Chinese Journal of Biotechnology
http://journals.im.ac.cn/cjbcn
DOI: 10.13345/j.cjb.140449
May 25, 2015, 31(5): 734−743
©2015 Chin J Biotech, All rights reserved

组织工程与细胞培养

诱导子对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

李琰[1,2], 赵磊[1,2], 崔蕾[1,2], 雷嘉敏[1,2], 张兴[2]

1 西北农林科技大学生命科学学院，陕西 杨凌 712100
2 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心 陕西省生物农药工程技术研究中心，陕西 杨凌 712100

李琰, 赵磊, 崔蕾, 等. 诱导子对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响. 生物工程学报, 2015, 31(5): 734–743.
Li Y, Zhao L, Cui L, et al. Effects of elicitors on growth of adventitious roots and contents of secondary metabolites in *Tripterygium wilfordii* Hook. f.. Chin J Biotech, 2015, 31(5): 734–743.

摘 要：为探讨真菌诱导子以及硝酸银等非生物诱导子对雷公藤不定根生长及次生代谢产物含量的影响。以雷公藤不定根为材料，通过向培养基中添加不同种类的真菌诱导子以及硝酸银等非生物诱导子，采用高效液相色谱检测不定根中雷公藤甲素和生物碱含量。结果表明：各种真菌诱导子不影响不定根的生长，但对次生代谢产物含量有显著影响，其中，苹果炭疽和柿子炭疽诱导子的加入不仅使不定根中雷公藤甲素的含量分别提高了 2.24 和 1.93 倍，生物碱的含量也各提高了 2.02 和 2.07 倍。苹果炭疽诱导子浓度为 50 μg/mL 时比较适合雷公藤不定根生长及雷公藤甲素和生物碱的积累。硝酸银抑制不定根的生长和生物碱的积累，但促进雷公藤甲素的积累。硝酸银浓度为 25 μmol/L 时雷公藤甲素含量为对照的 1.71 倍。茉莉酸甲酯浓度为 50 μmol/L 时，不定根增长量为对照的 1.04 倍，雷公藤甲素和生物碱含量分别为对照的 1.64 倍和 2.12 倍。酵母提取物浓度为 2 g/L 时，雷公藤甲素含量为对照的 1.48 倍。表明培养基中添加硝酸银和酵母提取物对不定根中雷公藤甲素的合成具有明显的促进作用，苹果炭疽和茉莉酸甲酯的协同作用既能促进雷公藤甲素的合成又能促进雷公藤生物碱的合成。

关键词：雷公藤，不定根，诱导子，次生代谢产物

Received: September 15, 2014; **Accepted:** November 15, 2014
Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA10A202), Natural Science Foundation of Shaanxi Province (No. 2011JM3006).
Corresponding author: Yan Li. Tel: +86-29-87092122; E-mail: ly2659@163.com
国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA10A202)，陕西省自然科学基金 (No. 2011JM3006) 资助。
网络出版时间：2015-04-03 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150403.1000.001.html

Effects of elicitors on growth of adventitious roots and contents of secondary metabolites in *Tripterygium wilfordii* Hook. f.

Yan Li[1,2], Lei Zhao[1,2], Lei Cui[1,2], Jiamin Lei[1,2], and Xing Zhang[2]

1 *College of Life Science, Northwest A&F University*, *Yangling* 712100, *Shaanxi, China*
2 *Shaanxi Province Technology and Engineering Center of Biopesticide*, *Research and Development Center of Biorational Pesticide*, *Northwest A&F University*, *Yangling* 712100, *Shaanxi*, *China*

Abstract: To study the effects of the extract of fungal elicitor, $AgNO_3$, MeJA and yeast on the growth and content of secondary metabolites of adventitious roots in *Tripterygium wilfordii*. The above elicitors were supplemented to the medium, the growth and the content of secondary metabolites were measured. When the medium was supplemented with the elicitor *Glomerella cingulata* or *Collectotrichum gloeosporioides*, the content of triptolide was increased by 2.24 and 1.93-fold, the alkaloids content was increased by 2.02 and 2.07-fold, respectively. The optimal concentration of *G. cingulata* was 50 μg/mL for accumulation of triptolide, alkaloids and for the growth of adventitious roots. $AgNO_3$ inhibited the growth of adventitious roots and the accumulation of the alkaloids, whereas it (at 25 μmol/L) increased the accumulation of triptolide by 1.71-fold compared to the control. The growth of adventitious roots, the contents of triptolide and alkaloids were increased 1.04, 1.64 and 2.12-folds, respectively when MeJA was at 50 μmol/L. When the concentration of yeast reached 2 g/L, the content of triptolide increased 1.48-folds. This research demonstrated that supplementation of $AgNO_3$ and yeast enhanced the biosynthesis of triptolide in adventitious roots and the synergism of *G. cingulata* and MeJA could promote the biosynthesis of both triptolide and alkaloids.

