

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2019.10093

李琰, 赵磊, 温鹏飞, 葛付华, 张兴. 摆瓶培养条件下雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的研究[J]. 植物科学学报, 2019, 37(1): 93~100

Li Y, Zhao L, Wen PF, Ge FH, Zhang X. Study on the adventitious root culture of *Tripterygium wilfordii* under shaking culture conditions [J]. Plant Science Journal, 2019, 37(1): 93~100

摇瓶培养条件下雷公藤不定根生长 及次生代谢产物含量的研究

李琰^{1,2*}, 赵磊^{1,2}, 温鹏飞^{1,2}, 葛付华¹, 张兴²

(1. 西北农林科技大学生命科学学院, 陕西杨凌 712100; 2. 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西杨凌 712100)

摘要: 以雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 不定根为材料, 研究摇瓶悬浮培养条件下接种密度、装液比例、逐级放大、消泡剂、大孔吸附树脂种类及浓度对雷公藤不定根增长量、不定根及培养基中雷公藤内酯醇、雷公藤吉碱、雷公藤次碱含量的影响。结果显示, 接种密度在 15 g/L (FW) 时较适合不定根的继代培养和次生代谢产物的积累。250 mL 摆瓶中装入 100 mL 培养基, 即装液量为 2/5 时, 培养基利用率最高。随着摇瓶体积的逐渐放大, 不定根增长量和 3 种次生代谢产物含量略有下降, 5 L 摆瓶中不定根增长量为对照的 91.6%, 内酯醇、吉碱和次碱的含量分别为对照的 91.8%、91.7% 和 96.9%。6 种大孔吸附树脂中, XAD-7 处理对不定根的生长有明显促进作用, 培养结束时, 3 种次生代谢产物产量显著提高, 当 XAD-7 浓度为 0.5 g/瓶时不定根增长量为对照的 1.2 倍, 内酯醇、吉碱和次碱产量最高, 分别为对照的 2.9、2.4 和 2.2 倍。培养基中添加消泡剂后不定根增长量、3 种次生代谢产物总产量均不同程度下降, 其中, LX-603 处理后, 虽然不定根增长量为对照的 85%, 内酯醇、吉碱和次碱产量分别为对照的 78%、64% 和 87%, 但明显抑制了培养过程中泡沫的产生。研究结果表明筛选的摇瓶逐级放大培养雷公藤不定根的方法效果较好, 可为雷公藤不定根生物反应器放大培养奠定基础。

关键词: 雷公藤; 不定根; 摆瓶培养; 次生代谢产物

中图分类号: Q946.8

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2019)01-0093-08

Study on the adventitious root culture of *Tripterygium wilfordii* under shaking culture conditions

Li Yan^{1,2*}, Zhao Lei^{1,2}, Wen Peng-Fei^{1,2}, Ge Fu-Hua¹, Zhang Xing²

(1. College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Shaanxi Province Technology and Engineering Center of Biopesticide, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: *Tripterygium wilfordii* Hook. f., adventitious roots were used *in vitro* to study the effects of inoculation density, liquid medium volume per flask, step-by-step amplification, defoaming agent, macroporous adsorption (MA) resin type, and concentrations of triptolide, wilforgine, and wilforine in roots and medium on adventitious root growth after shake-flask culture. Results showed that an inoculation density of 15 g/L was suitable for the subculture of adventitious roots and accumulation of secondary metabolite. The medium utilization rate was the highest in a 250-mL flask with 100 mL of liquid medium. Adventitious root growth declined

收稿日期: 2018-07-09, 退修日期: 2018-09-01。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272110); 国家高技术研究发展计划(863)项目子课题(2011AA10A202)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31272110) and National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2011AA10A202)。

作者简介: 李琰(1971-), 女, 博士, 副教授, 主要从事经济植物细胞培养及次生代谢研究(E-mail: ly2659@163.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: ly2659@163.com)。

slightly with the increase in flask volume. In a 5-L bottle, the adventitious root growth and triptolide, wilforgine, and wilforine concentrations were 91.6%, 91.8%, 91.7%, and 96.9%, respectively, compared to the control, XAD-7 resin markedly enhanced adventitious root growth and secondary metabolite content among the six kinds of MA resin. The adventitious root growth and triptolide, wilforgine, and wilforine content increased 1.2-, 2.9-, 2.4-, and 2.2-fold, respectively, compared to the control when XAD-7 resin was at 0.5 g/bottle. Adventitious root growth and secondary metabolite content all decreased at differing degrees when the defoaming agent was added to the medium. Adventitious root growth and triptolide, wilforgine, and wilforine contents were 85%, 78%, 64%, and 87%, respectively, compared to the control when LX-603 was added to the medium; however, foam was markedly inhibited during the culturing process. This study demonstrated that step-by-step amplification was a feasible approach for adventitious root culture. Furthermore, this research provides the basis for the scale-up culture of *T. wilfordii* adventitious roots using a bioreactor.

