的研究越来越多。到目前为止，已建立起多种药用植物毛状根体系，并获得了高产次生代谢产物，如长春碱、喜树碱、茄尼醇、银杏酚、紫草素、葛根素、吗啡、类黄酮、龙胆碱、核黄素、积雪草苷、丹参酮类等，其中紫草（*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.）、长春花（*Catharanthus roseus*）、甜菜（*Beta vulgaris* L.）、胡萝卜（*Daucus carota* L.）等植物的毛状根已达到工业化生产水平，甚至达到生物反应器生产水平的研究[6-8]。本文主要综述了发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物遗传转化机理、毛状根体系的诱导技术及毛状根体系在药用植物次生代谢产物生产中的研究进展，分析了毛状根体系在药用植物次生代谢产物生产中存在的问题，并对其今后的发展方向进行了展望，以期为毛状根的深入研究提供借鉴。

1　发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物遗传转化

1.1　发根农杆菌及 Ri 质粒

1.1.1　发根农杆菌

发根农杆菌为根瘤菌科（Rhizobiaceae）农杆菌属革兰氏阴性菌，呈杆状，有鞭毛，能够诱导大多数双子叶植物、少数单子叶植物及个别裸子植物产生毛状根。在转化的植物细胞中可检测到一类特殊的非蛋白质态的氨基酸—冠瘿碱（opines），根据冠瘿碱的种类不同可将发根农杆菌分为 4 类，即农杆碱型（agropine type）、甘露碱型（mannopine type）、黄瓜碱型（cucumopine type）和异黄瓜碱型（mikimopine type）[9]。实验室常用的发根农杆菌菌株有 LBA 9402、ACCC 10060（A4）、ATCC 15834、TR 105、R 1601 等，这些菌株中均含有 Ri 质粒，是毛状根体系建立的主要应用菌株[10,11]。

1.1.2　发根农杆菌 Ri 质粒

Ri 质粒是独立存在于发根农杆菌细胞染色体外的双链共价闭环基因组 DNA，约为 200～800 kb，并且具有独立的遗传复制能力。依据 Ri 质粒行使的不同功能可将其主要分为 4 个区，即 T-DNA 区（Transfer-DNA region）、Vir 区（Virulence region）、Ori 区（Origin of replication）和冠瘿碱代谢功能区（opine catabolism，OPCA）。其中，T-DNA 区是可转移的 DNA 区，可被转移到寄主植物细胞核基因中进行整合及表达从而形成毛状根；Vir 区为致病区，亦被称作毒性区，它在 T-DNA 转移过程中起着至关重要的作用，该区域的丢失或突变会导致 Ri 质粒致病能力的减弱或丧失，从而使被侵染植株不出现病症和毛状根。农杆碱型的 T-DNA 分为两个区，即 T_L-DNA（Left-hand T-DNA）和 T_R-DNA（Right-hand T-DNA）[12,13]。

1.2 发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物遗传转化机理

发根农杆菌介导的植物毛状根体系建立的遗传转化是发根农杆菌与植物细胞之间相互作用的结果。发根农杆菌在侵染植物过程中，其染色体上的 *chv B*（chromosomal virulence B gene）基因的表达产物参与 β-1,2 环葡聚糖的合成，β-1,2 环葡聚糖可进入发根农杆菌的外周胞质并使发根农杆菌菌体吸附到植物细胞壁上，从而植物伤口部位细胞会合成一些与细菌接合有关的蛋白[14]。而 ssT-strand（single strand T-strand）的合成与 T-strand 进入植物细胞主要与 *vir* 基因转录翻译的蛋白质种类有关，其中 *vir D1*（virulence D1）基因和 *vir D2* 基因转录的蛋白质具有专一性切割作用，可对松弛状态的 T-DNA 两端 25 bp 重复序列进行专一性切割，从而使 T-DNA 区得到激活；然后 *vir D2* 基因结合到 T-strand 5′端以避免核酸外切酶对 T-strand 的破坏，*vir D2*/T-strand 通过 T4SS 系统（Type IV Secretion System，包括 11 种 *vir B* 转录翻译蛋白和 *vir D4* 基因）从发根农杆菌外周胞质中转移出来。*vir B2* 的表达产物可使 T-DNA 进入植物细胞，其 C-末端的细胞核定位信号（nuclear localization signal，NLS）可靶向引导 T-DNA 结合在植物细胞核上，T-strand 进入植物细胞膜后与植物细胞内的 α 蛋白作用可形成一种超 T-DNA 结构，该结构在靶向定位过程中有重要意义。*vir F* 转录翻译的蛋白对超 T-DNA 结构上的结合蛋白具有解离作用，在 T-strand 与植物细胞基因组整合的