Keywords: *Tripterygium wilfordii* Hook. f., adventitious root, elicitor, secondary metabolites

通过植物组织培养生产次生代谢产物时，往往添加诱导子来改变细胞的代谢途径和代谢强度，从而提高植物组织培养物中有用次生代谢产物的积累，为植物细胞次生代谢的调控提供了新的手段，这一方法越来越引起人们的关注[1-2]。近几年诱导子被广泛地用于促进各种细胞培养物中次生代谢产物的生物合成[3-5]，研究表明诱导子的作用效果与诱导子的种类、浓度以及作用时间等因素有关[6-7]，有时不同诱导子之间还存在一定的协同效应，两种或两种以上诱导子的协同作用可产生更强的诱导效果[8-9]。

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 作为传统的杀虫植物及药用植物，其主要活性成分雷公藤甲素和雷公藤生物碱等次生代谢产物主要存在于根皮中[10-11]。其根皮在我国民间常用于防治多种蔬菜害虫，根皮提取物对小菜蛾 *Plutella xylostella*、菜青虫 *Pieris rape* 等害虫有强烈的胃毒、拒食或麻痹作用[12-14]。雷公藤甲素和雷公藤生物碱也是临床上用于治疗风湿性关节炎、抗肿瘤和免疫抑制性疾病的主要成分[15-17]，雷公藤属于木本植物，生长缓慢，有效成分含量较低[11,18]，使市场开发新药以及生物农药的使用受到了限制。为了解决这一问题，我们进行了利用植物组织培养方法生产雷公藤次生代谢产物的研究[19-20]，为了进一步提高其次生代谢产物的含量，从诱导子种类、添加浓

度及时间、诱导子协同作用等对雷公藤不定根增长量和次生代谢产物含量进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

雷公藤不定根：为本实验室多代驯化培养的稳定的不定根培养体系作为供试材料。

所用病原菌：小麦根腐 *Fusarium graminearum*、苹果炭疽 *Glomerella cingulata*、柿子炭疽 *Collectotrichum gloeosporioides*、美味牛肝菌 *Boletus edulis*、尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*、小麦全蚀 *Gaeumannomyces graminis*，均由本实验室菌种保藏中心提供。

仪器与试剂：日本岛津 LC-6ATVP 高效液相色谱仪，紫外检测器。UV120-02 型紫外/可见分光光度计 (日本岛津)。雷公藤甲素标准品 (批号 1566-200201，纯度 95%) 由中国药品生物制品鉴定所提供。雷公藤生物碱，由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供，为本课题组从雷公藤根皮中提取得到，经光谱鉴定结构 HPLC 面积归一法测定纯度大于 95%。乙腈为色谱纯，水为超纯水，其他试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 雷公藤不定根的培养

雷公藤不定根继代培养均以 NT 为基本培养基，添加 4.0 mg/L 奈乙酸 (NAA)、1.0 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 和 0.5 mg/L 激动素 (KT)，加入蔗糖 30 g/L，250 mL 三角瓶内装 100 mL 培养基，接种量为 10 g/L 新鲜不定根，pH 用 PHS-2C 型酸度计高压灭菌前调至 5.8。在温度 (25±1) ℃，在自然光照下培养，摇床转速为 120 r/min。培养结束后将不定根用去离子水冲洗过滤后冷冻干燥至恒重，按照不定根增长量=收获量/瓶−接种量/瓶，计算不定根增长量，并将其粉碎过 60 目筛，冷藏保存用以提取雷公藤甲素和雷公藤生物碱。所有试验重复 3 次。

1.2.2 诱导子的制备和添加

将以上病原菌接种在 PDA 固体培养基上进行活化，将活化后的菌种接种在 PDA 液体培养基中，25 ℃、120 r/min 摇床上培养 1 周收获菌丝，参照文献[21]的方法制备真菌细胞壁诱导子，以葡萄糖为标准，用蒽酮比色法测定诱导子提取物中多糖含量。诱导子的加入量按溶液中含糖量计算，单位为 mg GE/L 葡萄糖当量 (Glucose equivalent)。

1.2.3 不同种类真菌诱导子对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

向继代培养 30 d 的不定根中添加 50 μg/mL 小麦根腐、苹果炭疽、柿子炭疽、美味牛肝菌、尖孢镰刀菌及小麦全蚀 6 种诱导子，培养至第 45 天收获不定根。