Key words: *Tripterygium wilfordii*; Adventitious roots; Shaking culture; Secondary metabolite

雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)作为传统的杀虫植物,在古书中有“菜虫药”之称,早在20世纪30年代我国就开始对雷公藤的杀虫作用进行研究^[1]。因其杀虫活性较好,1935年被引种到美国,用于小菜蛾(*Plutella xylostella* L.)、菜青虫(*Pieris rapae* L.)和苹果小卷蛾(*Adoxophyes orana* Fischer von Roslerstamm)的防治^[2]。自20世纪70年代初发现雷公藤具有抗肿瘤、抗风湿^[3]等作用后,研究重心转向医学。随着科学技术的发展,对雷公藤的研究也不断深入,发现其次生代谢产物中的雷公藤内酯醇具有抗炎、免疫抑制、避孕及提高抗癌性等作用^[4-6],雷公藤生物碱对菜青虫、粘虫(*Mythimna separata* Walker)等均有较好的毒杀、拒食及种群抑制等作用^[7-9]。雷公藤为木本植物,其有效成分主要存在于根皮中^[10-13],一般人工种植7年,根直径达2~3 cm时才能达到用药标准^[14]。

为了保护自然资源,更好地发展雷公藤产业,本实验室通过组培技术对雷公藤次生代谢产物开展了一系列研究,从雷公藤不定根中获得了雷公藤内酯醇且含量超过自然生长的根皮^[15, 16]。但是,在使用三角瓶或发酵罐进行液体培养时,为了增加发酵液中的溶氧密度,一般会采用摇床连续转动或剧烈搅拌,而此过程易产生过量泡沫,造成漫灌跑液、使发酵罐容积利用率低、易染菌、影响氧气传递、代谢气体不易排出而影响呼吸作用等^[17, 18]。为了解决这一问题,生产中往往会添加一定的消泡剂来缓解泡沫的产生。

基于此,本实验进一步对消泡剂、逐级放大、接种密度、装液量以及大孔吸附树脂等相关条件进行筛选,以期为雷公藤不定根生物反应器放大培养奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂及仪器

雷公藤不定根为本实验室经过多次继代培养保存的材料。雷公藤内酯醇、雷公藤吉碱和雷公藤次碱标准品由上海同田生物技术有限公司提供。大孔吸附树脂XAD-2、XAD-7、HP-20、ADS-8和ADS-F8为分析纯(郑州勤实科技有限公司)。消泡剂LX-603(上海立奇化工)、FB(江苏康力)为食品级。乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂为分析纯。实验仪器为高效液相色谱仪(Waters 600E, Milford, USA)、Waters 2478紫外检测器。

1.2 实验方法

1.2.1 雷公藤不定根生长及对次生代谢产物含量的影响

(1)接种密度对不定根生长及次生代谢产物含量的影响实验:接种密度分别为5、10、15、30、60 g/L不定根(FW);(2)装液量对不定根生长及次生代谢产物含量的影响实验:选用250 mL摇瓶,分别加入培养基50、70、90、100、120、150 mL;(3)逐级放大培养实验:选用250、500、1000、2000、3000、5000 mL摇瓶,分别加入培养基体积为摇瓶体积的2/5;(4)大孔吸附树脂实验:分别加入D201、XAD-2、XAD-7、HP-20、

ADS-8 和 ADS-F8 各 0.5 g/瓶; (5) 大孔树脂最佳添加量实验: 选用 XAD-7, 浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 g/瓶; (6) 消泡剂实验: 选用 LX-603 和 FB, 分别加入 0.1 mL/瓶。

1.2.2 大孔吸附树脂预处理

实验前, 先对大孔吸附树脂进行预处理: 将 D201、XAD-2、XAD-7、HP-20、ADS-8 和 ADS-F8 共 6 种不同型号的大孔吸附树脂用甲醇在 120 r/min 摆床上浸泡清洗 3 次, 每次 5 h。121℃ 灭菌 30 min 后烘干, 密封后室温保存、备用^[19, 20]。

1.2.3 雷公藤不定根中内酯醇、雷公藤吉碱和雷公藤次碱含量的测定

所用培养基均为 MS 附加 4.0 mg/L NAA 和 0.5 mg/L KT, 在高压灭菌前将 pH 值调至 5.8 ~ 6.0, 每组至少设 3 个重复, 培养条件为 (25 ± 1)℃、黑暗培养, 摆床转速为 120 r/min。除特别说明外, 均采用 250 mL 摆瓶加入 100 mL 培养基; 除接种密度实验外, 其它接种密度均为 15 g/L 不定根 (FW), 培养 30 d 后收获不定根及培养基。

