

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00433

• 综述 •

## 植物转基因发根的研究方向和应用

刘娟<sup>1,2</sup>, 李杨<sup>1,2</sup>, 陈万生<sup>3</sup>, 张磊<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433
2. 佳木斯大学化学与药学院生药学教研室, 佳木斯 154007
3. 第二军医大学长征医院药学部, 上海 200003

**[摘要]** 利用发根农杆菌转化药用植物建立发根培养体系, 以其独有的优势可以大规模生产次生代谢物, 有效解决天然植物产品资源短缺的问题。同时诱发植物产生毛状根的质粒(Ri质粒)还是植物基因工程理想的载体, 可将抗虫、抗病基因或植物次生代谢物合成关键酶基因, 进一步整合到植物宿主基因组并得到表达, 从而达到改良植物性状、提高次生代谢物含量的目的。转基因发根培养体系的建立为进一步利用遗传代谢工程手段调控植物次生代谢物含量和进行药用活性成分的工业化生产奠定了基础。本文综述了该领域的最新研究进展和相关应用。

**[关键词]** 植物; 发根农杆菌; 转基因发根; 代谢工程

**[中图分类号]** R 931.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)04-0433-05

### Transgenic plant hairy root: future and application

LIU Juan<sup>1,2</sup>, LI Yang<sup>1,2</sup>, CHEN Wan-sheng<sup>3</sup>, ZHANG Lei<sup>1\*</sup>

1. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pharmacognosy, Chemical and Pharmacy College, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang, China
3. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** Establishment of a hairy root culture system from the medicine plants transformed by the *Agrobacterium rhizogenes* has unique advantages in large scale production of secondary metabolites and provides an effective solution to the shortage of resources. Meanwhile, root-induced(Ri) plasmid is also an ideal vector for plant genetic engineering. Insect-resistant, disease-resistant genes or genes encoding key enzymes involved in biosynthesis of plant secondary metabolites can be harbored by Ri plasmid and integrated into the host plant genome for expression, thus improving the plant traits and enhancing the secondary metabolite content. Establishment of plant transgenic hairy root culture system has laid a solid foundation for regulating plant secondary metabolites content and for industrial production of pharmaceutical active ingredients by using of genetic metabolic engineering strategies. This paper reviews the latest research advances in this field and the related applications.

**[Key words]** plant; *Agrobacterium rhizogenes*; transgenic hairy root; metabolic engineering

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(4): 433-437]

植物能够产生天然的有药用价值和其他用途的化合物, 但随之也带来野生资源大量消耗的局面。利用生物技术规模化生产药用植物的有效成分, 能有效保护自然资源, 对于现代社会可持续发展和构建低碳经济模式意义重大。但是目前通过植物细胞培养还远没有达到商业化的进程(如右旋紫草素和黄连素), 主要制约瓶颈在于植物细胞培养的遗传不稳定和次生代谢物的产量低下。植物转化天然的发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)载体系统具有遗传和生物合成的稳定性以及生长迅速等独特优势, 为持续生产有用植物次生代谢物提供了新的途径。

### 1 Ri质粒的结构和功能

农杆菌能够识别植物敏感伤口渗出的信号分子并附着上去(趋化性响应)。用发根农杆菌感染植物可以从伤口处长出发根。发根农杆菌菌体中存在着能够诱发植物产生毛状根的质粒, 称为 Ri(root induce)质粒。Ri质粒是发根农杆菌染色体外的遗传物质, 具有 2 个非常重要的功能区即 T-DNA(转移区)和 Vir 区(致病区)。T-DNA 能够在 Vir 区的协助下转移到植物基因组中。诱导生根的菌株包含一个单拷贝的巨大 Ri 质粒, 其大小为 200~800 kb。农杆菌型 Ri 质粒 T-DNA 分为左边 T-DNA(T<sub>L</sub>-DNA)和右边 T-DNA

**[收稿日期]** 2009-09-20 **[接受日期]** 2010-01-20

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30600807). Supported by National Natural Science Foundation of China (30600807).