1.2.4 不同浓度苹果炭疽病原菌对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

向继代培养 30 d 的不定根中添加 10、30、50、70、100、200 μg/mL 苹果炭疽诱导子，培养至第 45 天收获不定根。

1.2.5 诱导子添加时间对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

向继代培养第 15、20、25、30、35、40 d 的不定根中添加 50 μg/mL 苹果炭疽诱导子，培养至第 45 天收获不定根。

1.2.6 诱导子作用时间对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

向继代培养第 30 天的不定根中添加

50 μg/mL 苹果炭疽诱导子，培养至诱导子加入后 0、5、10、15、20、25 d 收获不定根。

1.2.7 非生物诱导子对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

向继代培养第 30 天的不定根中添加 0、5、10、25、50、100 μmol/L 硝酸银 (过滤灭菌法，下同)，0、10、30、50、75、100 μmol/L 茉莉酸甲酯，0、0.5、1、2、5、10 g/L 酵母提取物，培养至第 45 天收获不定根。

1.2.8 诱导子协同作用对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

向继代培养第 30 天的不定根中同时添加 50 μg/mL 苹果炭疽病原菌诱导子和 25 μmol/L 硝酸银以及 50 μg/mL 苹果炭疽病原菌诱导子和 50 μmol/L 茉莉酸甲酯，培养至诱导子加入后 0、5、10、15、20、25 d 收获不定根。

1.3 次生代谢产物含量的测定

参照文献[22]的方法对雷公藤次生代谢产物含量进行测定。称取雷公藤不定根样品 1 g，置于磨口瓶中，加入乙酸乙酯 20 mL 过夜，超声提取 40 min，过中性氧化铝柱，减压回收乙酸乙酯，用 45%甲醇溶解并定容至 5 mL，测定雷公藤甲素和生物碱含量。

雷公藤甲素含量的测定采用 HPLC 法，色谱条件为，色谱柱 C_{18} (4.6 mm×250 mm) 5 μm；流动相，甲醇∶水 ＝45∶55；流速 1 mL/min；检测波长为 218 nm；以雷公藤甲素为标准品，用 45%甲醇溶解并定容制得 100 μg/mL 标准液。将标准液用 45%甲醇稀释成 1、10、30、50、75、100 μg/mL 系列浓度溶液，分别进样 3 次，以峰面积平均值 (A) 为纵坐标，浓度 (C) 为横坐标，得线性回归方程为：$A = 46\ 866C - 10\ 771$，$R^2 = 0.999\ 9$。

雷公藤生物碱含量的测定采用紫外分光光度法，将提取液用 45%甲醇稀释 10–30 倍，用紫外/可见分光光度计在 268 nm 波长下进行比色，测定吸光度；以生物碱为标准品，用 45%甲醇溶解并定容制得 100 μg/mL 的标准液。将标准品溶液用 45%甲醇稀释成 5、10、40、60、80、100 μg/mL 系列浓度溶液，以 45%甲醇为空白对照，于 268 nm 波长处测定吸光度 (OD 值)。以吸光度 A 为纵坐标，浓度 C 为横坐标，制作标准曲线，其回归方程为：A=0.008 7C−0.008 1，R^2=0.999 8。

2 结果与分析

2.1 真菌诱导子对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

2.1.1 不同种类真菌诱导子对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

在培养 30 d 的雷公藤不定根中加入真菌诱导子后不定根增长量和对照相比差异并不明显(图 1)，而对不定根中雷公藤甲素和生物碱的含量差异较大。各种诱导子的加入对不定根中雷公藤甲素和生物碱的含量均有不同程度的提高。其中，苹果炭疽 (GC) 和柿子炭疽 (CG) 诱导子的加入使不定根的增长量分别为对照的 96.40%和 95.68%，而不定根中雷公藤甲素的含量和对照相比分别提高了 2.24 和 1.93 倍，生物碱的含量和对照相比也各提高了 2.02 和 2.07 倍。其他诱导子的添加不定根中雷公藤甲素和生物碱的含量也有不同程度的提高。

2.1.2 不同浓度苹果炭疽诱导子对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

苹果炭疽诱导子浓度在 0–50 μg/mL 时对不

定根增长量差异并不明显 (图 2) 当浓度超过 50 μg/mL 时，不定根卷曲，生长速度下降明显，浓度在 100 μg/mL 时，不定根增长量为对照的 87.77%，但不定根中雷公藤甲素含量达到最大值，为对照的 2.66 倍，当浓度为 200 μg/mL 时，随着培养时间的延长，不定根颜色变深，逐渐