将收获的不定根用去离子水冲洗后 50℃ 干燥至恒重, 计算不定根增长量, 计算方法为: 不定根增长量 = 收获量 - 接种量。将不定根粉碎过 100 目筛, 保存于 4℃ 冰箱, 用于测定雷公藤内酯醇、雷公藤吉碱和雷公藤次碱含量。将培养液分离后保存于 4℃ 冰箱, 用于测定雷公藤内酯醇、雷公藤吉碱和雷公藤次碱含量。雷公藤不定根及培养基中雷公藤内酯醇、雷公藤吉碱和雷公藤次碱的提取及含量测定参照文献^[21, 22]的方法。

1.3 数据处理

采用 SPSS v16.0 软件对数据进行 ANOVA 方差分析, 用 Duncan's 新复极差法检验数据之间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 接种密度对雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的影响

在摇瓶培养时, 随着时间的延长不定根容易结块, 所以在接种时需要把结块的不定根分开, 但散开的不定根在培养过程中容易死亡。研究结果显示(图 1), 将结块分离成 5 g 左右的小块, 在培养早期不定根生长缓慢, 进入对数期较晚, 需延长培养

时间; 结块鲜重在 15 g 时较适合继代培养, 并且次生代谢产物含量也逐渐增加; 结块过大不仅浪费材料, 不定根增长量也明显下降。不定根中次生代谢产物含量随着接种量的增加而下降, 这可能是接种量过大时不定根的生长时间较短, 次生代谢产物积累量也随之下降。

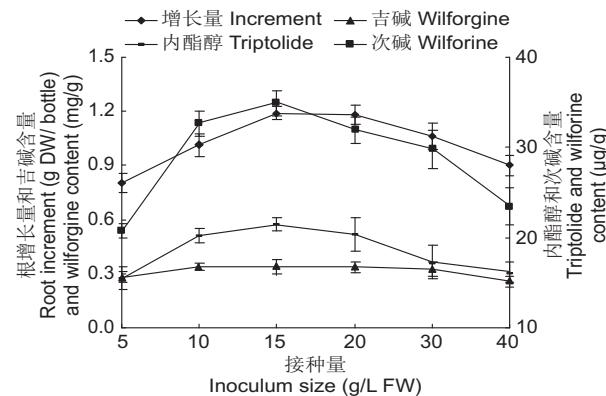


图 1 接种量对雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的影响

Fig. 1 Effects of inoculum size on growth and secondary metabolite content in the adventitious roots of *Tripterygium wilfordii*

2.2 装液量对雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的影响

研究结果显示, 在 250 mL 摆瓶中装入不同体积的培养基, 不定根的增长量差异较大(图 2)。收获时, 每瓶不定根增长量随着培养基体积的增加而增加, 即当装液量为培养瓶的 2/5 时不定根增长量最大, 此时培养基的利用率最高(考虑到培养基的利用效率, 将增长量换算成每 100 mL 培养基的增长量), 其不定根增长量为 150 mL 培养基的 1.1 倍。

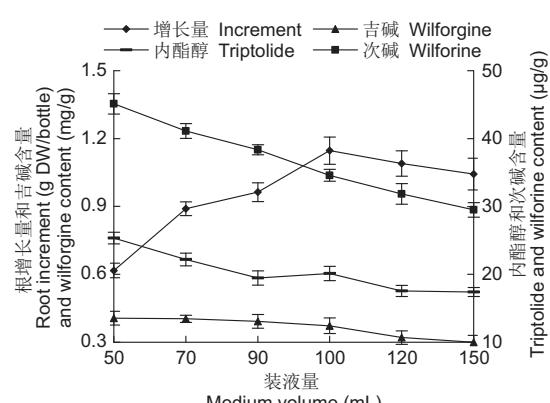


图 2 装液量对雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的影响

Fig. 2 Effects of medium volume on growth and secondary metabolite content in the adventitious roots of *T. wilfordii*

倍。不定根中内酯醇和生物碱含量随着每瓶培养基体积的增加而下降，可能是因为随着培养基体积的增大，无氧呼吸加剧，抑制了不定根中次生代谢产物的合成。

2.3 逐级放大对雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的影响

在不同体积的摇瓶中，按摇瓶体积的2/5加入培养基，在同一条件下震荡培养，随着摇瓶体积的增大，每100 mL培养基不定根增长量略有下降，在3 L摇瓶中不定根增长量为对照的80.4%，而5 L的摇瓶中不定根增长量为对照的91.6%（图3）。随着摇瓶体积的逐渐增大，不定根中内酯醇及生物碱含量均逐渐下降，在3 L摇瓶中含量最低，内酯醇、吉碱和次碱含量分别为对照的77.2%、81.3%和81.6%，但在5 L摇瓶中，这3种代谢产物含量略有上升，分别为对照的91.8%、91.7%和96.9%。