**[作者简介]** 刘娟, 教授, 硕士生导师. E-mail: liujuan1949@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871309, E-mail: zhanglei@smmu.edu.cn

(T<sub>R</sub>-DNA)。致瘤质粒 T-DNA 含有肿瘤诱发基因 (tumor inducing genes), 参与农杆菌合成的基因也定位在 T-DNA 区。T-DNA 转移进入植物受伤的细胞, 进一步稳定整合到宿主基因组上<sup>[1]</sup>。编码转移 DNA 的基因具有真核生物的调控序列, 使其可以在受伤的植物细胞中表达。T<sub>R</sub>-DNA 区含有生长素合成基因 tms1 和 tms2, 可以合成生长激素吲哚乙酸, 因此转化产生的发根在培养时不需要添加外源生长激素; T<sub>L</sub>-DNA 上则存在与根的形态发生相关的基因。致病基因形成 Ri 质粒的 Vir 区, 具有很高的保守性。Vir 基因虽不发生转移, 但是它对 T-DNA 起着非常重要的作用<sup>[2]</sup>。通常状态下 Vir 区的基因处于抑制状态, 当发根农杆菌感染寄主植物时, 受伤的植物细胞可分泌多种酚类化合物, 如乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS) 和 α-羟基乙酰丁香酮, 能够诱导致病区的转录。难以转化的植物可以通过信号分子诱导细菌的致病基因高表达或者在受伤组织和农杆菌的离体共培养基中加入信号分子提高转化效率。

不同菌株的发根农杆菌因其含有不同类型的 Ri 质粒而对感染植物具有不同的致根能力, 所产生的发根亦具有不同的形态。生长培养基对发根的诱导也有显著影响, 高盐浓度培养基, 如 LS 或 MS 对某些植物发根形成有利; 低盐浓度培养基, 如 B5 则利于发根农杆菌的增生。因此外植体需要在有抗生素的培养基上继代数次。发根农杆菌的浓度也是影响发根产生的重要因子。较低浓度的菌液会导致转化植物细胞的能力不够, 高浓度又会产生竞争抑制降低转化率。

## 2 基于植物发根培养体系的研究热点

**2.1 生产次生代谢物** 一般植物根的培养生长缓慢, 不能或很少合成次生代谢物, 需要添加外源生长激素。发根培养具有独特的遗传和生物合成稳定性, 生长迅速, 激素自养, 易于保存, 能够持续合成多种化合物<sup>[3]</sup>。非向地性的特征有利于在液体培养时通气, 提高生物量的积累。这些特点为通过植物组织培养合成次生代谢物提供了新的途径。发根提取物可以用作药、香料、化妆品、食品添加剂, 具有达到商品化生产的潜力<sup>[4]</sup>。转化发根系也可以成为持续标准生产次生代谢物的可靠来源。独立转化获得的发根克隆起源于单个细胞, 对广泛的株系筛选非常有利, 因此利用发根培养高产次生代谢物是国内外研究的热点, 其基本操作流程如图 1 所示。

转化发根中生物合成次生代谢物是由遗传控制的, 同时也受到营养和环境因素的影响<sup>[5]</sup>。培养基的成分会影响发根的生长和次生代谢物的生产。其蔗糖浓度、外源生长激素、氮源以及它们的相对量、光照、温度、添加化合物都将影响发根生长和总生物产量<sup>[6]</sup>。蔗糖作为最好的碳源, 通过植物细胞的消化水解成葡萄糖和果糖, 但在不同的植物细胞中吸收利用的速率会有所不同。发根中新生细胞位于根尖顶端, 所以增殖只是发生在顶端分生组织, 延长区域再向侧面生长。这种生长方式导致了在根部稳定的积累生物量。为了获得高密度的培养发根, 培养条件应保持在最优状态。但次生代谢物的产量不一定与生长速率相关。发根可以稳定合成大量的植化产品, 同时向培养基中释放少量的目标产物, 反馈抑制其在发根中的积累<sup>[7]</sup>。例如甜菜 (*Beta vulgar-*

*is*) 发根在缺氧处理下释放甜菜花青素。经吐温-20 处理后可渗透过介质促使毛曼陀罗 (*Datura innoxia*) 发根释放大量的莨菪碱而没有副作用<sup>[8]</sup>。添加 XAD-2 液体石蜡油能刺激紫草素的产生<sup>[9]</sup>。Lee 等<sup>[10]</sup>报告了用 5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理转化发根可以短暂释放莨菪烷生物碱而不影响它的生存发育能力。