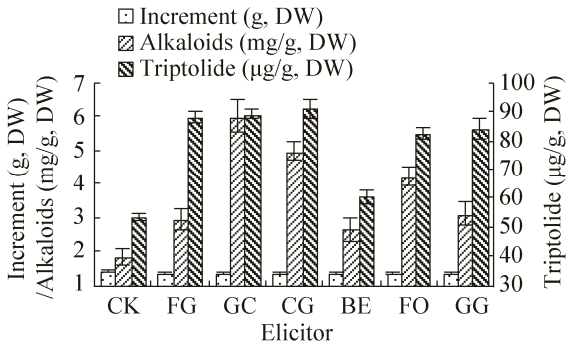

图 1 不同种类真菌诱导子对不定根生长和次生代谢产物含量的影响

Fig. 1 Effects of fungal elicitor on the growth and secondary metabolites contents of adventitious root. CK: control; FG: *Fusarium graminearum*; GC: *Glomerella cingulata*; CG: *Collectotrichum gloeosporioides*; BE: *Boletus edulis*; FO: *Fusarium oxysporum*; GG: *Gaeumannomyces graminis.*

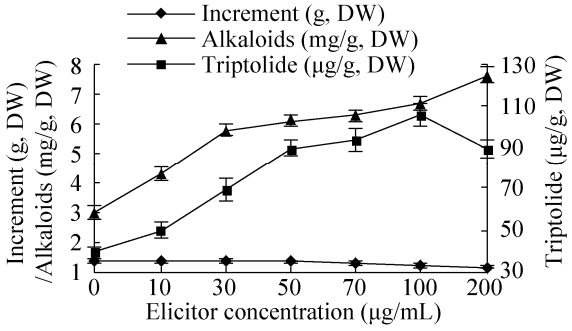

图 2 不同浓度苹果炭疽诱导子对不定根生长和次生代谢产物含量的影响

Fig. 2 Effects of *Glomerella cingulata* concentration on the growth and secondary metabolites contents of adventitious roots.

失去光泽，并在第 35 天就停止生长，雷公藤甲素含量也明显下降。生物碱含量在试验范围内，随着诱导子浓度的增加而升高，当诱导子浓度为 200 μg/mL 时，生物碱含量为对照的 2.52 倍。

2.1.3 诱导子添加时间对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

前期试验发现，雷公藤不定根的生长周期约为 40 d，接种后第 15 天进入快速生长期，第 25 天时生长速度最快，第 30 天进入稳定生长期。为了确定诱导子的最佳添加时间，分别在不定根接种后不同时间加入苹果炭疽诱导子，第 45 天收获不定根 (图 3) 发现，不定根增长量随着生长时间的延长而增加，雷公藤甲素含量在第 15 天至第 30 天加入差异并不明显，第 35 天以后加入含量明显开始下降，而生物碱含量是诱导子加入的越早含量越高。

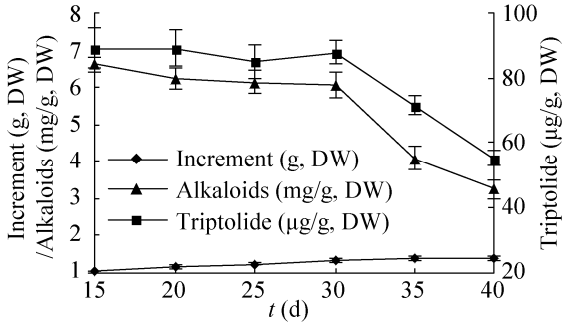

图 3 诱导子添加时间对不定根生长和次生代谢产物含量的影响

Fig. 3 Effects of additive time on the growth and secondary metabolites contents of adventitious roots.

2.1.4 诱导子作用时间对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

在培养 30 d 的不定根中，加入 50 μg/mL 苹果炭疽诱导子后每隔 5 d 收获 1 次不定根，随着

诱导子作用时间的延长不定根增长量呈下降趋势 (图 4)，雷公藤甲素含量在加入第 15 天时最高，以后随着培养时间的延长而逐渐下降，生物碱含量随着作用时间的延长而增加，但生物碱含量在添加第 10 天至第 25 天差异并不明显。

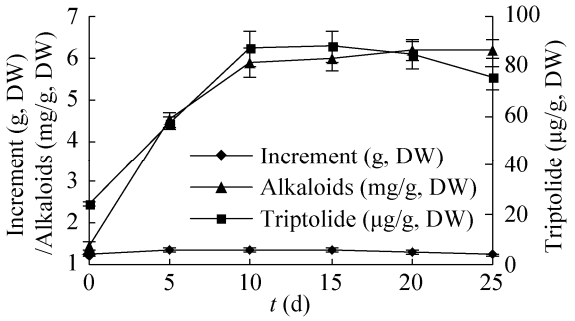

图 4　诱导子作用时间对不定根生长和次生代谢产物含量的影响

Fig. 4　Effects of incubation time after elicitation on the growth and secondary metabolites contents of adventitious roots.