过程中，*vir E2* 和 α 蛋白就在 *vir F* 表达蛋白的作用下从 T-strand 上解离下来，T-DNA 最后与细胞核中的植物 DNA 基因组进行整合，从而转录翻译表达得到相应的毛状根体系(图 1)[15,16]。

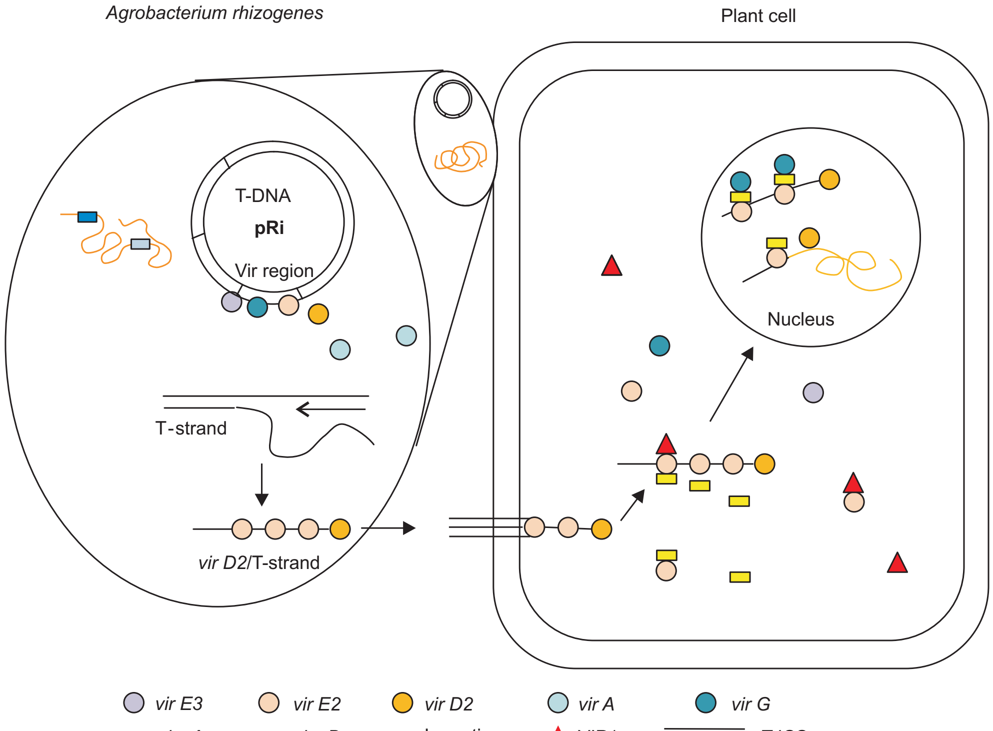
2 毛状根体系在药用植物次生代谢产物生产中的研究进展

植物次生代谢产物被广泛应用于药物、香料、化妆品、染料等领域，但它在植物中的含量一般较低。通过对植物次生代谢产物合成途径的解析，在体外可通过化学合成法或半合成法对其有效成分进行合成，但在实际工业生产中仍存在各种各样的问题，如工艺流程复杂、成本高昂、排放物对环境造成污染等，因此研究植物次生代谢产物的代谢工程成为生命科学领域的热点问题之一。

利用生物技术生产植物次生代谢产物的方式主要有植物细胞培养和植物器官培养两种，目前只有小檗碱等很少种类的植物次生代谢产物可通过工业化的植物细胞培养技术生产。制约植物细胞培养的主要因素是细胞生长缓慢且对生产环境要求苛刻、生产成本高、实现大规模化生产困难等，迫切需要改良原有培养方式或探究新的技术，其中毛状根的培养技术发展迅速，已被国内外学者广泛研究与应用(表 1)。毛状根培养技术的主要特点是激素自养型、生长速度快、遗传和生化性状稳定且能够产生并积累植物重要的有效成分，因此毛状根被认为是获得植物次生代谢产物极为优良的原材料[6]。