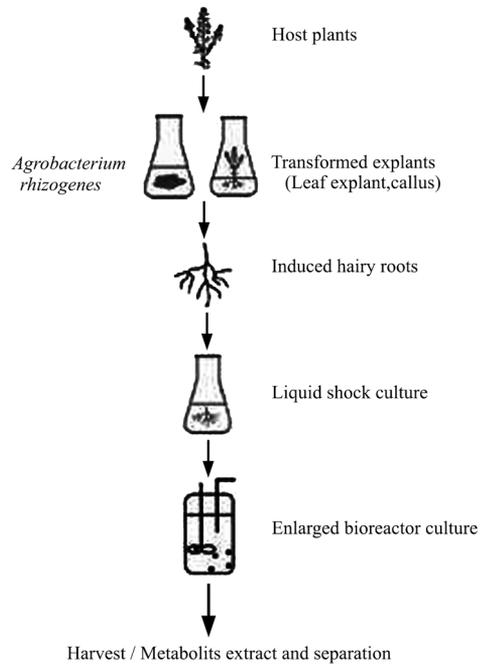


图 1 发根农杆菌转化植物生产药用成分流程图  
Fig 1 Flow diagram of production medicinal composition from medical plant hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes*

生产某种特定的次生代谢物要求根和叶器官的共同作用<sup>[11]</sup>。可以设想在根部器官特异酶作用下合成的代谢前体向上运输, 在叶里面转化成另外的产物。如果酶的表达和活力保持离体的器官特异性, 终产物的合成就会很困难。一种解决的途径是把发根和它们遗传转化生成的芽及芽瘤进行共培养。

遗传转化的发根和芽瘤的属间共培养能有效提高组织特异次生代谢物的生成。在整个植株各器官之间的化合物代谢合成和生物转化也有类似的效应。植物转基因器官的发展, 使共培养可以采用共同的培养基, 无需添加激素而变得简单易行。从菊科 (Asteraceae)、茄科 (Solanaceae)、葫芦科 (Cucurbitaceae)<sup>[12]</sup> 中的一些植物已经转化获得了绿色的发根。绿色发根可以合成某些只能在植物绿色器官中产生的化合物。叶绿体依赖反应是某些次生代谢途径中重要的部分, 这为用根生产化合物提供了新的模式。如用烟草 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco) 大亚基 AN-甲基转移酶启动子和光控调节诱导大豆发根<sup>[13]</sup>。

**2.2 发根生物反应器及其参数优化** 在培养基上接种少量快速生长的发根可以建立发根培养体系。制约发根培养商业开发的主要瓶颈是扩大培养难以达到工业化规模。扩大培养后发根生物催化过程变得复杂而成为一个难题。使用

机械搅动力会造成发根受伤,导致愈伤形成。使用发酵罐可以达到很高的生产能力。

另外一种就是将培养发根置于持续振动的摇床上液体培养,将它们的产物过滤到培养基里,通过吸附剂回收,从流动的液体中提取产物<sup>[14]</sup>。培养基可以复原更新。将发根合成的产物过滤后,营养吸收发生改变,所以沥出液要定期更新。沥出液中的酚类化合物及其氧化物会抑制其他营养成分的吸收,可以通过吸附剂或代谢闸门来控制。营养提供是扩大培养的一个主要化学参数<sup>[15]</sup>。在不同阶段对特殊营养进行定期测定可以评估生物反应器的营养吸收、生物量和代谢物的生产能力。Kwok和Doran<sup>[16]</sup>在对颠茄(*Atropa belladonna*)研究中发现:培养基中碳、氮、氧、氢的损耗与生物量的增加和生物碱的生产相关。在扩大培养阶段,同时给气、液两相提供营养就变得很困难。由于分生组织在液体培养基中形成球状,外围是新生的根,内部是老的组织,中心组织不能及时得到充足的营养和氧气而加速老化。因为发根形态上有分支的特点,形成基质互联,不易流动,导致供氧困难。

生物量的迁移<sup>[17]</sup>,即生物反应器在不同阶段向发根网络的各个部位提供水和氧气的的能力也是影响发根培养营养吸收的重要因素。持续培养将导致发根生物反应体系不同区域变得复杂。氧气是需要持续提供的重要能源。适当的搅拌将有利于氧气的运输。在反应的初始阶段,培养基中溶解的氧气足以满足接种生长的需要。随后的搅拌将起到运输氧气和释放二氧化碳的双重作用。氧气运输系数就是指单位时间里单位生物量吸收氧气的速率。溶解的其他气体代谢物如二氧化碳和乙烯会影响反应器的生产能力。反应器不同部位发根生长活力和气体代谢物浓度的不均匀将会对生物量的迁移造成阻力。在设计生物反应器的时候应该考虑到发根的形态特征,分布的均一,对剪切力的敏感,支持的基质和生物量的流动。为了达到持续生产的要求,产物应该从发根中持续释放,并在不丧失生长活力的前提下保持高密度发根的培养<sup>[18]</sup>。对生物反应器的物理化学参数进行优化,建立一个合适的反应体系是工业化生产的前提。