2.2　非生物诱导子对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

2.2.1　硝酸银对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

培养基中加入硝酸银对雷公藤不定根的生长、雷公藤甲素及生物碱含量均有较大的影响 (图 5)。不定根增长量随着硝酸银浓度的升高而下降，雷公藤甲素含量随着硝酸银浓度的增加均有不同程度的提高，在硝酸银浓度为 25 μmol/L 时，不定根增长量为对照的 86.03%，雷公藤甲素含量为对照的 1.71 倍。硝酸银的加入不利于不定根中生物碱的合成，生物碱含量随着硝酸银浓度的升高而降低，当硝酸银浓度为 100 μmol/L 时，生物碱含量仅为对照的 68.77%。

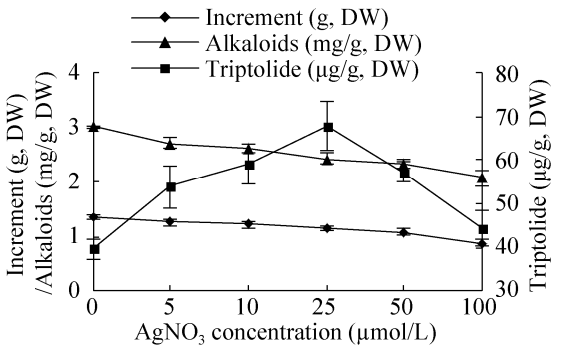

图 5　硝酸银对不定根生长和次生代谢产物含量的影响

Fig. 5　Effects of $AgNO_3$ on the growth and secondary metabolites contents of adventitious roots.

2.2.2　茉莉酸甲酯对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

适宜浓度茉莉酸甲酯的加入对雷公藤不定根的生长、雷公藤甲素及生物碱含量均有不同程度的提高 (图 6)。适合不定根生长的茉莉酸甲酯浓度为 30 μmol/L，当茉莉酸甲酯浓度为 50 μmol/L 时，雷公藤甲素含量为对照的 1.64 倍，生物碱含量为对照的 2.12 倍，此时不定根增长量为对照的 1.04 倍。

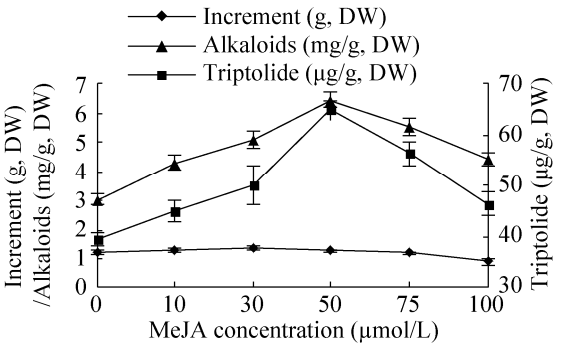

图 6　茉莉酸甲酯对不定根生长和次生代谢产物含量的影响

Fig. 6　Effects of MeJA on the growth and secondary metabolites contents of adventitious roots.

2.2.3 酵母提取物对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

试验发现，低浓度的酵母提取物不仅能促进不定根的生长，也明显促进雷公藤甲素的形成 (图 7)。当酵母提取物浓度为 1 g/L 时，不定根增长量为对照的 1.12 倍，酵母提取物浓度为 2 g/L 时，雷公藤甲素含量为对照的 1.48 倍，但酵母提取物明显抑制雷公藤生物碱的合成，且浓度越大抑制作用越强。

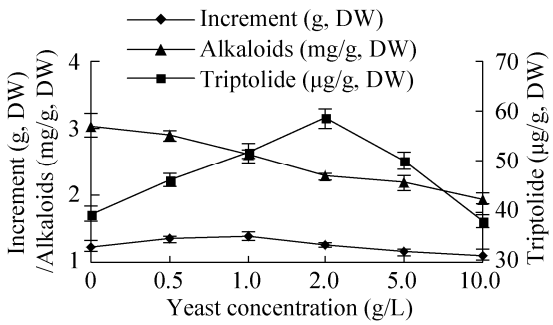

图 7 酵母提取物对不定根生长和次生代谢产物含量的影响

Fig. 7 Effects of yeast on the growth and secondary metabolites contents of adventitious roots.

2.3 诱导子协同作用对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

2.3.1 苹果炭疽诱导子和硝酸银协同作用对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

苹果炭疽诱导子和硝酸银的协同作用对不定根生长、雷公藤甲素及生物碱的含量影响差异较大 (图 8)，随着诱导子作用时间的延长不定根增长量比各自单独加入明显下降，但雷公藤甲素含量比各自单独加入明显升高，雷公藤甲素含量达到最大值的时间也比单独加入提前了 5 d，在加入的第 10 天达到最大值，为单独使用苹果炭疽诱导子 1.16 倍，为单独使用硝酸银的 1.51 倍。生物碱含量在加入第 20 天时最高。比单独加入苹果炭疽诱导子的含量下降了 16.50%，但为单独加入硝酸银的 2.25 倍。