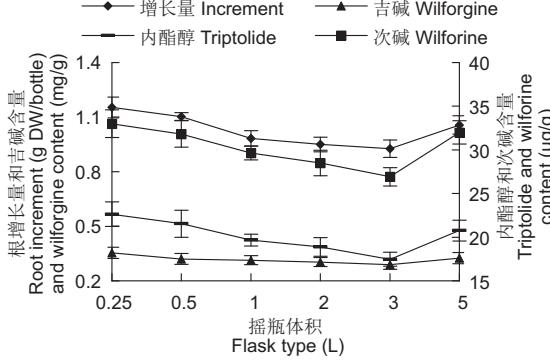


图3 摆瓶体积对雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的影响

Fig. 3 Effects of flask type on growth and secondary metabolite content in the adventitious roots of *T. wilfordii*

2.4 大孔吸附树脂对雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的影响

2.4.1 大孔吸附树脂类型对雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的影响

培养基中加入大孔树脂后，不定根增长量及次生代谢产物含量均发生了较大变化（图4）。其中，XAD-7和ADS-F8处理后不定根增长量均明显高于对照；添加ADS-F8后不定根增长量为对照的1.3倍；添加XAD-2后不定根增长量最低，仅为对照的19%。由于大孔树脂的吸附作用，不定根中内酯醇含量明显下降，其中，D201处理的内酯醇含量最少，为对照的21.4%，而不定根中吉碱和次碱

含量除了XAD-2明显低于对照外，其余均接近或高于对照，其中D201处理吉碱含量最高，XAD-7处理次碱含量最高，均为对照的1.3倍。大孔吸附树脂处理后，培养结束时培养基中次生代谢物含量差异较大（图5），其中，XAD-7处理后培养基中3种次生代谢产物含量提高最明显，内酯醇含量为对照的3.3倍，吉碱和次碱的含量分别为对照的17.6和4.4倍。通过大孔树脂吸附处理后，不定根中次生代谢产物含量虽明显下降，但培养基中次生代谢产物的积累明显升高，因此每瓶中次生代谢产物总产量明显提高（图6）。其中XAD-7处理后，内酯醇、吉碱和次碱产量最高，分别为对照的2.9倍、2.4倍和2.2倍。

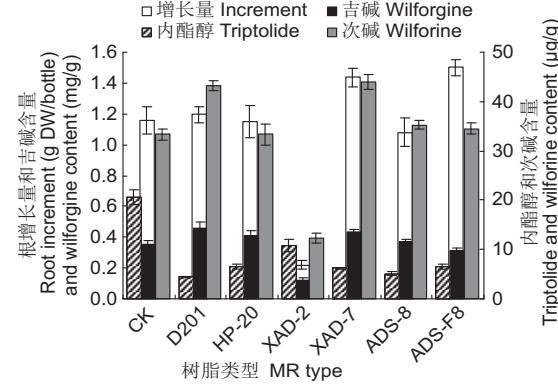


图4 树脂类型对雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的影响

Fig. 4 Effects of MR (resin) type on growth and secondary metabolite content in the adventitious roots of *T. wilfordii*

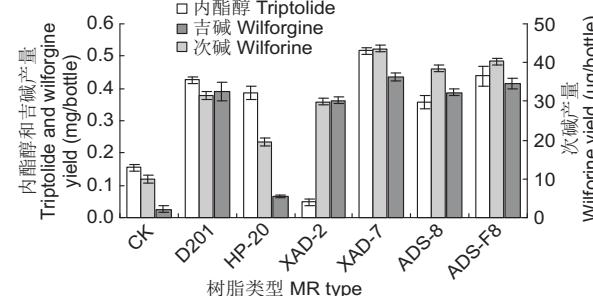


图5 树脂类型对培养基中次生代谢产物产量的影响

Fig. 5 Effects of MR (resin) type on secondary metabolite yield in culture medium of *T. wilfordii* adventitious roots

2.4.2 大孔吸附树脂添加量对雷公藤不定根生长和次生代谢物含量的影响

培养基中添加低浓度的XAD-7对不定根生长及次生代谢产物的积累有明显促进作用。当XAD-7浓度在0~0.5 g/瓶时，不定根增长量随XAD-7浓度的增加而增加，0.5 g/瓶时不定根增长量为对照

的1.2倍(图7)。但随着XAD-7浓度的继续增加,不定根逐渐变短、卷曲,生长速度明显下降,当浓度达1.0 g/瓶时不定根增长量仅为对照的63%。随着XAD-7浓度的增加树脂的吸附作用越来越强,不定根中内酯醇等次生代谢产物含量逐渐下降,培养结束时,XAD-7浓度为0.5 g/瓶的培养瓶中3种次生代谢产物的总产量最高,随着XAD-7浓度的增加,次生代谢产物均呈下降趋势。