2.1 绿色毛状根

国内外已有大量研究表明暗培养获得的毛状根能够生产药用植物的次生代谢产物，而针对某些药用植物次生代谢产物(如长春碱和长春新碱)难以获得的情况，Yoshimatsu 等发现光照培养条件下的毛状根会增加相应的药用植物次生代谢产物，可激活某些酶的活性及促进光诱导的叶绿体代谢物产生[43]，叶绿素的含量可能与某些药用成分的合成存在相关性。这些在光照条件下培养获得的毛状根因会逐渐变绿(即产生叶绿素)而被称为绿色毛状根(green hairy roots)[5]。杨睿等通过对水母雪莲(*Saussurea medusa*)毛状根在光周期 18 h/d 条件下进行培养，发现其毛状根呈现黄绿色，生长量



vir：Virulence；*chv*：Chromosomal virulence；T4SS：Type IV Secretion System.

图 1 发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物遗传转化机理[15]

Fig. 1 Genetic transformation mechanism in plants mediated by Ri plasmid *Agrobacterium rhizogenes*

表 1　毛状根在植物次生代谢产物生产中的应用
Table 1　Research on active secondary metabolite production in plants using hairy roots culture

植物种类 Plant species	科属 Family and genera	有效成分 Active secondary metabolites	文献来源 References
曼陀罗 *Datura stramonium*	茄科曼陀罗属	东莨菪碱、莨菪碱	孙际薇等(2013)[12]
钝叶决明 *Cassia obtusifolia*	豆科决明属	可溶性蛋白、氨基酸等	李素红等(2013)[17]
白花曼陀罗 *Datura metel*	茄科曼陀罗属	东莨菪碱、东莨胆碱	张显强等(2012)[13]
长春花 *Catharanthus roseus*	夹竹桃科长春花属	长春碱等总生物碱	杨致荣等(2012)[18]
花生 *Arachis hypogaea*	豆科花生属	白藜芦醇	姚庆收等(2012)[19]
圆叶牵牛 *Pharbitis purpurea*	旋花科牵牛属	咖啡酸、咖啡酸乙酯	徐大卫(2012)[20]
新疆紫草 *Arnebia euchroma*	紫草科软紫草属	紫草素及其衍生物	芦韦华等(2012)[21]
南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei*	红豆杉科红豆杉属	紫杉醇	王颖芳等(2012)[22]
黄芩 *Scutellaria baicalensis*	唇形科黄芩属	黄芩苷	齐香君等(2012)[23]
乌桕 *Sapium sebiferum*	大戟科乌桕属	老鹳草素	黄素梅等(2011)[24]
紫锥菊 *Echinacea purpurea*	菊科紫松果菊属	多糖	杨世海等(2011)[25]
甘草 *Glycyrrhiza uralensis*	豆科甘草属	甘草黄酮	卢虹玉等(2011)[26]
Rauwolfia serpentina	夹竹桃科萝芙木属	利血平	Mehrotra 等(2013)[27]
印度人参 *Withania somnifera*	茄科睡茄属	睡茄内酯 A	Praveen 等(2013)[28]
西洋参 *Panax quinquefolium*	五加科人参属	人参皂甙	Kochan 等(2013)[29]
金盏花 *Calendula offcinalis*	菊科金盏菊属	齐墩果酸苷	Długosz 等(2013)[30]
Dracocephalum kotschyi	唇形科青兰属	迷迭香酸、类黄酮	Fattahi 等(2013)[31]
菊苣 *Cichorium intybus*	菊科菊苣属	新木脂素双葡萄糖苷	Malarz 等(2013)[32]
大花红景天 *Rhodiola crenulata*	景天科红景天属	红景天甙	Lan 等(2013)[33]
桔梗铃当花 *Platycodon grandiflorum*	桔梗科桔梗属	植物甾醇、三萜烯	Kim 等(2013)[34]
大红罂粟 *Papaver bracteatum*	罂粟科罂粟属	吗啡喃类生物碱	Sharafi 等(2013)[35]
水飞蓟 *Silybum marianum*	菊科水飞蓟属	黄酮木脂素	Rahnama 等(2013)[36]
匙羹藤 *Gymnema sylvestre*	萝藦科匙羹藤属	匙羹藤酸	Nagella 等(2013)[37]
Coleus blumei	唇形科鞘蕊花属	酚类物质	Vukovica 等(2013)[38]
香青兰 *Dracocephalum moldavica*	唇形科青兰属	迷迭香酸	Weremczuk-Jeżyna 等(2013)[39]
鞑靼荞 *Tartary Buckwheat*	蓼科荞麦属	类苯基丙烷	Thwe 等(2013)[40]
高丽参 *Panax ginseng*	五加科人参属	Rg3 人参皂苷	Kim 等(2013)[41]
短小蛇根草 *Ophiorrhiza pumila*	茜草科蛇根草属	喜树碱	Asano 等(2013)[42]