2.3.2 苹果炭疽诱导子和茉莉酸甲酯协同作用对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响

在培养基中同时加入苹果炭疽诱导子和茉莉酸甲酯后不定根增长量明显提高 (图 9)，在

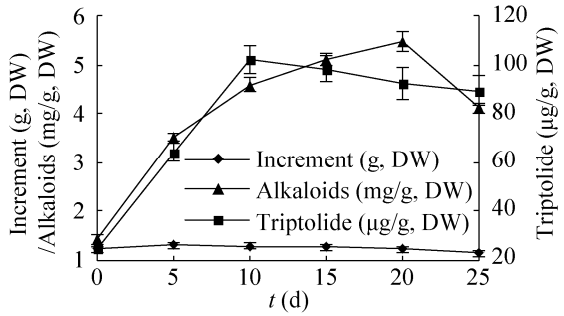

图 8 苹果炭疽诱导子和硝酸银协同作用对不定根生长和次生代谢产物含量的影响

Fig. 8 Effects of synergism by *Glomerella cingulata* and $AgNO_3$ on the growth and secondary metabolites contents of adventitious roots.

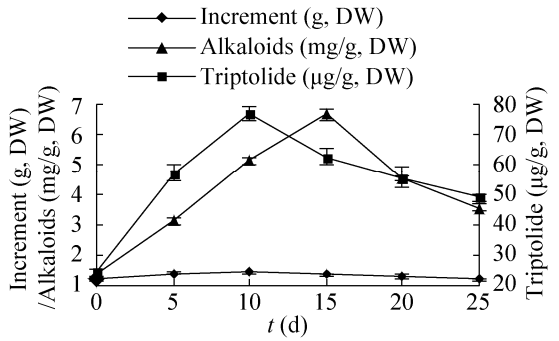

图 9 苹果炭疽诱导子和茉莉酸甲酯协同作用对不定根生长和次生代谢产物含量的影响

Fig. 9 Effects of synergism by *Glomerella cingulata* and MeJA on the growth and secondary metabolites contents of adventitious roots.

加入的第 10 天，不定根增长量均高于二者单独添加。在加入的第 10 天雷公藤甲素含量达到最大值，为单独使用茉莉酸甲酯的 1.19 倍，但比单独使用苹果炭疽诱导子下降了 13.92%。生物碱含量在添加的第 15 天达到最大值，和单独使用茉莉酸甲酯接近，为单独使用苹果炭疽诱导子的 1.11 倍。

3 讨论

利用诱导子激活植物细胞中的次生代谢途径已成为提高药用植物组织培养中药用成分积累的有效方法[23]。前人研究证明，不同种类的真菌诱导子在不同植物细胞次生代谢调节中，因其所具有的能被细胞受体所接受的信息类型、添加时间不同，使诱导反应的类型和强度不同，从而使不同诱导子表现出的诱导活性有明显的差异。同样用大丽花轮枝孢、葡枝根霉和束状刺盘孢处理青蒿的发状根，虽然均能促进发根中青蒿素的积累，但以大丽花轮枝孢的诱导效果最好，经大丽花轮枝孢处理的发根中青蒿素含量比对照提高了 45%[24]。Namdeo 等在长春花细胞悬浮培养中，加入黑曲霉等抽提物，阿玛碱的含量比对照提高了 3 倍[25]。本研究结果表明，苹果炭疽诱导子的加入对雷公藤不定根中雷公藤甲素和生物碱含量影响最大，对雷公藤甲素和生物碱含量分别提高 2.24 倍和 2.02 倍。有关苹果炭疽诱导子的作用机理还有待于进一步研究。

试验发现，真菌诱导子种类、浓度和添加时间对不定根的生长、雷公藤甲素及生物碱含量影响较大。一般高浓度诱导子对细胞生长损伤较大，甚至使细胞停滞生长，可能是来源于真菌的诱导子大多有很强的毒性。虽然降低诱导子浓度可以减少对细胞的伤害，但低浓度的诱导子只能引起部分诱导，所需的目的产物积累也就达不到最佳状态。本试验中，随着苹果炭疽诱导子浓度的提高，不定根增长量呈下降趋势，且浓度越大下降趋势越明显。当浓度超过 100 μg/mL 时，雷公藤甲素含量也开始下降。一般认为培养物只有处于一定生长时期时才能有效地接受诱导子信号，使诱导子表现出最强的活性，本试验中，不定根在生长至对数期末期加入诱导子效果最好，而延迟期以后加入雷公藤甲素和生物碱含量均开始下降。这和张坚等[26]在对杠柳不定根培养生产杠柳毒苷研究时得出的结论相一致。