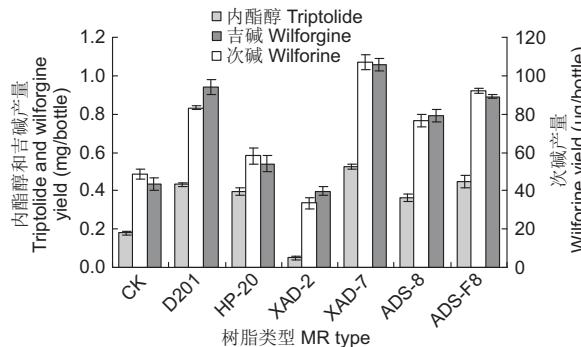


图6 树脂类型对雷公藤不定根及培养基中次生代谢物总产量的影响

Fig. 6 Effects of MR (resin) type on secondary metabolite yield per flask of *T. wilfordii* adventitious roots

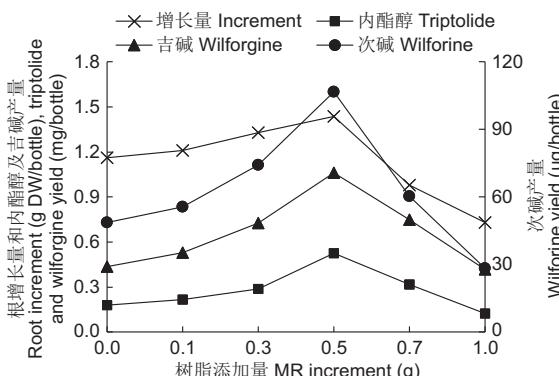


图7 树脂添加量对雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的影响

Fig. 7 Effects of MR (resin) increment on growth and secondary metabolite content in the adventitious roots of *T. wilfordii*

2.5 消泡剂对雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的影响

不定根在发酵罐中进行培养时会产生大量气泡,泡沫过量会造成发酵罐容积利用率降低,从而影响氧的传递,因此需要在培养基中添加消泡剂来减少其对不定根生长的影响。实验结果显示,LX-603和FB两种消泡剂均能抑制泡沫产生,但对不定根生长及不定根中次生代谢产物含量均有不同程度的抑制作用(图8),添加LX-603和FB后,

不定根增长量分别为对照的85%和60%,不定根中内酯醇含量分别为对照的98%和61%;添加LX-603后不定根中吉碱和次碱含量分别为对照的74%和85%,均高于FB。添加消泡剂对培养基中次生代谢产物的产量也有不同程度的影响(图9),其中,添加LX-603处理的影响相对较小,内酯醇和吉碱产量分别为对照的77%和70%,次碱产量最高,为对照的1.4倍。添加FB后,内酯醇、吉碱和次碱产量分别为对照的95%、39%和43%。培养基中添加消泡剂后,雷公藤不定根及培养基中3种次生代谢产物总产量均有不同程度的下降(图10),其中,LX-603处理后,内酯醇、吉碱和次碱产量分别为对照的78%、64%和87%,FB处理后,内酯醇、吉碱和次碱产量分别为对照的89%、25%和45%。因此,目前在没有找到更好的消泡剂之前选用LX-603较为合适。

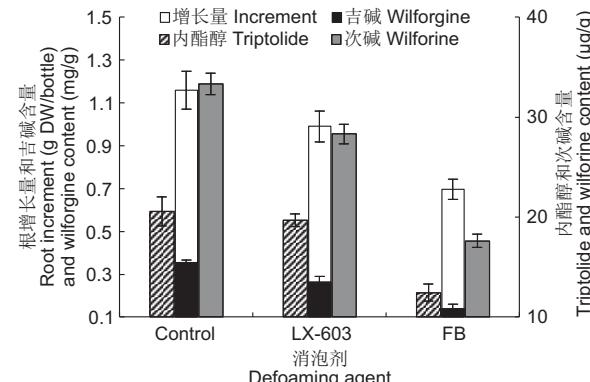


图8 消泡剂对雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的影响

Fig. 8 Effects of defoaming agent on growth and secondary metabolite content in the adventitious roots of *T. wilfordii*

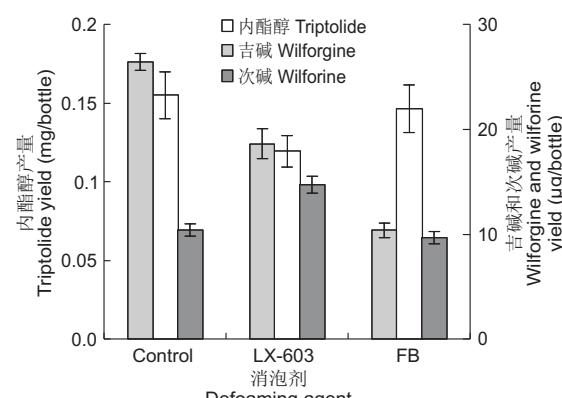


图9 消泡剂对培养基中次生代谢产物产量的影响

Fig. 9 Effects of defoaming agent on secondary metabolite yield in culture medium of *T. wilfordii* adventitious roots