是全黑暗培养的 2.1 倍，是全光照培养的 1.2 倍；有效成分总黄酮的合成量为 1179 mg/L，比全黑暗培养提高了 160%，比全光照培养提高了 20%[44]。紫锥菊(*Echinacea purpurea*)能够产生咖啡酸衍生物(caffeic acid derivatives，CADs)，包括单咖啡酰酒石酸、咖啡酸、绿原酸以及菊苣酸，Abbasi 等研究显示诱导的紫锥菊毛状根在光照条件下培养有助于其次生代谢产物咖啡酸衍生物的合成[45]。

2.2　基因过表达在毛状根次生代谢产物合成过程中的研究

基因工程中的过表达可被用于研究植物毛状根中次生代谢产物的合成途径，现已引起国内外学者的重视。Rahnama 等通过分子生物学手段对矮牵牛(*Petunia hybrida* Vilm)花 *chs*A 基因与水飞蓟(*Silybum marianum* (Linn.) Gaertn.)基因组进行整合获得了转基因水飞蓟毛状根，研究了 *chs*A 基因的过表达对水飞蓟毛状根中水飞蓟素含量的影响，发现转基因水飞蓟毛状根中水飞蓟素的含量提高了 10 倍，同时证明了矮牵牛花 *chs*A 基因在水飞蓟毛状根中的过表达不会引起基因沉默，反而使黄酮木质素的合成量增加[36]。Sharafi 等对吗啡喃类生物碱合成途径中 *Sal*AT (7-o-acetyltransferase)基因的过表达进行了研究，结果显示通过发根农杆菌介导 *Sal*AT 基因的过表达可提高罂粟毛状根中吗啡喃类生物碱的含量[35]。朱宽鹏等为验证 *Fm-STS* (*Fallopia multiflora*-Stilbene Synthase)基因功能，采用 RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)扩增技术得到 *Fm-STS* 基因的 cDNA 序列，再通过构建过表达质粒 pBIN-35S-STS-GFP(阳性)和双链 RNA 干扰(RNA interference，RNAi)重组质粒 pBIN-35S-正向-反向-GFP(阴性)

对何首乌毛状根进行转化，结果表明 *Fm-STS* 基因过量表达与双链 RNA 干扰相结合在植物基因功能研究中有良好的应用[46]。基因的过表达为代谢工程领域中植物次生代谢产物有效成分含量的提高提供了新思路。

2.3 RNAi 介导毛状根在植物次生代谢产物合成过程中的研究

基因沉默技术已被应用于植物毛状根功能缺失的研究中，已有很多文献介绍了以模式植物烟草诱导的毛状根进行 RNAi 研究来阐明植物次生代谢产物的合成途径。Kajikawa 等通过 RNAi 实现 PIP（Prolactin Inducible Protein）家族中 *A622L* 还原酶基因（A662-like reductases）对烟草中吡啶生物碱合成的作用[47]。Hücherig 等通过彩叶草毛状根中 *HPPR*（Hydroxyphenylpyruvate Reductase）基因、*RAS*（Rosmarinic Acid Synthase）基因的 RNAi 抑制及其过表达来研究迷迭香酸的合成途径，结果表明 RNAi 的抑制作用不明显[48]。张蕾等利用发根农杆菌 ACCC 10060 介导丹参牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶 1 基因（*Salvia miltiorrhiza* geranylgeranyl pyrophosphate synthase 1，*SmGGPS1*）的 RNAi 重组载体转化丹参叶片，产生 *SmGGPS1* 的 RNAi 转基因毛状根，获得 *SmGGPS1*-RNAi2 和 *SmGGPS1*-RNAi3 转基因毛状根 301 根和 399 根，平均转化率为 60.34%，首次建立了发根农杆菌介导的外源基因转化丹参体系[49]。