Ag^+作为乙烯合成酶的抑制剂，往往通过调节乙烯合成来改变植物细胞的代谢[27]。Pitta-Alvarez 等[28]报道，硝酸银能使 *Brugmansia candida* 发状根中的东莨菪碱和生物碱含量分别提高 3 倍和 5–8 倍。本试验发现，硝酸银能明显促进雷公藤不定根中雷公藤甲素的合成。张坚等[26]在对杠柳不定根培养研究以及 Zhang 等[27]在对丹参毛状根培养的研究中也得出了类似的结论。以前曾有人报道，诱导子协同作用能显著提高次生代谢的产率[28-29]。苗志奇等[30]在红豆杉细胞培养中通过 $AgNO_3$ 和水杨酸的协同作用，使紫杉醇的含量比两个诱导子单独作用时的最高含量之和还高出 50%。本试验中苹果炭疽诱导子和 $AgNO_3$ 的协同作用中，雷公藤甲素的含量均高于两者单独使用，但生物碱含量比单独使用苹果炭疽诱导子下降了 10.18%。而雷公藤不定根与诱导子和诱导产物之间的相关性，如何促使信号传导途径的开放，代谢途

径中相关酶活性是怎么提高，如何促进 mRNA 的转录等，都需要作进一步研究。

REFERENCES

[1] Flores-Sanchez IJ, Peč J, Fei JN, et al. Elicitation studies in cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. J Biotech, 2009, 143(2): 157−168.

[2] Chong TM, Abdullah MA, Lai QM, et al. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. Process Biochem, 2005, 40(11): 3397−3405.

[3] Ghorpade RP, Chopra A, Nikam TD. Influence of biotic and abiotic elicitors on four major isomers of boswellic acid in callus culture of *Boswellia serrata* Roxb. Plant Omics J, 2011, 4(4): 169−176.

[4] Gururaj HB, Giridhar P, Ravishankar GA. Laminarin as a potential non-conventional elicitor for enhancement of capsaicinoid metabolites. Asian J Plant Sci Res, 2012, 2(4): 490−495.

[5] Gao FK, Yong YH, Dai CC. Effects of endophytic fungal elicitor on two kinds of terpenoids production and physiological indexes in *Euphorbia pekinensis* suspension cells. J Med Plants Res, 2011, 5(18): 4418−4425

[6] Zhai QL, Fan GZ, Zhan YG. Accumulation of triterpenoids in *Betula platyphylla* suspension culture induced by a fungal elicitor. Sci Silvae Sin, 2011, 47(6): 42−47 (in Chinese).
翟俏丽, 范桂枝, 詹亚光. 真菌诱导子促进白桦悬浮细胞三萜的积累. 林业科学, 2011, 47(6): 42−47.

[7] Zhang P, Wang F, Zhu CS. Influence of fungal elicitor and macroporous resin on shikonin accumulation in hairy roots of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. Chin J Biotech, 2013, 29(2): 214−223 (in Chinese).
张璞, 王芳, 朱查山. 真菌诱导子与吸附树脂对新疆紫草毛状根中萘醌积累的影响. 生物工程学报, 2013, 29(2): 214−223.

[8] Mabood F, Zhou XM, Lee KD, et al. Methyl jasmonate, alone or in combination with genistein, and Bradyrhizobium japonicum increases soybean (*Glycine max* L.) plant dry matter production and grain yield under short season conditions. Field Crops Res, 2006, 95(2/3): 412−419.

[9] Sánchez-Sampedro AM, Fernández-Tárrago J, Corchete P. Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. J Biotechnol, 2005, 119(1): 60−69.

[10] Swingle WT, Haller HL, Siegler EH, et al. Chinese insecticidal plant *Tripterygium wilfordii* introduced into the United State. Science, 1941, 93(2403): 60−61.

[11] Yang CX, Zhou TC, Qin WZ. The content variation of triptolide in *Tripterygium wilfordii* in the different seasons. Chin Hosp Pharm J, 2001, 21(1): 25−26 (in Chinese).
杨春欣, 周庭川, 秦万章. 雷公藤内酯醇不同季节的含量变化. 中国医院药学杂志, 2001, 21(1): 25−26.

[12] Li Y, Chen P, Yang YQ, et al. Insecticidal and antifungal activity of *Tripterygium wilfordii* cultures. Acta Bot Boreal-Occid Sin, 2012, 32(10): 2116−2121 (in Chinese).
李琰, 陈培, 杨钰琪, 等. 雷公藤组培产物的杀虫杀菌活性研究. 西北植物学报, 2012, 32(10): 2116−2121.

[13] Zhou L, Ma ZQ, Feng JT, et al. Control efficacy of alkaloid products from *Tripterygium wilfordii* Hook against *Plutella xylostella* (L.) and *Pieris rape*. J Northwest A& F Univ: Nat Sci Ed, 2006, 34(12): 169−173 (in Chinese).
周琳, 马志卿, 冯俊涛, 等. 雷公藤生物碱制品对小菜蛾和菜青虫的控制效果. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(12): 169−173.