虽然发根生长不需要补充光照,某些发根却可以在光照下合成更多的代谢物。生物反应器可以设计成外部和内部照明。温度也是一个重要的参数。Yu等<sup>[19]</sup>研究了温度对澳洲茄(*Solanum aviculare*)发根培养的影响,发现25℃是最适宜的培养温度。发根的形态是扩大培养的重要参数。由于无限增殖的特性,新生的细胞壁很薄,易于破裂,使得它们对剪切压力非常敏感。系统保持无菌是反应器的另一个要求。可以通过有效的系统设计,规范操作规程,定期检查来实现。计算机辅助模型可以帮助反应器更有效的生产和再生利用。Kim等<sup>[20]</sup>基于分枝方式建立了培养模型可以对剪切力和化学计量进行优化。Albiol等<sup>[21]</sup>将植物细胞培养人造神经网络模型应用于发根培养。Wyslouzil等<sup>[22]</sup>发现实验模型和理论预计吻合得很好。Padmanabhan等<sup>[23]</sup>用计算机分析细胞胚胎发育成植物的能力,这种模型同样适用于评估发根的生长、遗传和生物合成的稳定性。复杂的发根培养模型包含了流变学、氧消耗、产物释放等诸多因素。

2.3 植株再生 转化发根可以再生为完整的可存活的植

株<sup>[24]</sup>。由发根再生的植株同样具有遗传稳定性,但是有时发根再生的植株会表现出与对照不一样的表型,称为“发根症状(hairy root syndrome)”。rolABC基因的表达是其主要原因,它们在Ri质粒中的座位都对对应一种典型的表型变化。rolA与茎节缩短、叶起皱有关;rolB与斑点生成、雄蕊长度缩短相关;rolC则造成茎节变短,与去除顶端优势相关。

发根可以直接再生或转到含激素的培养基上再生为完整植株。转化Ri质粒的优势在于无需经过愈伤阶段。同时具有较高的转化效率和较快的再生频率。可以不需要选择压筛选而获得转基因植株,避免了使用化学选择压对植株生长的抑制。双价植物表达载体转化植物可以不经选择筛选而获得较高的转化率。另外,根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的植物转化会导致高频基因沉默,而发根农杆菌介导的转化则可以在经过几轮根尖培养后获得稳定表达外源基因的转化细胞。这些发根可以用作器官培养和随后芽的再生而不会产生细胞变异。

2.4 遗传操作 转化发根为开发利用植物细胞提供了新的可靠的途径。发根农杆菌介导的转基因系统与已经研究得很深入的根癌农杆菌介导的转化系统相似。外源DNA替代去掉了边界序列的T-DNA转入植物,诱导长出发根并能再生成植株。通过外源基因的导入或内源基因表达的调控,改变终产物的合成能力,可以研究该基因在代谢途径中的作用<sup>[25]</sup>。外源基因按照孟德尔遗传规律稳定遗传给子代。因此,利用发根的遗传转化研究植物次生代谢途径的代谢流是研究植物代谢的有效手段之一。在次生代谢途径比较清楚的前提下,可以将编码某些关键酶(羟化、甲基化、糖基化)的基因构建到双价载体上通过发根农杆菌转化植物获得发根,提高酶的表达活力和次生代谢物含量。在发根农杆菌介导的转基因研究领域,双价载体开始尝试采用可诱导启动子(inducible promoter),可以提高发根合成能力。另外,通过转入花青素反式作用因子,发根还可以合成新的次生代谢物。

### 3 植物转基因发根的应用

3.1 培育转基因植物新品系 发根在无激素的培养基上快速生长的特点使它可以运用于珍稀植物的无性繁殖。离体培养的发根生长迅速,侧芽和叶片的形成都很快,可以有效地对不易繁殖的植物种类进行快繁。发根再生植株在形态上有一些变异,如形成大量不定根,去除顶端优势,植株变矮,叶片发皱等则可以增加植株的观赏价值。