植物毛状根有望成为新的模式体系并用于功能基因组学的研究，通过双元载体的构建来研究目的基因在毛状根体系中的抑制及过表达，从而解析植物次生代谢产物的合成途径。

3 展望

毛状根作为一种药用植物次生代谢产物的生产材料具有广阔的市场前景，但绝大多数毛状根药用成分提取往往不能满足市场需求，需通过对植物次生代谢产物合成途径中关键基因的调控来实现该过程中关键酶或中间产物合成的调节，从而提高其药用成分含量，减少类似物含量或种类，进而降低生产成本。因此对毛状根药用成分进行深入的分子生物学解析将成为以后的研究焦点和发展趋势。

目前，我国对植物毛状根的研究还主要停留在体系构建等方面，如外植体的选择、菌株的选择、侵染条件的探究以及不同理化因子对产量的影响等[6,10,11]，而对于毛状根中有效药用成分的代谢合成机理研究较少。若能进一步从基因水平上对其进行表达调控，这将在很大程度上促进毛状根工业化生产的进程。

在今后的研究中，植物毛状根体系将从药用成分的生产走向更宽广的应用领域，如将 Ri 质粒介导的不定根作为污染物降解的新材料；同时，毛状根也将成为植物修复领域的热点研究对象[50]；毛状根作为重组药用蛋白表达系统，以其生物活性高、成本低、规模化培养技术成熟等优势将在药用蛋白方面的研究中发挥更重要的作用[51]。因此，Ri 质粒介导的植物毛状根体系作为一种基础材料，将为植物药用成分的生产及在其他领域的研究应用做出更深远的贡献。

参考文献：

[1] Stewart FC，Rolfs FM，Hall FH. A fruit disease survey of western New York in 1900［J］. *New York Agric Exp Sta Bull*，1990，191：291-331.

[2] Smith EF，Townsend CO. A plant-tumor of bacterial origin［J］. *Science*，1907，25（643）：671-673.

[3] Chilton MD，Tepfer DA，Petit A. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells［J］. *Nature*，1982，295：432-434.

[4] 雷和田，宋经元，祁建军，张荫麟，杨峻山. Ti 和 Ri 质粒对栝楼双转化的研究［J］. 中国中药杂志，2001，26（3）：162-165.

[5] Sharma P，Padh H，Shrivastava N. Hairy root culture：a suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants［J］. *Eng Life Sci*，2013，13（1）：62-75.

[6] 孙敏. 药用植物毛状根培养与应用［M］. 重庆：西南师范大学出版社，2011.

[7] 邱德有，宋经元，马小军，祁建军，张荫麟. 丹参毛状根生物反应器大规模培养的研究［J］. 分子植物育种，2004，2（5）：699-703.

[8] 宋经元，祁建军，雷和田，张荫麟. 丹参的生物技术［J］. 天然产物研究与开发，1999，11（4）：86-89.

[9] Christey MC. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants［J］. *In Vitro Cell*

Dev-Pl, 2001, 37(6): 687–700.

[10] 宋经元, 祁建军, 雷和田, 任春玲, 张荫麟. 农杆菌介导的药用植物的转化[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(2): 73–76.

[11] 杨慧洁, 杨世海. 发根农杆菌介导的药用植物遗传转化研究[J]. 生物技术通报, 2009(1): 16–21.

[12] 孙际薇, 张鸿, 王凤英. 茉莉酸甲酯对曼陀罗毛状根中主要莨菪烷类生物碱成分积累和释放的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1712–1718.

[13] 张显强, 罗正伟, 张鸿, 王凤英, 孙际薇, 孙敏. 白花曼陀罗毛状根的诱导及东莨菪碱和莨菪碱的合成[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3223–3228.

[14] Gelvin SB. Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation[J]. *Ann Rev Phytopathol*, 2010, 48: 45–68.

[15] Chandra S. Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism[J]. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(3): 407–415.