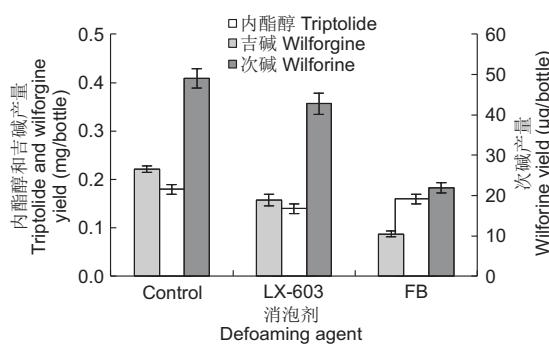


图 10 消泡剂对雷公藤不定根及培养基中次生代谢物总产量的影响

Fig. 10 Effects of defoaming agent on secondary metabolite yield per flask of *T. wilfordii* adventitious roots

3 讨论

组织培养在中试放大前期，即摇瓶培养阶段需要进行接种密度、装液比例、逐级放大等实验以探讨放大培养的可行性。适宜的接种密度不仅能最大限度利用培养基，也能使生物量和次生代谢产物达到最佳状态^[23-25]。有些培养物的接种密度与生物量有关，而与次生代谢产物含量无关，例如铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.)的接种密度与其多糖含量无关^[24]，而有些培养物接种密度过大容易造成溶氧不足，从而影响不定根生长及其次生代谢产物的合成。姜银姬等^[26]在东北刺人参(*Oplopanax elatus* Nakai.)不定根培养中发现，接种密度在 5 g/L(FW)时，不定根增殖系数最高并且皂苷含量和产量也最高。陈书安等^[27]在藏红花(*Crocus sativus* L.)细胞培养中也发现，接种密度超过 5% 时，不仅细胞生长受到影响且藏红花素产量也逐渐下降。但 Lee 等^[25]研究发现，接种密度越高长春花 (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) 细胞中的阿吗碱和长春碱含量越高。本研究发现，雷公藤不定根接种密度在 15 g/L(FW) 时不定根增长量达到最大值，此时不定根中内酯醇和次碱含量也达到最高，而接种密度对吉碱含量的影响不明显。可见，接种密度与培养物生长量及次生代谢产物合成之间的关系较复杂。我们前期研究发现，雷公藤悬浮细胞最佳接种密度为 10 g/L(FW)^[28]，可能是因为不定根在培养过程中容易结块，而悬浮细胞在液体培养基中分散性较好。

大孔吸附树脂是一类有机高分子聚合物，主要应用于天然药物有效成分的分离、纯化和富集

等^[29]，组织培养时将其添加到培养基中，通过其富集作用可以提高次生代谢产物的产量^[30, 31]。不同型号大孔吸附树脂具有不同的结构和极性，选择适宜型号吸附树脂对于雷公藤等分泌型成分的培养至关重要^[15]。在培养基中添加大孔吸附树脂可以更有效地吸附培养基中的目的产物，但也要考虑是否影响培养物的正常生长。本研究选择了 6 种不同型号的大孔吸附树脂添加到培养基中，考察不定根增长量、不定根及培养液中次生代谢产物的积累情况，结果发现添加 ADS-F8 和 XAD-7 后，显著促进了不定根生长，根增长量分别为对照的 1.3 和 1.2 倍。通过大孔树脂吸附处理后，虽然不定根中次生代谢产物含量有所下降，但培养基中次生代谢产物的积累明显提高，因此，每瓶收获的次生代谢产物总量明显提高。其中 XAD-7 处理后，3 种次生代谢产物产量提高最明显，均为对照的 2 倍以上。吴德智等^[32]研究发现，大孔吸附树脂对雷公藤内酯醇和吉碱的吸附量及解吸附率均有明显提高。Robins 等^[33]研究金鸡纳 (*Cinchona ledgeriana* (Howard) Moens ex Trim.) 悬浮细胞培养时发现，培养基中添加 XAD-7 后，蒽醌的产量提高了 15 倍，Asada 等^[30]对长春花细胞培养时发现，培养基中添加 XAD-7 后，阿吗碱的胞外释放量可提高 10% ~ 40%，可使总产量提高 40%，Gao 等^[31]对红豆杉 (*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.) 细胞培养也发现，培养基中添加 XAD-7 后，云南紫杉烷的产量可提高 2 倍。可见，进行液体培养时，有选择性地添加大孔吸附树脂可起到很好的作用。

参考文献：

- [1] 陈同素. 国产杀虫药剂雷公藤调查报告 [J]. 中华农学会报, 1933, 125: 79-82.
- [2] Swingle WT, Haller HL, Siegler EH, Swingle MC. A Chinese insecticidal plant, *Tripterygium wilfordii*, introduced into the United States [J]. *Science*, 1941, 93(2403): 60-61.
- [3] Tao X, Cai JJ, Lipsky P. The identity of immunosuppressive components of the ethyl acetate extract and chloroform methanol extract (T2) of *Tripterygium wilfordii* Hook. F. [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1995, 272(3): 1305-1316.
- [4] 岗艳云, 张正行. 雷公藤及其单体的药理作用研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 1995, 26(4): 252-256.