发根再生植株变矮是洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*)和石竹类属植物(*Dianthus*)<sup>[26]</sup>的典型特征。Pellegrieneschi等<sup>[27]</sup>通过转化天竺葵属(*Pelargonium*)植物获得了发根再生植株。这种可以产生芳香味的植物长长的茎节变短了,外形变得优美而具有观赏性。一些多年生豆科植物在转化后变成了一年生<sup>[28]</sup>。木本植物相对较长的生长周期限制了它的利用。传统育种方法通过亲本杂交进行遗传改良,周期长,过程烦琐。发根农杆菌介导的转化有其生长迅速、转化快捷、表现特异性状的独特优势,在一些树种已经成功实现了转化和再生。一些树木根的生长限制了植株的生长,诱导木本植物发根已经有了报道。桃树、苹果树、樱桃树、橄榄树、

红松和落叶松<sup>[29-30]</sup>都成功诱导产生了发根。Ri质粒介导的转化更可以将外源功能基因导入植物根系,使其获得抗病、杀虫、抗重金属的多抗性。生物技术的采用为在细胞和分子

水平上进行遗传操作,研究发根的转化和植株再生提供了很大的潜力。本实验室已陆续成功建立了多种药用植物的发根培养体系(图2),为后续开展代谢调控研究提供了转化系统。



图2 本实验室建立的几种药用植物发根培养体系

Fig 2 Our laboratory established several hairy root culture system of medicinal plants

A: *Salvia miltiorrhiza*; B: *Catharanthus roseus*; C: *Atropa belladonna*; D: *Hyoscyamus niger*. Small picture shows the original plant

3.2 合成药用成分 通过毛状根培养可以生产的次生代谢产物包括生物碱类(如吗啡生物碱、喹啉生物碱、莨菪烷生物碱、喹啉烷生物碱等)、苷类(如人参皂苷、甜菜苷等)、黄酮类、醌类(如紫草宁等)、多糖类、蛋白质(如天花粉蛋白等)和一些重要的生物酶(如 $\beta$ -甲基戊二酰辅酶A还原酶)。近年来对许多植物材料次生代谢的研究证明 $\beta$ -甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGR)是植物甲羟二戊酸途径调控的第一个关键酶,其调控机制在烟草、棉花等植物上已进行研究。Chappell和Nable<sup>[31-32]</sup>的研究结果表明,向正在生长的烟草悬浮细胞中加入真菌细胞壁碎片会导致培养液中倍半萜产物的积累,同时也检测到HMGR活性瞬时峰值的出现。严春燕等<sup>[33]</sup>从何首乌毛状根60%乙醇提取物中分离得到了12个化合物。发根农杆菌A<sub>4</sub>转化短叶红豆杉芽产生的发根中紫杉醇的含量为愈伤组织的1.3~8.0倍<sup>[34]</sup>。利用发根农杆菌诱导栝楼叶片产生发根,通过培养从液体培养的发根中测出其天花粉蛋白的含量可达8.16 mg/g(鲜重),这一含量约为栝楼块根中天花粉蛋白含量的1/8,占发根中总蛋白含量的3.66%<sup>[35]</sup>。这些实验表明,亲本植株能合成的次生代谢产物可用发根培养物来生产。

3.3 代谢工程 近年来,植物次生代谢产物的遗传学途径和相关基因的研究成果为通过遗传工程的方法提高其产量打开了新的局面。本课题组将来源于烟草的1,4-丁二胺-氮-甲基转移酶(putrescine N-methyltransferase, PMT)基因和来源于莨菪(*Hyoscyamus niger*)的莨菪碱6- $\beta$ -羟化酶(hyoscyamine 6- $\beta$ -hydroxylase, H6H)基因共转化莨菪,使转基因莨菪发根中东莨菪碱(scopolamine)含量提高了9倍<sup>[36]</sup>。在莨菪中过量表达pmt,虽然能有效促进PMT的直接产物1,4-丁二胺(putrescine)的合成,却不能提高终产物莨菪碱(hyoscyamine)和东莨菪碱的含量<sup>[37]</sup>。将从酵母中克隆的编码鸟氨酸脱羧酶的基因和从长春花中克隆的色氨酸脱羧酶基因分别转入罗斯奇卡烟草(*Nicotiana rustica*)和骆驼蓬(*Peganum harmala*),分别提高了次生代谢物尼古丁和长春新碱的含量。利用诱导子干预次生代谢途径中关键酶编码基因的表达,也可以达到同样的目的。用Ag<sup>+</sup><sup>[38-39]</sup>和茉莉酸甲酯<sup>[40]</sup>处理丹参(*Salvia miltiorrhiza*)毛状根,可明显改