[16] Sinkar VP, White FF, Furner LJ, Abrahamsen M, Pythoud I, Cordon MP. Reversion of aberrant plants transformed with *Agrobacterium rhizogenes* is associated with the transcriptional inactivation of the T_L-DNA genes[J]. *Plant Physiol*, 1988, 86(2): 584–590.

[17] 李素红, 章艳玲, 谭燕, 米瑶, 黄靖, 南志奇, 李关荣. 决明毛状根、实生根及决明子的化学成分比较研究[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2013, 38(8): 114–118.

[18] 杨致荣, 王兴春, 薛金爱, 李润植. 发根农杆菌介导的长春花高效转基因体系的建立[J]. 植物生理学报, 2012, 48(10): 997–1004.

[19] 姚庆收, 姜吉刚, 单长民, 武玉永, 于敏. 花生毛状根的高频诱导及 NAA 和 2,4-D 对花生毛状根生长和白藜芦醇含量的影响[J]. 药物生物技术, 2012, 19(6): 507–511.

[20] 徐大卫, 王倩倩, 王鹏飞, 杨世海. 外源激素对圆叶牵牛毛状根生长及次生代谢产物积累的影响[J]. 中国现代中药, 2012, 14(10): 32–36.

[21] 芦韦华, 陈永芳, 王芳, 代宁波, 郝爱花, 李翠芳, 嘉素尔. 理化条件对新疆紫草毛状根培养及紫草素含量的影响[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(1): 50–54.

[22] 王颖芳, 韩彬, 李钟, 贾真, 陈艳芬, 胡旭光, 杨泽民. 南方红豆杉毛状根诱导体系的建立及毛状根中紫杉醇的分离纯化研究[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(7): 149–152.

[23] 齐香君, 李雅, 施春阳. 光质对黄芩毛状根生长及黄芩苷含量的影响[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(6): 3334–3411.

[24] 黄素梅, 石丸幹二. 乌桕毛状根培养与次生代谢产物累积研究[J]. 北方园艺, 2011(22): 103–105.

[25] 杨世海, 毕晓秀, 杨慧洁. 紫锥菊毛状根诱导及离体培养[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(20): 1557–1562.

[26] 卢虹玉, 刘敬梅, 张海超. 甘草毛状根诱导培养及其黄酮含量检测的研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(11): 814–818.

[27] Mehrotra S, Goel MK, Rahman LU. Molecular and chemical characterization of plants regenerated from Ri-mediated hairy root cultures of *Rauwolfia serpentina*[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2013, 114(1): 31–38.

[28] Praveen N, Murthy HN. Withanolide A production from *Withania somnifera* hairy root cultures with improved growth by altering the concentrations of macro elements and nitrogen source in the medium [J]. *Acta Physiol Plant*, 2013, 35(3): 811–816.

[29] Kochan E, Wasiela M, Sienkiewicz M. The production of ginsenosides in hairy root cultures of American Ginseng, *Panax quinquefolium* L. and their antimicrobial activity[J]. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 2013, 49(1): 24–29.

[30] Długosz M, Wiktorowska E, Wiśniewska A, Paczkowski C. Production of oleanolic acid glycosides by hairy root established cultures of *Calendula officinalis* L.[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2013, 60(3): 467–473.

[31] Fattahi M, Nazeri V, Torras-Claveriac L. A new biotechnological source of rosmarinic acid and surface flavonoids: hairy root cultures of *Dracocephalum kotschyi* Boiss [J]. *Ind Crop Prod*, 2013, 50: 256–263.

[32] Malarz J, Stojakowska A, Szneler E, Kisiel W. A new neolignan glucoside from hairy roots of *Cichorium intybus*[J]. *Phytochemistry Letters*, 2013, 6(1): 59–61.

[33] Lan XZ, Chang K, Zeng LJ, Liu XQ, Qiu F, Zheng WL, Quan H, Liao ZH, Chen M, Huang WL, Liu

WH, Wang Q. Engineering salidroside biosynthetic pathway in hairy root cultures of *Rhodiola crenulata* based on metabolic characterization of tyrosine decarboxylase[J]. *Plos One*, 2013, 8(10): 1-10.