- [5] Liu QY. Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions [J]. *International immunopharmacology*, 2011, 11(3) : 377–383.
- [6] Lu Y, Zhang Y, Li L, Feng XJ, Ding S, Zheng W, Li JX, Shen PP. TAB1: A target of triptolide in macrophages [J]. *Chemistry & Biology*, 2014, 21: 246–256.
- [7] 周琳, 马志卿, 冯俊涛, 李修伟, 张兴. 雷公藤生物碱制品对小菜蛾和菜青虫的控制效果 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(12) : 169–173.
Zhou L, Ma ZQ, Feng JT, Li XW, Zhang X. Control efficacy of alkaloid products from *Tripterygium wilfordii* Hook against *Plutella xylostella* and *Pieris rapae* [J]. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition*, 2006, 34(12) : 169–173.
- [8] 周琳, 李俊领, 刘向阳, 马志卿, 冯俊涛, 张兴. 雷公藤总生物碱对粘虫幼虫神经系统酶活性及神经递质含量的影响 [J]. 昆虫学报, 2015, 58(8) : 856–863.
Zhou L, Li JL, Liu XY, Ma ZQ, Feng JT, Zhang X. Effects of total alkaloids from *Tripterygium wilfordii* on the activities of neural enzymes and contents of neurotransmitters in larval *Mythimna separata* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2015, 58(8) : 856–863.
- [9] Luo DQ, Zhang X, Tian X, Liu JK. Insecticidal compounds from *Tripterygium wilfordii* active against *Mythimna separata* [J]. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, A Journal of Biosciences*, 2004, 59(5–6) : 421–426.
- [10] 黄文华, 张蕊, 郭宝林, 斯金平. 雷公藤药材总生物碱含量及影响因素的研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(1) : 15–18.
Huang WH, Zhang R, Guo BL, Si JP. Study on total alkaloids content and its influential factors in medicinal materials of *Tripterygium* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2008, 33(1) : 15–18.
- [11] 张璟, 陈蒙蒙, 蒲时, 祝传书, 张兴. 雷公藤中雷公藤甲素、雷公藤吉碱和次碱的高效液相色谱-电喷雾串联质谱分析方法 [J]. 农药学学报, 2018, 20(2) : 197–203.
Zhang J, Chen MM, Pu S, Zhu CS, Zhang X. Determination of triptolide, wilforgine and wilforine in *Tripterygium wilfordii* by high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2018, 20(2) : 197–203.
- [12] Brinker AM, Raskin I. Determination of triptolide in root extracts of *Tripterygium wilfordii* by solid-phase extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatography-phosphoryl [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1070(1–2) : 65–70.
- [13] Ni L, Ma J, Li CJ, Li L, Guo JM, Yuan SP, Hou Q, Guo Y, Zhang DM. Novel rearranged and highly oxygenated abietane diterpenoids from the leaves of *Tripterygium wilfordii* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2015, 56(10) : 1239–1243.
- [14] 洪伟, 李键, 吴承祯, 洪滔, 范海兰, 唐佳栋, 陈灿. 雷公藤栽培及利用研究综述 [J]. 福建林学院学报, 2007, 27(1) : 92–96.
Hong W, Li J, Wu CZ, Hong T, Fan HL, Tang JD, Chen C. Research summary of cultivation and utilization of *Tripterygium wilfordii* [J]. *Journal of Fujian College of Forestry*, 2007, 27(1) : 92–96.
- [15] 李琰, 冯俊涛, 史晓燕, 吴勇延, 张兴. 雷公藤组培产物中雷公藤甲素和总生物碱含量的测定 [J]. 农药学学报, 2009, 11(3) : 367–372.
Li Y, Feng JT, Shi XY, Wu YY, Zhang X. Study on the determination of triptolide and total alkaloids in *Tripterygium wilfordii* Hook. f. cultures [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2009, 11(3) : 367–372.
- [16] 张兴, 李琰, 冯俊涛, 王智辉, 王永宏. 一种由雷公藤悬浮细胞诱导不定根的方法: ZL200810017697 [P]. 2008–08–27 [2018–07–09].
- [17] 刘跃, 张红蕊, 赵林, 刘新利. 消泡剂在发酵工业中的应用 [J]. 齐鲁工业大学学报: 自然科学版, 2014, 28(2) : 37–39.
Liu Y, Zhang HR, Zhao L, Liu XL. Application of anti-foams in fermentation processes [J]. *Journal of Qilu University of Technology: Natural Science Edition*, 2014, 28(2) : 37–39.
- [18] 梁小玲, 黄伟敏, 黄区, 李俏, 周建湘. 泡沫对食品发酵的影响及控制 [J]. 现代食品, 2016(14) : 22–23.
Liang XL, Huang WM, Huang Q, Li Q, Zhou JX. The influence and control of foam in food fermentation [J]. *Modern Food*, 2016(14) : 22–23.
- [19] Miao GP, Zhu CS, Yang YQ, Feng MX, Ma ZQ, Feng JT, Zhang X. Elicitation and in situ adsorption enhanced secondary metabolites production of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. adventitious root fragment liquid cultures in shake flask and a modified bubble column bioreactor [J]. *Bio-proc Biosyst Eng*, 2014, 37(4) : 641–650.
- [20] Yan Q, Hu ZD, Tan RX, Wu JY. Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures with in situ adsorption, elicitation and semi-continuous operation [J]. *J Biotechnol*, 2005, 119(4) : 416–424.
- [21] Miao GP, Zhu CS, Feng JT, Han J, Song XW, Zhang X. Aggregate cell suspension cultures of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. for triptolide, wilforgine, and wilforine production [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2013, 112(1) : 109–116.
- [22] 祝传书, 刘艳, 陈蒙蒙, 蒲时, 崔蕾, 李琰, 张兴. 雷公藤转录因子 *TwWRKY1* 基因的克隆与表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(4) : 595–605.
Zhu CS, Liu Y, Chen MM, Pu S, Cui L, Li Y, Zhang X. Cloning and expression analysis of transcription factor *TwWRKY1* gene in *Tripterygium wilfordii* [J]. *Journal of*