变丹参水溶性有效成分合成途径中关键酶基因的表达,并显著提高相应次生代谢产物的含量,显示了基因表达水平和终产物生物合成的相关性。

#### 4 展望

目前对于植物次生代谢途径的相关基础研究还相当有限,发根农杆菌的转化效率和放大培养后的稳定性尚不能令人满意,是制约成功开展药用植物次生代谢工程的主要瓶颈。未来该领域的研究应着眼于以下两个方面:(1)植物转基因发根合成次生代谢产物的内部生源机制(产生部位、存储方式、转运途径、辅助因子等)和受调控因素;(2)简便技术,降低对设备的要求,提高产业化开发的成本优势。

随着对植物次生代谢物及其途径的了解,外源基因转化及表达效率的提高和可转化受体植物范围的不断扩大,生物技术将为传统生药加入新遗传特性的研究带来新的动力。同时随着新型生物反应器的开发及高效细胞培养技术的建立与完善,天然药物生物技术产品的商品化和产业化进程将大大加快,基于发根农杆菌介导的植物次生代谢工程将在分子农业、健康食品、功能食品和植物抗性领域大有作为。

#### [参考文献]

- [1] 徐淑红,李芳英,李新玲,王全伟,徐香玲.发根农杆菌的Ri质粒在药用植物生物技术研究中的应用[J].哈尔滨师范大学自然科学学报,2005,7:4-6.
- [2] Srivastava S,Srivastava A K. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites[J]. Crit Rev Biotechnol,2007,27:29-43.
- [3] Du M,Wu X J,Ding J,Hu Z B,White K N,Branford-White C J. Astragaloside IV and polysaccharide production by hairy roots of *Astragalus membranaceus* in bioreactors[J]. Biotechnol Lett,2003,25:1853-1856.
- [4] Li L,Wang J,Wang W,Liu Y,Wang Y,Zhou G, et al. Optimization of induction and culture conditions and tropane alkaloid production in hairy roots of *Astragalus membranaceus*[J]. Biotechnol Bioprocess Engin,2008,13:606-612.
- [5] Putalun W,Prasarnsiwamai P,Tanaka H,Shoyama Y. Solasod-