[34] Kim YK, Kim JK, Kim YB, Lee S, Kim S U, Park SU. Enhanced accumulation of phytosterol and triterpene in hairy root cultures of *Platycodon grandiflorum* by overexpression of *Panax ginseng* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase [J]. *J Agr Food Chem*, 2013, 61(8): 1928-1934.

[35] Sharafi A, Hashemi Sohi H, Mousavi A, Azadi P, Dehsara B, Hosseini Khalifani B. Enhanced morphinan alkaloid production in hairy root cultures of *Papaver bracteatum* by over-expression of salutaridinol 7-o-acetyltransferase gene via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 29(11): 2125-2131.

[36] Rahnama H, Razi Z, Dadgar MN, Hasanloo T. Enhanced production of flavonolignans in hairy root cultures of *Silybum marianum* by over-expression of *chalcone synthase* gene[J]. *J Plant Biochem Biotechnol*, 2013, 22(1): 138-143.

[37] Nagella P, Thiruvengadam M, Jung SJ, Murthy HN, Chung IM. Establishment of *Gymnema sylvestre* hairy root cultures for the production of gymnemic acid[J]. *Acta Physiol Plant*, 2013, 35(10): 3067-3073.

[38] Vukovica R, Bauerb N, Curkovic-Perica M. Genetic elicitation by inducible expression of β-cryptogein stimulates secretion of phenolics from *Coleus blumei* hairy roots[J]. *Plant Sci*, 2013, 199-200: 18-28.

[39] Weremczuk-Jeżyna I, Grzegorczyk-Karolak I, Frydrych B, Królicka A. Wysokińska H. Hairy roots of *Dracocephalum moldavica*: rosmarinic acid content and antioxidant potential[J]. *Acta Physiol Plant*, 2013, 35(7): 2095-2103.

[40] Thwe AA, Kim JK, Li XH, Kim YB, Uddin MR, Kim SJ, Suzuki T, Park N, Park SU. Metabolomic analysis and phenylpropanoid biosynthesis in hairy root culture of *Tartary buckwheat* cultivars [J]. *Plos One*, 2013, 8(6): 1-9.

[41] Kim OT, Yoo NH, Kim GS, Kim YC, Bang KH, Hyun DY, Kim SH, Kim MY. Stimulation of Rg3 ginsenoside biosynthesis in ginseng hairy roots elicited by methyl jasmonate[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2013, 112(1): 87-93.

[42] Asano T, Kobayashi K, Kashihara E, Sudo H, Sasaki R, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Saito K, Yamazaki M. Suppression of camptothecin biosynthetic genes results in metabolic modification of secondary products in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*[J]. *Phytochemistry*, 2013, 91: 128-139.

[43] Yoshimatsu K, Satake M, Shimomura K, Sawada JI, Terao T. Determination of cardenolides in hairy root cultures of *Digitalis lanata* by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *J Nat Prod*, 1990, 53(6): 1498-502.

[44] 杨睿, 付春祥, 金治平, 赵德修. 不同理化因子对雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响[J]. 生物工程学报, 2005, 21(2): 233-238.

[45] Abbasi BH, Tian CL, Murch SJ, Saxena PK, Liu CZ. Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy root cultures of *Echinacea purpurea* [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(8): 1367-1372.

[46] 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.

[47] Kajikawa M, Hirai N, Hashimoto T. T6 protein is required for biosynthesis of tobacco alkaloids[J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 69(3): 287-298.

[48] Hücherig S, Petersen M. RNAi suppression and overexpression studies of hydroxyphenylpyruvate reductase (*HPPR*) and rosmarinic acid synthase (*RAS*) genes related to rosmarinic acid biosynthesis in hairy root cultures of *Coleus blumei*[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2013, 113(3): 375-385.

[49] 张蕾, 程义勇, 漆小泉, 高志贤. 发根农杆菌介导丹参牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶 1 基因 RNA 干扰载体的转化[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(6): 786-788.

[50] Agostini E, Talano MA, Gonzalez PS, Oller ALW, Medina MI. Application of hairy roots for phytoremediation: what makes them an interesting tool for this purpose[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(3): 1017-1030.

[51] 潘学武, 董妍玲, 韩晓红. 极具潜力的重组药用蛋白的毛状根表达系统研究[J]. 北方园艺, 2012(7): 196-198.

（责任编辑：刘艳玲）