- Agricultural Biotechnology, 2018, 26(4) : 595–605.
- [23] 徐步青, 李振中, 张俊, 王芬, 刘幸佳, 崔永一. 不同培养条件对铁皮石斛类原球茎生物反应器培养的影响[J]. 中草药, 2014, 45(5) : 709–713.
Xu BQ, Li ZZ, Zhang J, Wang F, Liu XJ, Cui YY. Effect of different culture conditions on protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* in bioreactor culture [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, 45(5) : 709–713.
- [24] 姚睿, 朴炫春, 李铁军, 邵春绘, 廉美兰. 利用气升式生物反应器培养铁皮石斛原球茎[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24) : 3763–3767.
Yao R, Piao XC, Li TJ, Shao CH, Lian ML. Cultivation of protocorms of *Dendrobium candidum* in air-lift bioreactors [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2012, 37 (24) : 3763–3767.
- [25] Lee CWT, Shuler ML. The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 67(1) : 61–71.
- [26] 姜银姬, 朴炫春, 李贺, 王洪秋, 廉美兰. 几种因素对生物反应器培养东北刺人参不定根中皂苷积累的影响[J]. 林业工程学报, 2016, 1(3) : 68–72.
Jiang YJ, Piao XC, Li H, Wang HQ, Lian ML. Effect of several factors on saponin-accumulation in adventitious roots of *Oplopanax elatus* cultured with bioreactor culture [J]. *Journal of Forestry Engineering*, 2016, 1(3) : 68–72.
- [27] 陈书安, 王晓东, 袁晓凡, 赵兵, 王玉春. 藏红花细胞悬浮培养体系的建立及优化[J]. 生物技术通报, 2000, (7) : 157–160.
Chen SA, Wang XD, Yuan XF, Zhao B, Wang YC. Establishment and optimization of *Crocus sativus* L. [J]. *Cell Suspension Culture System Biotechnology Bulletin*, 2000, (7) : 157–160.
- [28] 李琰. 雷公藤组织培养生产次生代谢产物及其代谢调控研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
Li Y. Study on secondary metabolites production and metabolism regulation of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. tissue culture [D]. *Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, 2008.
- [29] 董漪, 吴虹. 大孔吸附树脂提取及纯化中药研究进展[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(3) : 76–78.
Dong Y, Wu H. Research progress on Chinese traditional medicine extraction and purification by macroporous adsorption resin [J]. *Journal of Anhui Traditional Chinese Medical College*, 2012, 31(3) : 76–78.
- [30] Asada M, Shuler ML. Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus*: effects of adsorption in situ, elicitors and alginate immobilization [J]. *Appl Microbiol Biot*, 1989, 30(5) : 475–481.
- [31] Gao MB, Zhang W, Ruan C. Significantly improved taxu-yunnanine C production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* by process intensification of repeated elicitation, sucrose feeding, and in situ adsorption [J]. *World J Microb Biot*, 2011, 27(10) : 2271–2279.
- [32] 吴德智, 蔡佳, 管咏梅, 王森, 陈丽华, 欧阳胜. 不同型号大孔树脂对雷公藤提取物主要成分富集作用考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17) : 14–16.
Wu DZ, Cai J, Guan YM, Wang S, Chen LH, Ouyang S. Investigation of enrichment effect for main ingredients from extract of *Tripterygium wilfordii* by different types of macroporous resin [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2012, 18(17) : 14–16.
- [33] Robins RJ, Rhodes MJC. The stimulation of anthraquinone production by *Cinchona ledgeriana* cultures with polymeric adsorbents[J]. *Appl Microbiol Biot*, 1986, 24(1) : 35–41.

(责任编辑: 张平)