- ine glycoside production by hairy root cultures of *Physalis minima* Linn. [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26: 545-548.
- [6] Binder B Y, Peebles C A, Shanks J V, San K Y. The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots[J]. *Biotechnol Prog*, 2009, 25: 861-865.
- [7] Georgiew M I, Pavlov A I, Bley T. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74: 1175-1185.
- [8] Boitel C, Gontier E, Laberche J, Ducrocq C, Sangvan-Norreel B. Inducer effect of Tween 20 permeabilization treatment used for release of stored alkaloids in *Datura innoxia* Mill. hairy root cultures[J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 16: 241-244.
- [9] Shimomura K, Sudo H, Saga H, Kamada H. Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Plant Cell Rep*, 1991, 10: 282-285.
- [10] Lee K T, Yamakawa T, Kodama T, Shimomura K. Effects of chemicals on alkaloid production by transformed roots of *Belladonna* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49: 2343-2347.
- [11] Mishra B N, Ranjan R. Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008, 49(Pt 1): 1-10.
- [12] Flocco C G, Giuliett A M. *In vitro* hairy root cultures as a tool for phytoremediation research[J]. *Methods Biotechnol*, 2007, 23: 161-173.
- [13] Mazarei M, Ying Z, Houtz R L. Functional analysis of the Rubisco large subunit N-methyltransferase promoter from tobacco and its regulation by light in soybean hairy roots[J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 17: 907-912.
- [14] Hu Z, Du M. Hairy root and its application in plant genetic engineering[J]. *J Integrat Plant Biol*, 2006, 48: 121-127.
- [15] Mohagheghzadeh A, Gholami A, Hemmati S, Dehshahri S. Bag culture: a method for root-root co-culture[J]. *Z Naturforsch C*, 2008, 63(1-2): 157-160.
- [16] Kwok K H, Doran P M. Kinetic and stoichiometric analysis of hairy roots in a segmented bubble column reactor[J]. *Biotechnol Prog*, 1995, 11: 429-435.
- [17] 李海波, 孔垂华. 水稻和稗草共生土壤微生物生物量碳及酶活性的变化[J]. *应用生态学报*, 2008, 19: 2234-2238.
- [18] Shin K S, Murthy H N, Ko J Y, Peak K Y. Growth and betacyanin production by hairy roots of *Beta vulgaris* L. in air-lift bioreactors[J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24: 2067-2069.
- [19] Yu S, Kwok K, Doran P. Effect of sucrose, exogenous product concentration and other culture conditions on growth and steroidal alkaloid production by *Solanum aviculare* hairy roots[J]. *Enzyme Microb Tech*, 1996, 18: 238-243.
- [20] Kim S, Hopper E, Hjortso M. Hairy root growth models: effect of different branching patterns[J]. *Biotechnol Prog*, 1995, 11: 178-186.
- [21] Albiol J, Campmaj C, Casas C, Poch M. Biomass estimation in plant cell cultures: a neural network approach[J]. *Biotechnol Prog*, 1995, 11: 88-92.
- [22] Wyslouzil B J, Whipple M, Chatterjee C, Walcerz D B, Weathers P J, Hart D P. Mist deposition onto hairy root cultures: aerosol modeling and experiments[J]. *Biotechnol Prog*, 1997, 13: 185-194.
- [23] Padmanabhan K, Cantliffe D J, Harrell R C, Harrison J. Computer vision analysis of somatic embryos of sweet potato *Ipomoea batatas* (L.) Lam. for assessing their ability to convert to plants[J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 17: 681-684.
- [24] Sivakumar G. Bioreactor technology: a novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots[J]. *Biotechnol J*, 2006, 1: 1419-1427.
- [25] Guillon S, Tr mouillaux-Guiller J, Pati P K, Rideau M, Gantet P. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9: 341-346.
- [26] Giovannini A, Pecchioni N, Rabaglio M, Allavena A. Characterization of ornamental *Datura* plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 1997, 33: 101-106.
- [27] Pellegrineschi A, Damon J, Valtorta N, Paillard N, Tepfer D. Improvement of ornamental characters and fragrance production in lemon scented geranium through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Bio/Technol*, 1994, 12: 64-68.
- [28] Handa T, Sugimura T, Kato E, Kamada H, Takayanagi K. Genetic transformation of *Eustoma grandiflorum* with rol genes [J]. *Acta Hort*, 1995, 392: 209-218.
- [29] McAfee B J, White E E, Pelcher L E, Lapp M S. Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) Spp. using *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 1993, 34: 53-62.
- [30] Rugini E, Mariotti D. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes and rooting in woody species[J]. *Acta Hort*, 1991, 300: 301-308.
- [31] Chappell J, Nable R. Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicite [J]. *Plant Physiol*, 1987, 85: 469-473.
- [32] Chappell J. The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism[J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 1-6.
- [33] 严春艳, 马娜, 王金林, 于荣敏. 转基因何首乌毛状根化学成分的研究[J]. *时珍国医国药*, 2008, 19: 1851-1852.
- [34] 黄遵锡, 慕跃林, 周玉敏. 发根农杆菌对短叶红豆杉的转化及毛状根中紫杉醇的产生[J]. *云南植物研究*, 1997, 19: 292-296.
- [35] 邱德有, 朱微, 朱至清. 利用栝楼发根生产天花粉蛋白的研究[J]. *植物学报*, 1996, 38: 439-443.
- [36] Zhang L, Ding R, Chai Y, Bonfill M, Moyano E, Oksman-Caldentey K, et al. Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 6786-6791.
- [37] Zhang L, Yang B, Lu B, Kai G, Wang Z, Xia Y, et al. Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures overexpressing putrescine N-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent[J]. *Planta*, 2007, 225: 887-896.
- [38] Xiao Y, Gao S, Di P, Chen J, Chen W, Zhang L. Lithospermic acid B is more responsive to silver ion ( $Ag^+$ ) than rosmarinic acid in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures[J]. *Biosci Rep*, 2009, 30: 33-40.
- [39] Ge X, Wu J. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by  $Ag^+$  and yeast elicitor[J]. *Plant Sci*, 2005, 168: 487-491.
- [40] Xiao Y, Gao S, Di P, Chen J, Chen W, Zhang L. Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures[J]. *Physiol Plant*, 2009, 137: 1-9.