[14] Gonzalez AG, Jimenez IA, Ravelo AG, et al. Antifeedant activity of sesquiterpenes from celastraceae. Biochem Syst and Ecol, 1997, 25(6): 513−519.

[15] Duan H, Takaishi Y, Momota H, et al. Immunosuppressive sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium wilfordii*. J Nat Prod. 2001, 64(5): 582−587.

[16] Johnson SM, Wang X, Evers BM. Triptolide

inhibits proliferation and migration of colon cancer cells by inhibition of cell cycle regulators and cytokine receptors. J Surgical Res, 2011, 168(2): 197−205.

[17] Huang W, He T, Chai C, et al. Triptolide inhibits the proliferation of prostate cancer cells and down-regulates SUMO-specific protease 1 expression. PLoS ONE, 2012, 7(5): e37693.

[18] Ren JJ, Xu JZ, Yu SH, et al. Effects of harvest time and root diameter on the content of triptolide in *Tripterygium wilfordii*. J Chin Med Mater, 2011, 34(4): 520−522 (in Chinese).
任江剑, 徐建中, 余绍海, 等. 采收时间和根直径对雷公藤中雷公藤甲素含量的影响. 中药材, 2011, 34(4): 520−522.

[19] Zhang X, Li Y, Feng JT, et al. A method of suspension cells induced adventitious root of *Tripterygium wilfordii*: China, ZL200810017697.8. 2010-03-10 (in Chinese).
张兴, 李琰, 冯俊涛, 等. 一种由雷公藤悬浮细胞诱导不定根的方法. 中国, ZL200810017697.8. 2010-03-10.

[20] Li Y, Feng JT, Shi XY, et al. Study on the determination of triptolide and total alkaloids in *Tripterygium wilfordii* Hook. f. cultures. Chin J Pesticide Sci, 2009, 11(3): 367−372 (in Chinese).
李琰, 冯俊涛, 史晓燕, 等. 雷公藤组培产物中雷公藤甲素和生物碱含量的测定. 农药学学报, 2009, 11(3): 367−372.

[21] Zhang CH, Mei XG, Liu L, et al. Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures. Biotech Lett, 2000, 22(19): 1561−1564.

[22] Li Y, Cui L, Lei JM, et al. Effects of different concentrations of organic affixture on the growth and secondary metabolites contents in adventitious roots of *Tripterygium wilfordii*. Plant Sci J, 2014, 32(2): 174−180 (in Chinese).
李琰, 崔蕾, 雷嘉敏, 等. 不同浓度有机物对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响. 植物科学学报, 2014, 32(2): 174−180.

[23] Namdeo A G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. Pharmacogn Rev, 2007, 1(1): 69−79.

[24] Wang H, Ye HC, Li GF, et al. Effects of fungal elicitors on cell growth and artemisinin accumulation in hairy root cultures of *Artemisia annua*. Acta Bot Sin, 2000, 42(9): 905−909 (in Chinese).
王红, 叶和春, 李国凤, 等. 真菌诱导子对青蒿发根细胞生长和青蒿素积累的影响. 植物学报, 2000, 42(9): 905−909.

[25] Namdeo A, Patil S, Fulzele UP. Influence of fungal elicitors on production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnol Prog, 2002, 18(1): 159−162.

[26] Zhang J, Gao WY, Wang J, et al. Affect of Ag^{+} and La^{3+} elicitors on growth and accumulation of adventitious roots of *Periploca sepium*. China J Chin Mater Med, 2011, 36(1): 11−15 (in Chinese).
张坚, 高文远, 王娟, 等. 诱导子 Ag^{+}, La^{3+}对杠柳不定根生长及杠柳毒苷积累影响的研究. 中国中药杂志, 2011, 36(1): 11−15.

[27] Zhang C, Yan Q, Chenk WK, et al. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag^{+} elicitation and nutrient feeding. Planta Med, 2004, 70(2): 147−151.

[28] Pitta-Alvarez SI, Spollansky TC, Giulietti AM. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Enzyme Microb Technol, 2000, 26(2/4): 252−258.

[29] Li GJ, Wang SC, Xia K, et al. Effect of yeast elicitor and salicylic acid on the fluctuation of phytohormone contents in Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell culture. Plant Growth Regul, 2003, 39(1): 27−32.

[30] Miao ZQ，Wei ZJ，Yuan YJ，et al. Study on the effects of salicylic acid on taxol biosynthesis. Chin J Biotech, 2000, 16(4): 509−513 (in Chinese).
苗志奇, 未作君, 元英进, 等. 水杨酸在紫杉醇生物合成中诱导作用的研究. 生物工程学报, 2000, 16(4): 509−513.

(本文责编　陈宏宇)